

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANASES DERIVADAS DO GENE
XynA DE *Orpinomyces* PC-2 E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA PARA
HIDRÓLISE DE FARINHA E CLARIFICAÇÃO DE SUCOS**

AMANDA TAFURI PANIAGO PASSARINHO

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

P286p

Passarinho, Amanda Tafuri Paniago.

Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene xynA de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência na hidrólise de farinha e clarificação de sucos [manuscrito] / Amanda Tafuri Paniago Passarinho - 2014.

v, 61f.: il., color; graf.; tab.

Orientador: Profa. Dra. Valéria Monteze Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Xilanase - Teses. 2. Hidrólise - Teses. 3. Farinhas - Teses. 4. Sucos cítricos - Teses. I. Guimarães, Valéria Monteze. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 606:62

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene *XynA* de *Orpinomyces* PC2 e avaliação da eficiência na hidrólise de farinha e clarificação de suco”

Aos dezoito dias do mês de fevereiro de 2014, às 14h00min, na Sala de Seminários do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Amanda Tafuri Paniago Passarinho**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dra. Valéria Monteze Guimarães
Presidente

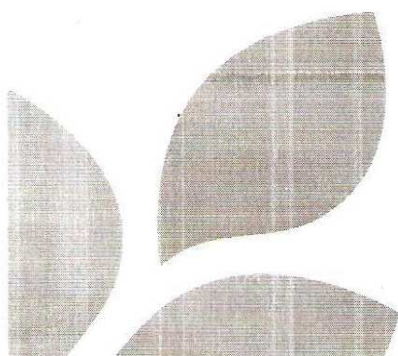
Prof. Dr. Paulo Henrique Alves da Silva
Examinador (UFV)

Prof. Dra. Renata Guerra de Sá Cota
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: **18/02/2014**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec



SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Parede Celular Vegetal	4
2.1.1. Hemiceluloses	4
2.1.2. Xilana	5
2.1.3. Arabinoxilana	6
2.2. Sistema Xilanolítico	7
2.2.1. Endoxilanases	8
2.3. Produção de Endoxilanases Recombinantes	12
2.4. Aplicações Biotecnológicas	17
2.4.1. Aplicações de xilanases na panificação e na clarificação de sucos	20
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Materiais	25
4.2. Produção de xilanases	25
4.3. Purificação	25
4.4. Eletroforese SDS-PAGE	26
4.5. Ensaio enzimático	26
4.6. Especificidade ao substrato	27
4.7. Quantificação de proteína	27
4.8. Efeito de pH, temperatura, estabilidade em pH, termoestabilidade e meia vida	27
4.9. Caracterização cinética	28
4.10. Efeito de íons e outros compostos	28
4.11. Análise da hidrólise de farinha de trigo integral	28
4.12. Clarificação enzimática do suco de maçã	29

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Produção, purificação e atividade enzimática	30
5.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular	31
5.3. Efeito do pH	33
5.4. Efeito da temperatura	35
5.5. Determinação das constantes cinéticas	38
5.6. Efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática	40
5.7. Hidrólise da farinha de trigo integral	42
5.8. Clarificação enzimática de suco de maçã	44
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estrutura da xilana	6
Figura 2. Ação de diversas enzimas na estrutura da arabinoxilana de trigo.....	7
Figura 3. Estrutura do domínio catalítico de xilanases	14
Figura 4. Mapa do plasmídeo pET24b	16
Figura 5. Metodologia clarificação enzimática	29
Figura 6. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12 %)	32
Figura 7. Estimativa das massas moleculares das xilanases	32
Figura 8. Efeito do pH na atividade das xilanases	33
Figura 9. Efeito do pH na estabilidade das xilanases	34
Figura 10. Efeito da temperatura na atividade das xilanases	35
Figura 11. Termoestabilidade a 50 °C	36
Figura 12. Termoestabilidade a 60 °C	36
Figura 13. Meia-vida	37
Figura 14. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reação	39
Figura 15. Gráfico de Arrhenius	40
Tabela 1. Tabela de purificação das xilanases	30
Tabela 2. Valores de K_M , K_{cat} , K e E_a	39
Tabela 3. Efeito de diversos efetores na atividade enzimática	41
Tabela 4. Concentração de açúcares em mg/g de farinha de trigo integral	42
Tabela 5. Análises físico-químicas do suco de maçã	44

RESUMO

PASSARINHO, Amanda Tafuri Paniago, M. Sc., Universidade Federal de Ouro Preto, Fevereiro de 2014. **Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene *xynA* de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de suco.** Orientadora: Valeria Monteze Guimarães.

A endo-1,4- β -xilanase (E.C. 3.2.1.8) é a principal constituinte do sistema enzimático xilanolítico devido à sua atuação na hidrólise da xilana, o segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular de plantas. Neste trabalho, duas xilanases recombinantes, uma com as mutações V135A e A226T (XM) e outra sem mutações (XNM), derivadas do gene *xynA* de *Orpinomyces*, foram expressas em *E. coli*, purificadas e caracterizadas bioquímica e cineticamente com o substrato arabinoxilana de trigo, visando aplicações na tecnologia de alimentos. A produção da enzima em *E. coli*/pET24b foi feita em meios LB e SOB/kan, usando IPTG como indutor. As enzimas foram purificadas em cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose) e apenas uma banda de 25 kDa, correspondente as xilanases, foi visualizada em SDS-PAGE. As atividades específicas, após purificação, foram de 12844 U mg⁻¹ para a XNM, e de 10794 U mg⁻¹ para a XM. As condições ótimas para XNM foram de 60 °C e pH entre 4,5 e 7,0, meia vida de 220 min a 50 °C e de 31 min a 60 °C, ambos em pH 6,5. Os valores de Km, Kcat e Ea foram de 0,0021 mg mL⁻¹, 2,31x10⁶ s⁻¹ e 32,9 kJ mol⁻¹, respectivamente. Já XM manteve a temperatura ótima de 60 °C e exibiu maior estabilidade na faixa de pH de 3 a 8, e meia vida de 440 e 71 min a 50 °C e 60 °C, respectivamente. Os valores de Km, Kcat e Ea foram 0,0014 mg mL⁻¹, 3,29x10⁶ s⁻¹ e 43,9 kJ mol⁻¹, respectivamente. Os ensaios de hidrólise da farinha de trigo integral (10 % p/v) foram conduzidos a 27 °C, 100 rpm, 6h, utilizando 50 U de XNM e 20U de XM/g farinha e a quantificação de xilose liberada foi feita em HPLC. Enquanto que nos ensaios conduzidos a 27 °C não houve liberação de xilose a partir da farinha de trigo, nos ensaios a 50 °C foram detectados 2,38 e 1,55 mg xilose/g farinha com o uso de XNM e XM, respectivamente. Nos ensaios de clarificação do suco de maçã, feita com 50 U/mL de XNM e XM, a 60 °C, 100 rpm, 60 min, foi observada liberação extremamente reduzida de xilose. Assim, para maior eficiência desse processo sugere-se a utilização conjunta de xilanase e pectinases.

ABSTRACT

PASSARINHO, Amanda Tafuri Paniago, M. Sc., Federal University of Ouro Preto, February 2014. **Production and characterization of xylanases derived from the gene *xynA* of *Orpinomyces* PC-2 and evaluation of the efficiency of hydrolysis of flour and clarification of juice.** Advisor: Valeria Monteze Guimarães.

The endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8) is the main constituent of the xylanolytic enzyme system due to its role in the hydrolysis of xylan, the second most abundant polysaccharide in plant cell wall. In this work, two recombinant xylanases derived from the *xynA* *Orpinomyces* gene, one with the mutations V135A and A226T (XM) and another without mutations (XNM), were expressed in *E. coli*. The enzymes were purified and biochemically and kinetically characterized, with wheat arabinoxylan as substrate, targeting applications in food technology. The enzyme production in *E. coli*/pET24b was made in LB media and SOB/kan, using IPTG as inducer. The enzymes were purified on ion-exchange chromatography (Q - Sepharose) and only one band of 25 kDa was visualized on SDS-PAGE, corresponding to xylanase. Specific activities after purification were 12844 U mg⁻¹ for XNM and 10794 U mg⁻¹ for XM. The optimum conditions for XNM were 60 °C and pH between 4.5 and 7.0, half life of 220 min at 50 °C and 31 min at 60 °C, both at pH 6.5. The values of Km, kcat and Ea were 0.0021 mg mL⁻¹, 2.3 x 10⁶ s⁻¹ and 32.9 kJ mol⁻¹, respectively. XM maintained the optimum temperature of 60 °C and exhibited greater stability in the pH range 3-8, and half-life of 440 and 71 min at 50 °C and 60 °C, respectively. The values of Km, Kcat, and Ea were 0.0014 mg mL⁻¹, 3.29 x 10⁶ s⁻¹ and 43.9 kJ mol⁻¹, respectively. The hydrolysis assays of wheat flour (10% w / v) were conducted at 27 °C, 100 rpm, 6 hours, using 50 U / g flour of XNM and 20U / g flour of XM. The quantification of xylose released was made in HPLC. While in the tests conducted at 27 °C there was no release of xylose from wheat flour, in the tests at 50 °C it was detected 2.38 and 1.55 mg xylose / g flour using XNM and XM, respectively. In the experiments for clarification of apple juice, made with 50 U / ml of XNM and XM, at 60 °C, 100 rpm, 60 min, very low release of xylose was observed. Thus, for efficiency of this process, it is suggested the combined use of xylanase and pectinase.

1. INTRODUÇÃO

A xilana é o principal polissacarídeo estrutural nas células de plantas e é o segundo mais abundante na natureza, sendo responsável por aproximadamente um terço de todo carbono orgânico renovável na terra. O seu principal componente é a D-xilose, um açúcar de cinco carbonos. A cadeia principal da xilana é formada por unidades de 1,4- β -D-xilanopiranosil que podem ser substituídas em vários graus com ácido glucurônico, 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, α -L-arabinofuranose e grupamento acetil. As cadeias laterais determinam a solubilidade, a conformação física e a reatividade da molécula de xilana com outros componentes hemicelulósicos. Além disso, apresentam grande influência no modo e na extensão da clivagem enzimática.

Vários microrganismos são ativamente envolvidos na degradação da hemicelulose e as enzimas que a hidrolisam são referidas como hemicelulases. Sua definição e classificação estão de acordo com o substrato em que agem e são coletivamente agrupadas como glicosil hidrolases (GHs). Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, a sua completa hidrólise requer uma ampla variedade de enzimas agindo cooperativamente para convertê-la em unidades de xilose. A atividade das xilanases é altamente dependente da presença de enzimas capazes de degradar as cadeias laterais da xilana. A hidrólise de diferentes xilanas por xilanases gera vários produtos, os quais se diferem pelas quantidades de xilose, xilobioses e xilotrioses, assim como pela natureza dos açúcares substituídos.

As endoxilanases hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidase. As endoxilanases formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. As características da enzima, modo de ação e os produtos da hidrólise variam de acordo com sua origem, já que as endoxilanases podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos, como fungos e bactérias. Os mais potentes produtores são os fungos. Pesquisadores estão especialmente interessados em xilanases fúngicas porque elas são secretadas extracelularmente e sua atividade é muito maior que as xilanases provenientes de leveduras e bactérias.

As endoxilanases foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 e receberam o código enzimático de EC 3.2.1.8. O nome oficial é endo- β -1,4-xilanase e os seguintes sinônimos são comumente utilizados: xilanase, endoxilanase, β -1,4-D-xilana-xilanohidrolase, endo- β -1,4-D-xilanase, β -1,4-xilanase e β -xilase. As endoxilanases microbianas constituem-se em enzimas monoméricas com massa molecular entre 8 e 145 kDa. Usualmente, estas enzimas

apresentam atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60°C (mesofílicas), pH ótimo de 4 a 7 e ponto isoelétrico variando de 3 a 10.

As enzimas microbianas têm demonstrado grande potencial para diferentes aplicações biotecnológicas, especialmente para a indústria de alimentos. Atualmente, vários aditivos químicos estão sendo substituídos pelas enzimas em inúmeras aplicações alimentares. Outras vantagens estão relacionadas à alta eficiência de conversão, a ausência de perda de substrato devido às modificações químicas e o uso de condições de operação físico-químicas mais moderadas e não corrosivas (temperatura de reação mais baixa, pH quase neutro e uso de reagentes biodegradáveis e não-tóxicos), o que torna o processo mais amigável ao meio ambiente.

Sob o ponto de vista industrial, os fungos são particularmente interessantes, uma vez que podem produzir xilanases extracelulares e sintetizam enzimas mais ativas em pH baixo. Os extratos enzimáticos, obtidos destas culturas, possuem, geralmente, maior atividade do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias. Além disto, os fungos possuem a capacidade de produzir enzimas do complexo xilanolítico, o que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal da xilana, mas também, as suas ramificações.

A produção das enzimas microbianas como um complexo enzimático com atividades distintas dificulta a utilização direta destas enzimas em alguns processos industriais. Uma das estratégias para a obtenção de enzimas com maior pureza consiste no isolamento de genes que codificam enzimas do sistema xilanolítico e a expressão em sistemas heterólogos para a obtenção de microrganismos recombinantes que expressem atividades específicas.

Xilanase (XynA), uma enzima pertencente a família GH11, produzida pelo fungo anaeróbio *Orpinomyces* sp. estirpe PC-2, mostrou ser superior às enzimas equivalentes de outras fontes, em especial no que diz respeito à atividade específica. A XynA nativa de *Orpinomyces* PC - 2 tem uma atividade específica de 3500 U mg⁻¹ de proteína contra a xilana birchwood, ao passo que as atividades específicas de xilanases a partir de outras fontes variam entre 20 a 600 U mg⁻¹. O domínio catalítico da XynA de *Orpinomyces* foi expresso em *E. coli* e mutações foram inseridas visando o aumento da estabilidade térmica da enzima, em trabalhos da mesma equipe.

Xilanases são utilizadas na indústria de alimentos, em diversos processos, nas formas isolada ou combinada com outras enzimas. Um dos principais usos dessa enzima é para clarificação do suco de frutas. A arabinoxilana presente na parede das células vegetais é parcialmente solúvel em água, e na forma hidratada resulta em uma solução aquosa altamente viscosa, o que prejudica o processo de filtração do suco de frutas. O pré-tratamento com endoxilanases degrada a arabinoxilana e facilita o processo de clarificação de sucos, uma vez que diminui a presença de polissacarídeos de parede,

tornando a solução mais límpida. A utilização de complexos enzimáticos comerciais no processamento de sucos de diversas frutas tem sido eficaz, aumentando seu rendimento, reduzindo sua viscosidade e promovendo sua clarificação. Para a obtenção de suco clarificado tem sido proposto o emprego de associações de enzimas clarificantes procedentes de diferentes fabricantes, em diversas concentrações, associados a tratamento térmico sob condições variadas de tempo e temperatura de hidrólise. Fatores como a temperatura, pH do suco e a concentração de enzimas, são determinantes para a formação dos flóculos que facilitam a clarificação.

As endoxilanasas também podem ser aplicadas no preparo do pão, onde atuam na hidrólise da xilana da farinha de trigo, tornando a massa mais macia e solta, aumentando significativamente o volume do pão.

Considerando os aspectos discutidos, os objetivos gerais deste trabalho foram produzir, purificar e caracterizar bioquímica e cineticamente xilanases derivadas do gene XynA de *Orpinomyces* PC-2, expressas em *E. coli*, e avaliar as possíveis aplicações biotecnológicas dessas enzimas, especialmente para hidrólise parcial da farinha de trigo integral para melhoria de qualidades reológicas na panificação e para a clarificação de suco de maçã.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal é composta por três principais polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero linear de cadeia longa formada por monômeros de glicose unidos por ligações β -1,4 glicosídicas. A união destes monômeros dá origem às microfibrilas de celulose, que interagem entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemicelulose, um polissacarídeo ramificado de composição heterogênea (principalmente por glicose, manose, galactose, arabinose e xilose). A lignina está presente apenas na parede celular secundária, é um polímero complexo que contém cadeias de monômeros quimicamente distintos, derivados de compostos fenólicos (SUN, 2002).

A celulose é o componente mais abundante, correspondendo de 40 a 45 % do peso seco das plantas. Geralmente, suas fibras encontram-se embebidas em uma matriz de hemicelulose (30-35 %) e lignina (20-23 %). Este polímero é linear e não ramificado, o que confere uma estrutura primária simples e terciária complexa (BHAT *et al.*, 2001). As cadeias de celulose apresentam forte tendência de se agregarem em estruturas altamente ordenadas devido à sua constituição química e à sua conformação espacial. Além dessas regiões cristalinas, a celulose também apresenta regiões amorfas, que são mais susceptíveis ao ataque enzimático (ZHAO *et al.*, 2007).

A hemicelulose, por sua vez, é composta por um grande grupo de polissacarídeos heterogêneos (WONG *et al.*, 1988), de alta massa molecular, insolúveis em água mas solúveis em soluções alcalinas (NAKAMURA, 2003). A hidrólise deste grupo de carboidratos é mais complexa devido à natureza de seus polímeros, que contem xilana, glicomanana ou estruturas de glicana (MILANEZI, 2010).

A lignina é uma estrutura complexa formada por unidades de fenilpropano (C9) e está localizada na lamela média das células vegetais, agindo como cimento entre elas (ANDREAUS *et al.*, 2008). A lignina apresenta diferentes grupos químicos ligados à sua estrutura de acordo com a espécie da planta, o que torna sua morfologia bi- ou tridimensional (PEREIRA *et al.*, 2007). O papel da lignina na parede celular das plantas é conferir suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo (JOVANOVIC *et al.*, 2009).

2.1.1. Hemiceluloses

As hemiceluloses são formadas por uma ampla variedade de substâncias incluindo pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-O-metil-glucurônico e galacturônico). Suas estruturas apresentam

cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade a molécula (RAMOS, 2003).

A característica estrutural comum entre os diferentes tipos de hemicelulose está na configuração da estrutura piranosídica, com a presença de hexoses ou pentoses com ligações β -1,4 na hidroxila do C-4 em orientação equatorial. Por essa razão, sua estrutura é linear, similar à da celulose. No entanto, diferentemente desta, as hemiceluloses apresentam grande variedade de açúcares nas ramificações, o que impede a formação de grandes regiões cristalinas como no caso da celulose. Apesar de serem mais acessíveis ao ataque químico ou enzimático, as ramificações do esqueleto do polissacarídeo bloqueiam a clivagem em determinados locais, tornando a hemicelulose muito mais complexa de ser degradada enzimaticamente (JOVANOVIĆ *et al.*, 2009).

A composição química e as características estruturais das hemiceluloses variam largamente entre espécies, localização subcelular e estágio de desenvolvimento. Estes compostos têm sido frequentemente reportados como quimicamente associados ou ligados a outros polissacarídeos, proteínas ou lignina. Provavelmente não existem cadeias químicas entre celulose e hemicelulose mas uma adesão mútua é fornecida por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (WYMAN, 2005).

A quantidade e a estrutura das hemiceluloses são bem estudadas desde que estes compostos, como parte do material lignocelulósico, pertencem a maior reserva orgânica da Terra que pode ser convertida a produtos industriais ou bicomcombustíveis (SAHA, 2003; GRAY *et al.*, 2006; SOMERVILLE, 2007; PAULY *et al.*, 2008). Hemiceluloses são conhecidas na indústria de papel, onde são utilizadas como aditivos que melhoram as propriedades mecânicas no papel (LIMA *et al.*, 2003; PULS *et al.*, 2006). Em contraste com a pesquisa industrial, surpreendentemente pouco é conhecido sobre as propriedades ecológicas e fisiológicas das hemiceluloses (HOCH, 2007).

A heterogeneidade de hemiceluloses dentro da matriz da parede celular é também expressa em diferentes ligações estreitas a fibrilas de celulose entre as diferentes classes de hemiceluloses (MORRISON, 1980), que devem corresponder a diferentes funções deste composto dentro da parede celular (SUN *et al.*, 2004).

2.1.2. Xilana

A hemicelulose, a celulose e a lignina são os principais constituintes poliméricos da parede celular das plantas (KULKARNI *et al.*, 1999). A xilana constitui o principal componente da hemicelulose (SHALLOM *et al.*, 2003) e é o segundo mais abundante na natureza, sendo responsável por aproximadamente um terço de todo carbono orgânico renovável na terra (PRADE, 1995). O seu principal componente é a D-xilose, um açúcar de cinco carbonos que pode ser convertido em fonte de energia em diversas células

microbianas (BIELY, 1985). A xilana é encontrada na interface entre a lignina e a celulose onde é importante na ligação das fibras e na integridade da parede celular (BEG *et al.*, 2001).

A cadeia principal da xilana é formada por unidades de 1,4- β -D-xilanopiranosil que podem ser substituídas em vários graus com ácido glucurônico, 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, α -L-arabinofuranose e grupamento acetil (Figura 1). A xilana apresenta ainda pequenas quantidades de ácido ferúlico e *p*-cumárico ligados aos seus resíduos de L-arabinose (KULKARNI *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000). Dependendo das ramificações presentes na cadeia central, as xilanas podem ser denominadas como arabinoxilanas, glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas ou homoxilanas. Xilanas de diferentes fontes apresentam considerável variação em sua composição e estrutura (KULKARNI *et al.*, 1999).

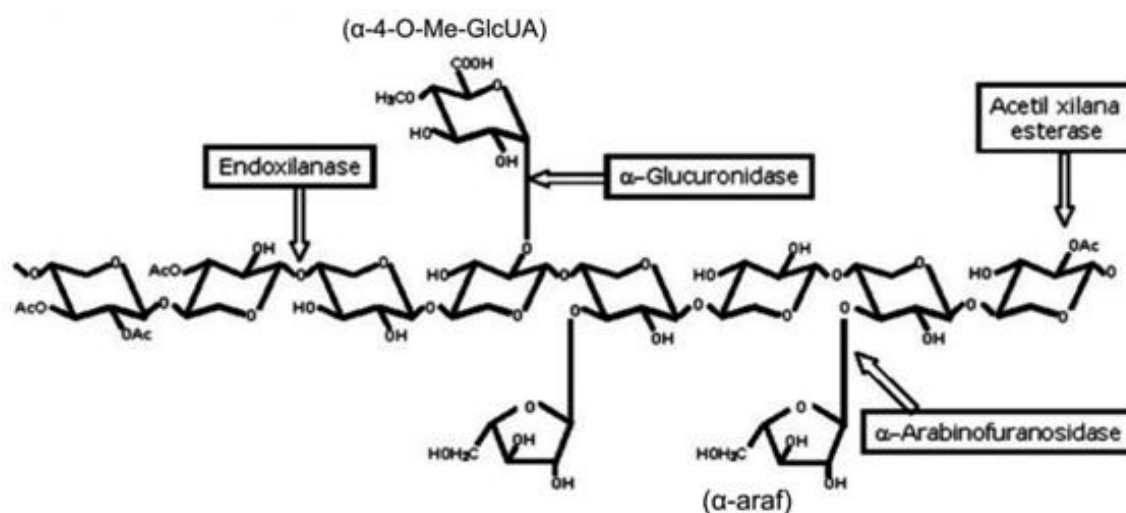


Figura 1 - Estrutura da xilana e os pontos de clivagem pelas enzimas xilanólíticas. Ac: grupo acetil; α -araf: α -arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcUA: ácido α -4-O-metilglucurônico. Fonte: Adaptada de (SUNNA *et al.*, 1997).

As cadeias laterais determinam a solubilidade, a conformação física e a reatividade da molécula de xilana com outros componentes hemicelulósicos. Além disso, também apresentam grande influência no modo e na extensão da clivagem enzimática (KULKARNI *et al.*, 1999).

2.1.3. Arabinoxilana

As arabinoxilanas são polissacarídeos que se encontram na casca dos grãos como no trigo, centeio e na cevada. Estes carboidratos complexos têm um esqueleto químico de xilana com unidades de L-arabinofuranose (L-arabinose em sua estrutura pentagonal)

distribuídas ao acaso com ramificações β -1,2 e β -1,3 ao longo da cadeia de xiloses (Figura 2). A xilose e a arabinose são ambas pentoses, por isso as arabinoxilanas também se classificam como pentoses. As arabinoxilanas são de importância na panificação. As unidades de arabinose produzem compostos viscosos com a água que afetam a consistência da massa, a retenção de gás da fermentação no glúten e no amido e a textura final dos produtos forneados (GONZALES CANGA *et al.*, 2004).

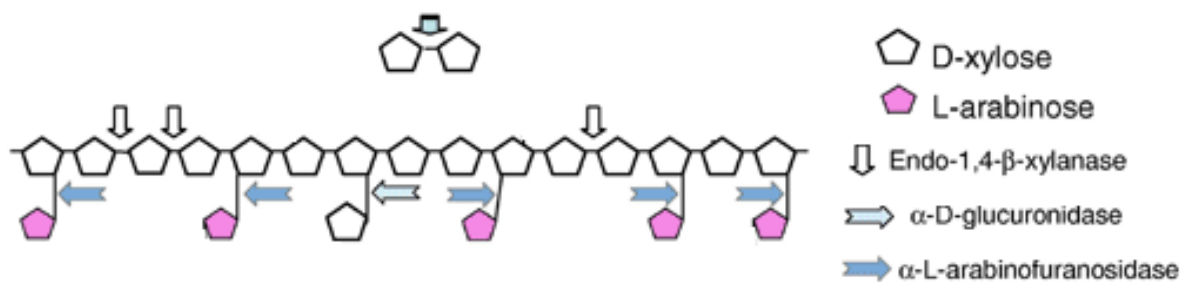


Figura 2 – Ação de diversas enzimas na estrutura da arabinoxilana de trigo
 Fonte: adaptado de ARO *et al.*, 2005.

2.2. Sistema Xilanolítico

Devido à heterogeneidade da xilana, sua hidrólise requer a ação de um complexo sistema enzimático, composto por enzimas como: β -xilosidases, endoxilanas, α -arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil-xilana esterases, ácido fenólico esterases e p-cumárico esterases. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose (SUNNA *et al.*, 1997).

Vários microrganismos são ativamente envolvidos na degradação da hemicelulose. A presença de microrganismos que degradam este polímero, particularmente a xilana, o maior constituinte da hemicelulose, foi reportado há mais de 100 anos atrás por Hoppe-Seyler em 1889. As enzimas que quebram a hemicelulose são referidas como hemicelulases. Elas são definidas e classificadas de acordo com o substrato em que agem e são coletivamente agrupadas como glicosil hidrolases (SHARMA *et al.*, 2013).

Dentre as enzimas que compõem o sistema xilanolítico, as arabinofuranosidases hidrolisam o grupo terminal não redutor de arabinofuranose de arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas. As glucuronidases hidrolisam as ligações α -1,2-glicosídicas entre a xilose e o ácido glucurônico. A completa hidrólise de glucuronoxilanas requer esterases para remover os grupos acetil e ácidos fenólicos. As esterases quebram as ligações da xilose com o ácido acético (acetil-xilana esterase), resíduos da cadeia de arabinose com ácido fenólico (ácido fenólico esterase) e resíduos

da cadeia de arabinose com ácido cumárico (ácido cumárico esterase) (CARVALHO, 2008).

Muitos fungos como *Penicillium capsulatum* e *Trichoderma emersonii* possuem um sistema xilanolítico composto por todas as diferentes enzimas (MOLONEY *et al.*, 1983). Em trabalho desenvolvido por Bachmann *et al.*, (1991) foi demonstrado o sinergismo entre endoxilanasas, β -xilosidases, α -arabinofuranosidases e acetil-xilana esterases do actinomiceto termofílico *Thermomonospora fusca*. A ação sinérgica entre exoxilanasas e endoxilanasas tem sido verificada uma vez que muitas endoxilanasas não clivam as cadeias laterais, as quais precisam ser inicialmente clivadas pelas exoxilanasas para permitir uma hidrólise completa da xilana.

A atividade das xilanasas é altamente dependente da presença de enzimas capazes de degradar as cadeias laterais. A hidrólise de diferentes xilanas por xilanasas gera vários produtos, os quais se diferem pelas quantidades de xilose, xilobioses e xilotrioses, assim como pela natureza dos açúcares substituídos (BIELY, 1985).

As endoxilanasas hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia da xilana produzindo xilo-oligossacarídeos, os quais são convertidos em xilose pela β -xilosidase. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002).

As ligações da hemicelulose não são todas equivalentes e igualmente acessíveis para as enzimas xilanolíticas. Além disso, a estrutura da hemicelulose também muda durante a hidrólise devido à retirada de substituintes e diminuição do tamanho da cadeia (WONG *et al.*, 1988).

2.2.1. Endoxilanasas

As endoxilanasas formam o maior grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. As características da enzima, modo de ação e os produtos da hidrólise variam de acordo com sua origem, já que as endoxilanasas podem ser produzidas em condições variadas por diferentes microrganismos, como fungos e bactérias (BASTAWDE, 1992). Os mais potentes produtores são os fungos. Pesquisadores estão especialmente interessados em xilanasas fúngicas porque elas são secretadas extracelularmente e sua atividade é muito maior que as xilanasas provenientes de leveduras e bactérias (TREVIZANO, 2009).

A xilanase é produzida por diversos gêneros e espécies de bactérias, fungos e actinomicetos. Enquanto várias espécies bacterianas segregam níveis elevados de xilanase extracelular, fungos filamentosos secretam grandes quantidades de proteínas extra-celulares, onde a secreção de xilanase frequentemente acompanha enzimas celulolíticas (POLIZELI *et al.*, 2005). Dentro do grupo das hemicelulases, as xilanasas

microbianas são os catalisadores preferidos pela indústria para hidrólise da xilana devido a sua alta especificidade, baixa perda de substrato e baixa geração de resíduos (MICHELIN *et al.*, 2008).

A maioria dos fungos produz endo-1,4- β -xilanasas que toleram temperaturas de até 50 ° C. Em geral, com raras exceções, os fungos são relatados por produzir endo-1,4- β -xilanasase e têm um pH de cultivo inicial menor do que pH 7,0. O pH ótimo de endo-1,4- β -xilanasas bacterianas é, em geral, ligeiramente mais elevado do que o pH ótimo de endo-1,4- β -xilanasas de fungos. Na maior parte das aplicações industriais, especialmente indústrias de papel e polpa, o pH baixo requerido para o crescimento ótimo e atividade de endo-1,4- β -xilanasase requer passos adicionais, nas etapas seguintes que faz as endo-1,4- β -xilanasas fúngicas menos adequadas (SHARMA *et al.*, 2013).

Estas enzimas foram reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em 1961 e receberam o código enzimático de EC 3.2.1.8. O nome oficial é endo- β -1,4-xilanasase e os seguintes sinônimos são comumente utilizados: xilanasase, endoxilanasase, β -1,4-D-xilana-xilanolhidrolase, endo- β -1,4-D-xilanasase, β -1,4-xilanasase e β -xilanasase (COLLINS *et al.*, 2005).

O amplo potencial de aplicação biotecnológico das enzimas xilanólíticas estimula principalmente pesquisas envolvendo microrganismos xilanólíticos termofílicos e extremofílicos, pois estes produzem enzimas com maior estabilidade. Substratos lignocelulósicos como sabugo de milho, farelo de aveia, farelo de arroz, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar têm se mostrado eficientes indutores para a produção de enzimas xilanólíticas por alguns fungos como *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum*, *Humicola grisea*, entre outros (BEG *et al.*, 2001; CARVALHO, 2008; DE PAULA *et al.*, 1998; FARIA, 2000; HALTRICH *et al.*, 1996; MORAES *et al.*, 2002). Os meios de cultura utilizados para a produção de endoxilanasas por fungos contém, além do substrato indutor, sais minerais (KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NH_4^+ ou de NO_3^-), íons metálicos (Fe^{2+} , CO^{2+} , Zn^{2+}) e complexas fontes de nitrogênio orgânico, que são mais eficientes para a produção de endoxilanasas do que fontes inorgânicas. De uma forma geral a produção de endoxilanasas encontra-se relacionada ao controle nutricional dos microrganismos (KULKARNI *et al.*, 1999).

Um dos fatores básicos para uma eficiente produção de xilanasas, por microrganismos, refere-se à adequada escolha do substrato e a otimização da composição do meio de cultivo, bem como controlar a formação de compostos indesejáveis, como a produção de celulases, quando a enzima produzida destina a indústria de papel, por exemplo. Neste caso, o substrato não é somente fonte de carbono e energia, mas fornece, também, os compostos indutores da produção enzimática para o microrganismo. A maioria das endoxilanasas produzidas por bactérias

e fungos parecem ser enzimas induzidas. Em geral, o mecanismo que regula a indução das xilanases é complexo e a resposta, em termos de produção enzimática, frente a um indutor, varia para cada microrganismo, pois um indutor que leva a máxima atividade em uma espécie pode ser o inibidor da atividade em outra (KULKARNI *et al.*, 1999).

A composição dos meios de cultivo para a produção de xilanases por diferentes microrganismos incluem, algumas vezes, além do substrato indutor, diversos sais minerais e alguns íons metálicos. No entanto, muito frequentemente, é necessário acrescentar aos meios, uma fonte de nitrogênio. Geralmente, se obtém bons resultados, em termos de produção de xilanase, fazendo uso de extrato de levedura e peptona na composição dos meios (HALTRICH *et al.*, 1996).

Via de regra, os fungos sintetizam enzimas mais ativas em pH baixo, motivo pelo qual, sob o ponto de vista industrial, os fungos são particularmente interessantes, uma vez que podem produzir xilanases extracelulares. Os extratos enzimáticos, obtidos destas culturas, possuem, geralmente, maior atividade do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias. Além disto, os fungos possuem a capacidade de produzir enzimas do complexo xilanolítico, o que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal da xilana, mas também, as suas ramificações (HALTRICH *et al.*, 1996; KULKARNI *et al.*, 1999).

A produção de xilanases por fungos filamentosos está relatada para uma maior diversidade de espécies como *Aspergillus* sp. (FERREIRA *et al.*, 1999; GHANEM *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2003; PAL *et al.*, 2010; BENEDETTI *et al.*, 2013), *Fusarium* sp. (CHEILAS *et al.*, 2000; SAHA, 2001; SAHA, 2002), *Melanocarpus* sp. (JAIN *et al.*, 1998; NARANG *et al.*, 2001), *Penicillium* sp. (BRUTUS *et al.*, 2004; BERRIN *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2011; LAFOND *et al.*, 2011; TERRASAN *et al.*, 2013), *Rhizopus* sp. (BAKIR *et al.*, 2001), *Thermoascus* sp. (ALAN *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 2011;) e *Thermomyces* sp. (ALAN *et al.*, 1994; GRUBER *et al.*, 1998; DAMASO *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2000), *Acremonium* sp. (de ALMEIDA *et al.*, 2011), *Chrysosporthe cubensis* (FALKOSKI *et al.*, 2013).

As endoxilanases microbianas constituem-se em enzimas monoméricas com massa molecular entre 8 e 145 kDa. Usualmente, estas enzimas apresentam atividade ótima em temperaturas entre 40 e 60°C (mesofílicas), pH ótimo de 4 a 7 e ponto isoelétrico variando de 3 a 10 (KULKARNI *et al.*, 1999; SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002). As endoxilanases fúngicas apresentam maior estabilidade, incluindo um pequeno número de enzimas com atividade ótima em temperaturas acima de 80°C (DUSTERHOFT *et al.*, 1997; SUNNA *et al.*, 1997). Entretanto, foram descritas endoxilanases ativas em temperaturas de 5 a 105°C (COLLINS *et al.*, 2002, 2003; KULKARNI *et al.*, 1999) e pH de 2 a 11 (FUSHINOBU *et al.*, 1998; KULKARNI *et al.*, 1999).

As Glicosil Hidrolases (GHs) são conhecidas por sua habilidade de hidrolisar os polissacarídeos da biomassa lignocelulósica. As xilanases são glicosil hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-xilosídicas da cadeia principal da xilana (COLLINS *et al.*, 2005). Um sistema de classificação baseado na comparação da estrutura primária dos domínios catalíticos foi proposto por Henrissat e colaboradores 1993 e permitiu a classificação não só das endoxilanases, mas das glicosil hidrolases em famílias. Dentre as 106 famílias descritas até o momento, as endoxilanases encontram-se principalmente nas famílias 10 (41%) e 11 (55%) (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002; SUNNA *et al.*, 1997). Entretanto foi descrito recentemente o enquadramento de endoxilanases nas famílias 5, 7, 8 e 43 (COLLINS *et al.*, 2005). As endoxilanases da família 10 apresentam alta massa molecular (> 30 kDa) e pI ácido, e as da família 11 apresentam baixa massa molecular (< 30 kDa) e pI básico ou ácido (HENRISSAT *et al.*, 1993; SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002).

As endoxilanases podem hidrolisar restritamente as ligações β -1,4 da xilana ou podem exibir reação cruzada e hidrolisar as ligações β -1,4 de outros polímeros, como as da celulose microcristalina. Algumas enzimas somente atuam nas regiões lineares da cadeia de xilana, enquanto outras hidrolisam as regiões ramificadas também, liberando resíduos de arabinose durante a hidrólise (COUGHLAN, 1992).

Em relação às propriedades catalíticas, as endoxilanases da família 10 têm menor especificidade ao substrato (frequentemente tendo atividade de endoglucanase) e hidrolisam heteroxilanas em uma maior proporção quando comparadas com as da família 11 (COLLINS *et al.*, 2002). Biely (1985) concluiu que as endoxilanases da família 10, em contraste com as da família 11, são capazes de atacar as ligações glicosídicas próximas aos pontos de ramificação e da extremidade não redutora.

As endoxilanases da família 11 atuam exclusivamente em substratos contendo resíduos de D-xilose, por isso são consideradas xilanases verdadeiras. Elas apresentam menor versatilidade catalítica do que as endoxilanases da família 10 e os produtos de hidrólise liberados pela ação desta classe de enzimas contém fragmentos de xilooligosacarídeos maiores, os quais podem ser hidrolisados pelas enzimas da família 10 (BIELY *et al.*, 1993, 1997).

As xilanases da família 10 não são muito específicas, hidrolisando além da xilana, celulose, carboximetilcelulose, *p*-nitrofenil- β -glicosídeo, celobiose e laminarina (MAGALHÃES, 2005). Estas enzimas clivam a cadeia de xilana a partir do terminal não redutor e liberam xilose, xilooligosacarídeos lineares e ramificados. Sua ação em arabinoxilana produz a arabinoxilose (BIELY *et al.*, 1997).

Wong *et al.* (1988) classificaram as xilanases com base em suas propriedades físico-químicas, e propuseram a existência de dois grupos: as xilanases de baixa massa

molecular (menores que 30 kDa e pI básico), e as de alta massa molecular (maiores que 30 kDa e pI ácido). Esta classificação mantém relação com as classificações anteriores (GH11 e GH10). Enzimas da mesma família apresentam estrutura tridimensional e mecanismos moleculares semelhantes (COLLINS *et al.*, 2005).

2.3. Produção de Endoxilanasas Recombinantes

Uma grande variedade de formas isoenzimáticas de endoxilanasas é usualmente produzida pelos microrganismos, os quais as secretam ou as mantêm associadas às células microbianas. Estas múltiplas enzimas são codificadas por diferentes genes ou são geradas pela expressão diferencial de um mesmo gene (LI *et al.*, 1994; WONG *et al.*, 1988).

A produção das enzimas microbianas como um complexo enzimático com atividades distintas dificulta a utilização direta destas enzimas em alguns processos industriais. Uma das estratégias para a obtenção de enzimas com maior pureza consiste no isolamento de genes que codificam enzimas do sistema xilanolítico e a expressão em sistemas heterólogos para a obtenção de microrganismos recombinantes que expressem atividades específicas (HARKKI *et al.*, 1991).

Nas últimas décadas, tem sido utilizado um número cada vez maior de proteínas recombinantes em processos biotecnológicos, assim vários estudos têm se concentrado na produção eficiente destas proteínas em sistemas heterólogos. Genes que codificam enzimas xilanolíticas bacterianas e fúngicas têm sido clonados e expressos em sistemas heterólogos. Os sistemas de expressão heterólogos mais utilizados são os de bactérias (*Escherichia coli* e *Bacillus sp.*), fungos filamentosos (*Aspergillus nidulans* e *Trichoderma reesei*) e leveduras (*Sacharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*) (FARIA, 2000). Estes sistemas de expressão apresentam vantagens como processamento pós-transcricional e pós-traducional, além de apresentar facilidade de manipulação genética e alta produtividade (ROMANOS, 1992).

Xilanasas ativas em temperaturas mais altas são de grande interesse na indústria. A disponibilidade de xilanasas isoladas da natureza com as características de termoestabilidade e pH desejados é limitado, mas os benefícios potenciais da utilização dessas enzimas para processos biotecnológicos encorajou estudos generalizados buscando a produção de xilanasas desejáveis através de engenharia de proteínas, utilizando técnicas tais como mutagênese sítio-dirigida (FENEL *et al.*, 2004; GEORIS *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2003; TURUNEN *et al.*, 2001,2002; WAKARCHUK *et al.*, 1994) e evolução dirigida (CHEN *et al.*, 2001; INAMI *et al.*, 2003).

Evolução dirigida surgiu como uma alternativa bem sucedida para a concepção racional para engenharia genética de enzimas (KUCHNER *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*,

2003). Esta metodologia tem sido utilizada para melhorar as propriedades existentes de enzimas (GIVER *et al.*, 1998) . Entre os métodos de mutagênese aleatória, o método de error-prone PCR, com base na amplificação imprecisa de genes, tem tido muito sucesso e é geralmente usado em experimentos de evolução dirigida, devido à sua simplicidade e versatilidade. Esta técnica não requer amplo conhecimento do gene de interesse e este método consiste em mutagênese aleatória e triagem (WONG *et al.*, 2004).

Xilanase (XynA) , produzida pelo fungo anaeróbio *Orpinomyces* sp. estirpe PC - 2, mostrou ser superior às enzimas equivalentes de outras fontes, em especial no que diz respeito à atividade específica (LI *et al.*, 2007). A XynA nativa de *Orpinomyces* PC - 2 tem uma atividade específica de 3500 U mg⁻¹ de proteína contra a xilana birchwood, ao passo que as atividades específicas de xilanases a partir de outras fontes variam entre 20 e 600 U mg⁻¹. A atividade específica da xilanase de *Trichoderma viride* e de *Aspergillus sydowii* é de cerca de 152 mg L⁻¹ e 204 mg L⁻¹ , respectivamente (UJIE *et al.*, 1991; GHOSH *et al.*, 1994). A atividade específica de uma β - xilanase termostável produzida por *Aspergillus awamori* 2B.361 U2 / 1 em cultura submersa com farelo de trigo como fonte de carbono foi de 490 mg L⁻¹ (TEIXEIRA *et al.*, 2010) . Além disso, a produção do XynA heteróloga de *Orpinomyces* PC - 2 por *Hypocrea jecorina* num fermentador atingiu uma atividade específica de 4500 U mg⁻¹. O nível de produção de XynA sob essa condição foi estimado em cerca de 150 mg L⁻¹ (LI *et al.*, 2007).

Trevizano (2013) construiu uma biblioteca a partir dos mutantes de XynA obtidos por error-prone PCR para identificar xilanases termoestáveis de *Orpinomyces* PC-2. Mutantes com propriedades melhoradas foram selecionados através de vários ciclos de triagem realizados para esta biblioteca mutante de XynA. Este estudo foi desenvolvido para investigar o uso de mutagênese aleatória e a metodologia de triagem para obter xilanases de *Orpinomyces* com melhor estabilidade térmica. Modelos de homologia para as mutantes mais termoestáveis foram construídos de modo a identificar a localização dos resíduos modificados por error-prone PCR e para investigar o efeito de tais mutações nas propriedades de xilanase.

As xilanases de fungos anaeróbios *Orpinomyces* sp. estirpe PC - 2 pertencem à família 11 (GH11 - glicosil hidrolases família 11) e os membros desta família derivam tanto de espécies eucarióticas como de bacterianas que partilham identidade de sequência, variando de 40 a 90% (TORRONEN *et al.*, 1993, 1997). Todos os membros da família 11 mostram estruturas tridimensionais e geometria do sítio-ativo semelhantes. A estrutura 3D dos domínios catalíticos das xilanases é representado por uma dobra jelly-roll, em que duas folhas β formam o sítio ativo e a fenda de ligação ao substrato, em que os resíduos de glutamatos catalíticos estão localizados. As estruturas de xilanases GH11 são compostas por uma única α - hélice e duas folhas β torcidas

formando uma dobra jelly-roll, no qual três regiões têm sido reconhecidas utilizando uma analogia com a mão direita. A região de dedos e da palma compreendem as estruturas de folha β , formando o chão e uma parede do sítio-ativo, respectivamente. A região do polegar é composta de uma cadeia curta de duas folhas β , que formam a parede oposta do sítio-ativo e tem mostrado ser altamente flexível (Figura 3) (WAKARCHUK *et al.*, 1994; GRUBER *et al.*, 1998; MUILU *et al.*, 1998; MURAKAMI *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2009; POLLET *et al.*, 2009).

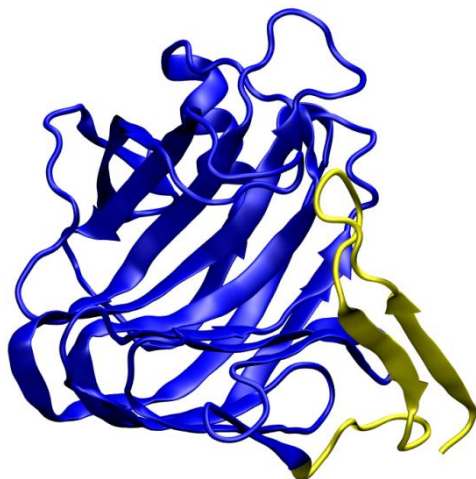


Figura 3 – Estrutura do domínio catalítico de xilanases. As folhas β que podem afetar a estabilidade da xilanase na região N-terminal são mostradas em amarelo.

Fonte: Trevisano, 2013.

Para a aplicação biotecnológica de enzimas, além da estabilidade térmica, a grande produção e a alta performance catalítica são também relevantes. Muitos genes de xilanase a partir de diversos fungos e bactérias têm sido clonados e expressos em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2008, JIA *et al.*, 2012).

Escherichia coli tem sido amplamente utilizada para a clonagem de genes e para a expressão heteróloga de proteínas recombinantes incluindo as xilanases de fungo. Isto é principalmente devido à facilidade de clonagem de DNA, uma ampla escolha de vetores de clonagem, e em muitos casos, a secreção das proteínas heterólogas para o meio de cultura para evitar as dificuldades associadas com a purificação da proteína a partir de seus hospedeiros naturais. *E. coli* têm sido muito utilizada para a produção de proteínas recombinantes, quer intracelularmente ou extracelularmente (BANEYX 1999; MERGULHAOA *et al* 2005; SORENSEN *et al.*, 2005). A principal limitação da utilização de *E. coli* como célula hospedeira é que nem toda proteína é segregada eficientemente. A superexpressão de enzimas recombinantes em *E. coli* permite a engenharia de enzimas para o estudo da relação estrutura - função de metagênese sítio-dirigida, bem como a

melhoria das propriedades das enzimas que utilizam a tecnologia da evolução dirigida (ALCALDE *et al.*, 2006 ; KAUR *et al.*, 2006).

Vários vetores de expressão e estirpes hospedeiras são disponíveis para expressão de genes heterólogos em *E. coli*. O sistema pET de vetor de expressão está entre os meios mais eficazes de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Zhou *et al.* (2008) clonaram o *xynII* cDNA de *Aspergillus usarii* usando o vetor de expressão pET-28a (+) e transformado em *E. coli* BL21-(DE3) RIL. Eles obtiveram atividade máxima de 49,4 U mg⁻¹ a partir de extratos celulares de *E. coli* BL21-(DE3) RIL após a indução com isopropílico β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). A proteína recombinante também teve His-tag para purificação adicional. Um gene de β-xilanase, *xyn2*, a partir de *Trichoderma reesei* foi também expressa em *E. coli* usando o vetor de expressão pET (JUN *et al.* 2008) com nível de expressão de até 650 mg L⁻¹. Xue *et al.* (1995) isolaram um gene *xynA* de fungos anaeróbios *Neocallimastix patriciarum* e o modificaram para expressão de alto nível em *E. coli*, representando cerca de 25% das proteínas celulares.

A fim de se juntar a estabilidade térmica e a grande produção de xilanases ativas, que são parâmetros fundamentais para aplicação industrial, Trevizano (2012) fez abordagens em dinâmica molecular para avaliar regiões tridimensionais na estrutura da enzima mutante e na tipo selvagem que podem afetar a estabilidade e a atividade da proteína. Além disso, uma vez que a baixa expressão não permite que a proteína recombinante seja aplicada de forma prática e econômica na indústria, o objetivo do estudo foi alcançar a expressão de alto nível de xilanases termoestáveis mais ativas.

Para que a endo-β-1,4-xilanase de *Orpinomyces* PC-2, estudada pelo nosso grupo de pesquisa, se adequasse às condições biotecnológicas, a técnica de *error-prone* PCR foi utilizada. A nova biblioteca de *xynA* foi submetida a vários ciclos de *screening* e sete mutantes com maior estabilidade térmica (M1-M7) foram selecionados. Nas PCR foram usados *primers* para amplificação do fragmento correspondente à sequência do gene que codifica o domínio catalítico da enzima. Como moldes, foram usados os genes *xynA* mutados previamente selecionados a partir da blot de *error-prone* e o gene que codifica para a xilanase não mutada. Um par de oligonucleotídeos, OXF0 (5'GGCAATTCCATATGGGTCAAAGATTAAGCGTTGG3') e OXR1 (5'GCCGCTCGAGTTAACGAGGAGCAGAACCTTGTTT3'), foi sintetizado para a amplificação dos genes. OXF0 é complementar aos nucleotídeos que codificam a partir do resíduo de aminoácido 28 e OXR1 parecia com os nucleotídeos antisenso que codificam os resíduos de aminoácidos 249 ao 255 da xilanase A de *Orpinomyces* PC-2. Os nucleotídeos sublinhados e os duplamente sublinhados são os sítios de restrição para *NdeI* e *XhoI*, respectivamente. Foi utilizada uma enzima de alta fidelidade para que as mutações

previamente inseridas pela metodologia de *error-prone* PCR fossem mantidas (KOD DNA Polymerase Kit –Novagen). O volume total de 50 µL de reação continha 5 µL de tampão 10X, 5 µM de cada *primer*, 2,0 mM de dNTP's, 1,5 unidades de KOD polimerase, 2,5 mM de MgCl₂ e 2 ng DNA plasmidial. O procedimento foi feito no equipamento Mastercycler Thermocycler (Eppendorf, Germany) nas seguintes condições: temperatura inicial de 94 °C por 3 minutos, seguido de 3 ciclos de 95 °C for 20 segundos, 37 °C por 30 segundos e 72 °C por 60 segundos, depois 30 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos, e por fim, um período de 10 minutos de a 72 °C.

A confirmação da amplificação dos insertos foi feita com a visualização da banda correspondente em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídeo. As bandas foram purificadas usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Os produtos purificados da PCR e o vetor pET24b (Figura 4) foram digeridos com *NdeI* e *XhoI*, purificados novamente a partir do gel e procedeu-se à clonagem dos insertos no vetor de expressão pET24b com o kit T4 DNA ligase. O produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5α. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL do meio Luria Bertani (LB) contendo canamicina (Kan) e a cultura foi mantida sob agitação a 180 rpm, 37 °C por 12 h (New Brunswick, Scientific Co., Edison, NJ, USA).

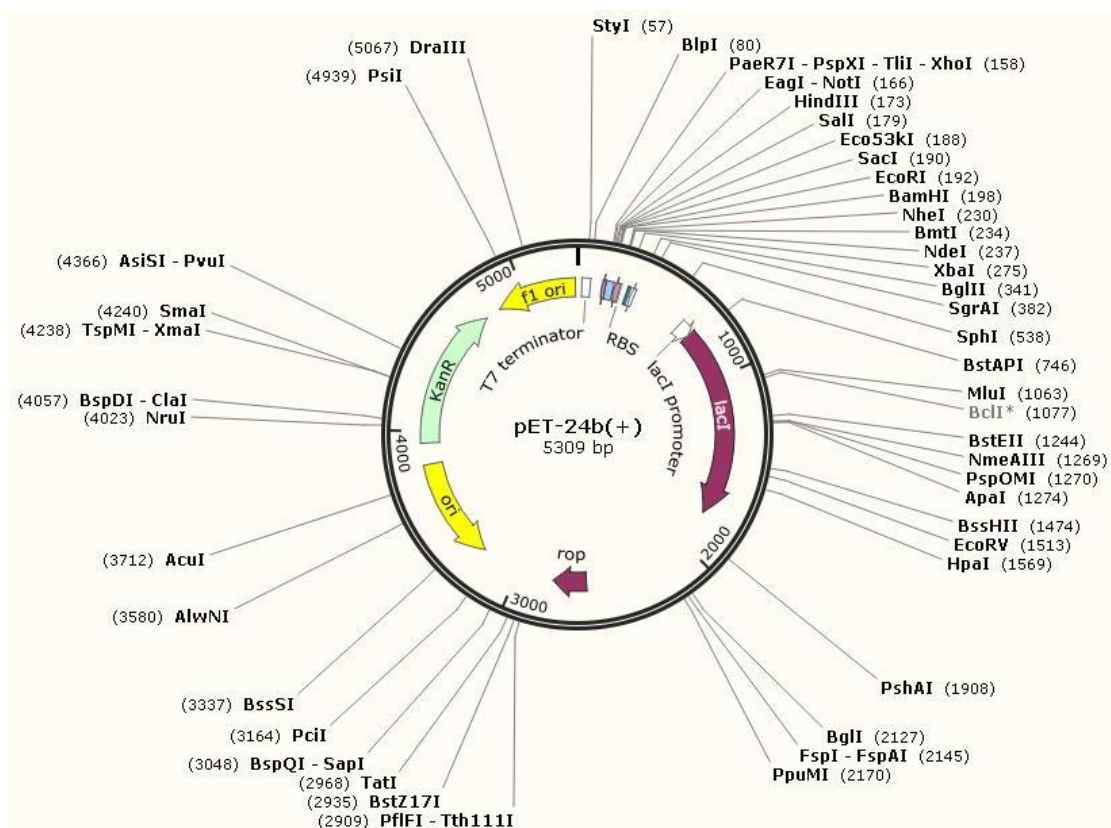


Figura 4 – Mapa do plasmídeo pET24b

A determinação da sequência de nucleotídeos foi feita por sequenciamento automático pela Macrogen (Gasandong, Geumchun-gu, Seoul Korea). Primers universais T7 promotor e terminador foram usados para sequenciar ambas as fitas dos insertos. Os dados contendo as sequências de DNA foram analisados utilizando o software Sequencher (versão 4.1.4, Gene Codes Corporation) e as duas sequências de DNA foram combinadas a fim de obter a sequência completa do gene. Para avaliar se o padrão de mutações foi mantido, as sequências de DNA foram traduzidas e comparadas com a sequência inicial utilizando o programa de alinhamento CLUSTALW (Version 1.81). Após a confirmação, o DNA plasmidial foi transferido para *E. coli* BL21(DE3) por transformação por choque térmico, por ser uma linhagem bacteriana mais recomendada para expressão de proteínas. Um volume apropriado (até 200 µL de amostra por placa) da reação de transformação foi transferido para placas contendo meio LB com antibiótico. Para o controle negativo, foi utilizado água estéril.

As mutações foram identificadas e as enzimas mutantes foram parcialmente caracterizadas. Enquanto a xilanase não mutada apresentou valor de meia-vida ($t_{1/2}$) a 60 °C de 7,9 min, as xilanasas mutantes mais termoestáveis, M3, M5, M6 e M7, apresentaram valores de $t_{1/2}$ de 209,3; 33,2; 400,9 e 15,3 min, respectivamente. Todos os mutantes foram eficientes na hidrólise de xilanas derivadas de *birchwood* e *oat spelt*, que são xilanas com diferentes arranjos estruturais. Assim, as propriedades catalíticas das xilanasas foram preservadas, bem como sua funcionalidade foi aprimorada de acordo com parâmetros industriais (Trevizano, 2009).

Também em trabalhos anteriores do grupo, utilizando as metodologias de modelagem e dinâmica molecular do WT e das enzimas mutantes mais termoestáveis, foi possível a localização dos resíduos alterados pela técnica de *error-prone* PCR, para investigação dos efeitos dessas mutações nas propriedades das xilanasas GH10 (Trevizano *et al.*, 2012). Além disso, uma alça solta de 27 resíduos de aminoácidos na região N-terminal foi identificada. Era uma alça superficial observada nos ensaios de dinâmica molecular e foi decidido que ela seria retirada, a fim de melhorar a termoestabilidade das xilanasas. Desta forma, neste trabalho, utilizamos a antiga WT e uma das mutantes, ambas sem a cauda de aminoácidos.

2.4. Aplicações Biotecnológicas

As endoxilanasas constituem as principais hemicelulases comerciais, atraindo atenção devido ao seu potencial para uso em diversas aplicações (BHAT, 2000). Dentro do grupo das hemicelulases, as xilanasas microbianas (1,4-β-D-xilana xilanohidrolases) são os catalisadores preferidos pela indústria para a hidrólise da xilana por sua alta

especificidade, baixa perda de substrato e baixa geração de resíduos (MICHELIN *et al.*, 2008).

Enzimas microbianas têm um tremendo potencial para diferentes aplicações. Ao longo dos anos, devido às suas características notáveis, enzimas ocuparam o centro de toda a bioquímica e processos industriais. Atualmente, os aditivos químicos estão sendo substituídos pelas enzimas em inúmeras aplicações alimentares. A utilização de enzimas tornou-se uma necessidade do tempo porque promove efeitos semelhantes aos de aditivos químicos, com a vantagem de ser considerado como aditivos naturais seguros (PENSTONE, 1996). Outras vantagens estão relacionadas à alta eficiência de conversão, à ausência de perda de substrato devido às modificações químicas e ao uso de condições de operação físico-químicas mais moderadas e não corrosivas (temperatura de reação mais baixa, pH quase neutro e uso de reagentes biodegradáveis e não-tóxicos), o que torna o processo mais amigável ao meio ambiente (ANDREAUS *et al.*, 2008).

A demanda mundial por enzimas vem crescendo ao longo dos anos. Segundo pesquisas do Freedonia Group (www.fredoniagroup.com), as enzimas de aplicação industrial movimentaram 1,6 bilhões de dólares no ano 2000, 2 bilhões em 2005, atingindo valores acima dos 5 bilhões em 2009. Os estudos ainda indicaram um crescimento de 6,3 % anualmente até 2013, enquanto para 2015, sugere-se um aumento de 6,8 %, atingindo gastos de 8 bilhões de dólares neste ano.

A caracterização das enzimas xilanolíticas é importante para sua aplicação biotecnológica. Um dos fatores determinantes do uso em larga escala de xilanases é, certamente, o custo. Muitos processos industriais podem ser desenvolvidos utilizando os fungos ou outros microrganismos como fontes de enzimas e a eficiência pode, muitas vezes, ser melhorada com o uso de enzimas puras (CHIDI *et al.*, 2008). Nos últimos anos tem havido um progresso considerável na identificação de parâmetros importantes para obtenção de altas concentrações e produtividade de xilanases o que influencia economicamente seu processo de produção (HALTRICH *et al.*, 1996).

Na produção de cerveja, as endoxilanases podem ser empregadas no pré-tratamento da arabinoxilana contidas no substrato, diminuindo a viscosidade da bebida e facilitando o processo de filtração. Em cereais como a cevada, a arabinoxilana é o principal polissacarídeo após o amido, constituindo 4 a 8% das sementes da cevada e representam aproximadamente 25 e 70% dos polissacarídeos da parede celular do endosperma e da aleurona, respectivamente. A arabinoxilana é parcialmente solúvel em água, este polímero na forma hidratada resulta em uma solução aquosa altamente viscosa, o que prejudica o processo de filtração e leva ao escurecimento da cerveja, assim o pré-tratamento com endoxilanases degrada a arabinoxilana e facilita o processo (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002; VAN DER BROECK *et al.*, 1990). A aplicação das

endoxilanasas no processo de clarificação de sucos e vinhos também diminui a presença de polissacarídeos de parede, facilitando o processo de filtração e clarificação (BIELY, 1985; WONG *et al.*, 1988).

Na indústria têxtil, as endoxilanasas podem ser empregadas nos processos de maceração do linho, da juta e do sisal e refinamento de polpas na produção de tecidos como a viscose "rayon". Nestes processos, as enzimas xilanolíticas são empregadas para facilitar a separação das fibras de celulose da matriz celular e a remoção da lignina (MILAGRES *et al.*, 1994).

A principal aplicação das endoxilanasas está na indústria de polpa e papel onde as elevadas temperaturas (55 a 70°C) e pH alcalino requerem enzimas termo-alcalifílicas para um eficiente biobranqueamento (BEG *et al.*, 2001; VIIKARI, 1994). O uso das endoxilanasas, que devem estar livres de celulases nos processos de pré-tratamento da polpa de papel, facilita a extração da lignina por processos químicos convencionais reduzindo em até 34% a quantidade de cloro utilizada (PAICE *et al.*, 1988; VIIKARI, 1991), minimizando o impacto ambiental dos resíduos químicos gerados pelas indústrias papeleiras (CARVALHO, 2008).

As enzimas xilanolíticas podem ser empregadas na sacarificação da hemicelulose para otimizar a utilização da biomassa vegetal, particularmente de resíduos agroindustriais. Resíduos lignocelulósicos, tais como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, bagaço de laranja, palha de cereal e serragem constituem-se em materiais para a sacarificação e fermentação industrial. Para a agroindústria é de interesse aumentar o valor protéico desses resíduos quando utilizados como ração animal, pois a hidrólise parcial da xilana melhora a acessibilidade da celulose para a digestão realizada pelos animais ruminantes, aumentando o valor nutritivo da ração e agregando valor à matéria (DEKKER *et al.*, 1976; WONG *et al.*, 1988). Além disso, o hidrolisado obtido pode ser fermentado por leveduras e utilizado na obtenção de produtos de alto valor agregado, tais como xilitol e bioetanol (CARVALHO, 2008).

Outras aplicações menos documentadas incluem: fermentação da cerveja (TIKHOMIROV *et al.*, 2003); na extração de café e na preparação de café solúvel (WONG *et al.*, 1988); em detergentes (KAMAL KUMAR *et al.*, 2004); na produção de polissacarídeos farmacologicamente ativos para uso como agentes antimicrobianos (RYTTERSGAARD *et al.*, 2002) ou antioxidantes (KATAPODIS *et al.*, 2003). As endoxilanasas são frequentemente utilizadas sozinhas, mas podem também ser empregadas em conjunto com outras enzimas, em particular com outras hidrolases.

2.4.1. Aplicações de xilanases na panificação e na clarificação de sucos

As endoxilanases também podem ser aplicadas no preparo do pão, onde tornam a massa mais macia e solta, aumentando significativamente o volume do pão (SUBRAMANIYAN *et al.*, 2002). A xilanase hidrolisa arabinoxilanas internamente no grão do cereal, o que tem um profundo impacto na sua funcionalidade. Esta enzima é capaz de melhorar as propriedades reológicas da massa durante a panificação e facilitar seu processamento, diminuindo a retenção de gás e retardando a retrogradação do amido (BIELY, 1985). Na separação industrial do amido e do glúten do trigo, a arabinoxilana interfere com eficiência na coagulação do glúten (WEEGELS *et al.*, 1992; COURTIN *et al.*, 2002).

As xilanases têm sido largamente utilizadas na panificação. Em dosagens adequadas, pode melhorar a maquinabilidade e estabilidade da massa, estrutura do miolo e vida útil do pão (HAMMES *et al.*, 1995; POUTANEM, 1997). Schoenlechner *et al.* (2013) estudaram a otimização da qualidade do pão produzido por farinha e painço pela adição de emulsificantes, xilanase e transglutaminase. Enquanto a xilanase promoveu um efeito de maciez no miolo, isto foi adversamente afetado pela ação da transglutaminase, que estruturou o poro do miolo e ambas as enzimas aumentaram o volume do pão.

Ghoshal *et al.* (2013) avaliaram o efeito da xilanase nos atributos de qualidade de pão integral. A incorporação da enzima resultou numa menor absorção de água na preparação da massa, aumento do volume específico, aumento da vida de prateleira, diminuição da firmeza durante o armazenamento, além de uma cor mais brilhante. Segundo os autores, a suplementação com a xilanase resultou em melhorias nos atributos sensoriais do pão.

Driss *et al.* (2013) estudaram a ação da xilanase GH11 de *Penicillium occitans* Pol6 como melhorador de pão, testado em farinha de trigo integral. Os efeitos da adição da enzima na fase de fermentação e na final proporcionaram um notável decréscimo na absorção de água (8 %), aumento na massa crescente (36,8 %), melhoria no volume específico (34,9 %) e melhor sabor, gosto, maciez e aceitação global. Quanto às análises reológicas, a firmeza foi reduzida em mais de duas vezes e melhorias na coesão e elasticidade também foram observadas.

Dependendo do tipo de produto final desejado, o suco requer uma etapa de clarificação. A utilização de preparados enzimáticos específicos que atuam sobre as fibras e pectinas tem sido cada vez mais difundida, pois o tratamento enzimático hidrolisa a pectina e celulose, reduzindo a viscosidade e turbidez do suco, que é em função de alguns constituintes do mesmo (AGOSTINI, 2011; VARNAM *et al.*, 1994).

Para a obtenção de suco clarificado tem sido proposto o emprego de associações de enzimas clarificantes procedentes de diferentes fabricantes, em diversas concentrações, associados a tratamento térmico sob condições variadas de tempo e temperatura de hidrólise (NOVO DISK, 2001).

O processo bioquímico de clarificação inclui o tratamento enzimático de despectinização e o acabamento que consiste na retirada dos compostos que deixam a aparência do suco afetada. As enzimas são adicionais com o objetivo de quebrar parcial ou totalmente as partículas insolúveis que são as responsáveis pela turbidez do suco (AGOSTINI, 2011).

Comercialmente, existem vários preparados enzimáticos para o processamento de frutas, sendo que a maioria destes produtos contém pectinases, celulasas e hemicelulasas em várias proporções (SPAGNA *et al.*, 1994). A utilização de complexos enzimáticos comerciais no processamento de sucos de diversas frutas tem sido eficaz, aumentando seu rendimento, reduzindo sua viscosidade e clarificando-os, mas, também, podendo afetar sensorialmente o produto, diferenciando, desta forma, da fruta *in natura* (LUH, 1980; ASHURTS, 1995; BRASIL *et al.*, 1996; CORRÊA NETO, 1999; BRASIL, 2003).

Diversos estudos reportam o uso de preparados enzimáticos para fabricação de sucos, como o de oxicoco "cranberry" (WIGHTMAN *et al.*, 1996), maçã (ALVAREZ *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006), pêra (TANRIOVEN *et al.*, 2005), sapoti (SIN *et al.*, 2006), banana (LEE *et al.*, 2006), carambola (LIEW ABDULLAH *et al.*, 2007), cereja e romã (OZKAN, 2002), groselha preta (LANDBO *et al.*, 2004), sabugueiro (LANDBO *et al.*, 2007) e uva (SREENATH *et al.*, 1992).

Nagar *et al.* (2012) fizeram a clarificação de sucos de maçã, abacaxi e tomate usando uma xilanase purificada de *Bacillus pumilus* SV-85S. A caracterização enzimática mostrou que a enzima é termotolerante e estável em pH alcalino. O tratamento enzimático promoveu um aumento no rendimento dos sucos, da ordem de 23,53 % para maçã, 10,78 % para abacaxi e de 20,78 % para o tomate, bem como teve um efeito significativo na claridade do suco por um aumento na transmitância de 22,2, 19,8 e 14,3 %, respectivamente. A turbidez e a viscosidade diminuíram sem afetar as características do sistema significativamente.

As principais análises realizadas para verificação da clarificação de sucos compreendem mudança na claridade (medida pelo valor de absorbância a 660 nm), variação nos parâmetros de cor (sistema CIEL*a*b*) e no teor de sólidos solúveis (brix ou SST).

O sistema CIE-L*a*b*, que inclui um espectrofotômetro de reflexão no visível, foi desenvolvido pela Comissão International d'Eclairage - CIE para, rapidamente, controlar

a qualidade e reproduzir a coloração de produtos industrializados. Permite especificar a percepção (impressão física) das cores em termos de um espaço tridimensional: a axial L^* é conhecida como luminosidade, que se estende de 0 (preto) a 100 (branco), e as outras duas coordenadas a^* e b^* representam o eixo vermelho-verde e amarelo-azul, respectivamente. Desse modo, cada cor é o resultado da mistura de outras três cores (HON, 2001).

A partir destes valores primários, obtêm-se outros parâmetros de grande utilização. O Chroma ou saturação (c) é a força da cor, a qualidade pela qual se distingue uma cor fraca de uma forte; é a intensidade da cor. Uma cor saturada seria aquela na qual não entra nem o branco e nem o preto e que está, exatamente, dentro do comprimento de onda que lhe corresponde no espectro solar. Já a tonalidade (h) é o que normalmente chamamos de cor, englobando as cores primárias (vermelho, amarelo e azul) e as compostas e está, diretamente, relacionada aos vários comprimentos de onda (FRINHANI, 2003).

Dentre os trabalhos que utilizaram o sistema CIEL^{*}a^{*}b^{*} para avaliar coloração de bebidas, Prati e colaboradores (2005) fizeram a elaboração de uma bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas e verificaram que a amostra com suco de maracujá tendeu às cores amarela e vermelha e que a testemunha (garapa clarificada sem suco) apresentou maior L e, por tanto, foi a mais clara.

Borges et al (2011) avaliaram a estabilidade físico-química de suco de abacaxi 'pérola'. Neste trabalho, o parâmetro L^* variou significativamente ao longo do armazenamento e em função da interação entre a temperatura e a luminosidade. Os autores perceberam que houve tendência de escurecimento do suco com a redução da luminosidade (L^*) ao longo do armazenamento e que o suco armazenado sob refrigeração e não ausência de luz também se manteve mais claro. A tonalidade (h) aumentou ao longo do armazenamento, demonstrando que o suco tendeu a ficar mais amarelado, enquanto em temperatura ambiente, os valores foram significativamente superiores, indicando que houve preservação das características iniciais da cor do suco na geladeira. A cromaticidade, por sua vez, aumentou na ausência de luz e sob alta temperatura, demonstrando que a presença de luz por si só não afetou de forma relevante a intensidade da cor do suco.

Karangwa e demais (2010) fizeram a otimização de parâmetros de processamento para clarificação enzimática utilizando Pectinex Ultra SP-L de um suco de laranja com cenoura e estudaram variações na claridade (A_{660}) e nos valores de L^* , a^* , e b^* no processamento. O efeito linear da claridade foi significativamente afetado pela temperatura, pH, concentração de enzima e tempo. Para otimização em si, o autor

considerou a menor claridade a 660 nm, menor turbidez e menor viscosidade e as condições que melhor se adequaram foram de 0,06 % de enzima, pH 3,6, 49 °C e 91 minutos de reação.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar duas xilanases recombinantes derivadas do gene *xynA* de *Orpinomyces* PC-2 e expressas em *Escherichia coli* e avaliar a aplicação destas enzimas na indústria de alimentos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Produzir, purificar e caracterizar duas endoxilanases recombinantes
 - Estabelecer as condições ótimas para produção das enzimas;
 - Purificar as enzimas por técnicas cromatográficas;
 - Caracterizar cinética e bioquimicamente as enzimas.

- ✓ Aplicar as endoxilanases na hidrólise de farinha de trigo integral
 - Determinar as condições ótimas para aplicação das xilanases para a hidrólise da xilana de trigo;
 - Conduzir ensaios de hidrólise da xilana de trigo utilizando as xilanases e avaliar a liberação de xilose em HPLC.

- ✓ Aplicar as endoxilanases na clarificação de suco de maçã
 - Conduzir ensaios de hidrólise da xilana do suco de maçã e avaliar a liberação de xilose em HPLC;
 - Avaliar a alteração da claridade, pH e cor do suco com o tempo de hidrólise.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

A xilana oat spelt foi comprada da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), arabinoxilana da Megazyme (Bray, Ireland), farinha de trigo integral marca Alimentos Nutri Mais, maçãs *Fuji* compradas no mercado de Viçosa-MG no dia 08/01/2014.

4.2. Produção (superexpressão) de xilanases

As colônias de xilanase mutada (XM) - com as alterações de uma alanina por uma treonina na posição 226 e de uma valina por uma alanina na posição 135 - e a não mutada (XNM) foram cultivadas em 5 mL de caldo LB (triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1 %) contendo o antibiótico canamicina (100 µg/mL), incubados a 37 °C, 180 rpm, overnight. Logo em seguida, 1 mL desta cultura foi inoculado em 40 mL de LB/kan (100 µg/mL), incubados a 37 °C, 250 rpm, overnight. Estes 40 mL foram transferidos para 1 L de SOB (triptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,05 %, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 0,01 M e NaOH 0,5 mM) e Kanamicina (100 µL /mL), agitados a 37 °C, 250 rpm até a densidade óptica a 600 nm atingir aproximadamente 1,0. Foi adicionado 10 mL de isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 100 mM, mantido em shaker a 37 °C/250rpm/4h. As culturas foram colocadas em gelo por 20 a 30 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 2500 g/4 °C/30 min. O pellet foi ressuspensão em 25 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,5. As células foram sonicadas com amplitude 20, por 5 minutos, com tempo de pulso e de parada de 10 segundos, a 13 °C. Finalmente, foi feita uma centrifugação a 2500 g/4 °C/20 min.

4.3. Purificação

O sobrenadante foi equilibrado com tampão borato de sódio 25 mM pH 8,5, na proporção de 3 mL de amostra para 5 mL de tampão e submetido a cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose em sistema de FPLC. A proteína foi eluída com gradiente de cloreto de sódio 1 M no mesmo tampão, com fluxo de 4 mL/minuto. As frações que apresentaram atividade de xilanase foram coletadas, concentradas e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE. A concentração de proteína foi determinada. Estas técnicas serão descritas a seguir.

4.4. Eletroforese SDS-PAGE

O pool de frações concentradas e o extrato bruto foram separados em eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12 % para se verificar o perfil de expressão e pureza das mesmas, de acordo com Laemmli (1970).

A eletroforese contendo SDS e β -mercaptoetanol utilizou dois géis preparados a partir da mistura de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8 (para o gel separador) e tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 6,8 (para o gel empilhador), persulfato de amônio 10 % (p/v), N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). As corridas foram realizadas a temperatura ambiente, a 85 V, em placas do Sistema Mini-Gel. As amostras foram, anteriormente, adicionadas ao tampão desnaturante (1,2 mL de Tris/HCl pH 6,8, 2 mL de SDS 10 %, 1 mL de glicerol e 0,5 mL de azul de bromofenol 0,5 %) (LAEMMLI, 1970).

As proteínas isoladas foram visualizadas pela coloração com Coomassie brilhante blue R-250.

A massa molecular das enzimas foi determinada a partir de uma curva padrão correlacionando os valores de log das massas moleculares das proteínas padrão e a distância em cm, percorrida no gel.

4.5. Ensaio enzimático

O sobrenadante foi usado para o ensaio enzimático para testar a atividade, efeito de temperatura e pH, termoestabilidade e estabilidade em pH para ambas enzimas, que foram analisadas em triplicata.

A atividade da xilanase foi determinada pela medida da relação de açúcares redutores liberados pela xilana usando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller, 1959. A atividade xilanolítica foi ensaiada usando xilana oat spelt e arabinoxilana como substratos, preparadas anteriormente em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,5. A mistura reativa contendo as amostras de enzima e substrato foi incubada a 40 °C por 15 minutos. Após incubação, 0,5 mL de DNS foi adicionado a mistura reativa, mantido, posteriormente, por 5 minutos em banho fervente. A absorbância foi medida a 540 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. A absorbância foi convertida a μ mol de açúcar redutor produzido, usando a curva padrão gerada com xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, a 40 °C.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e os desvios das médias foram sempre inferiores a 10 %.

4.6. Especificidade ao substrato

A especificidade ao substrato para xilanase foi avaliada usando xilana oat spelt e arabinoxilana. O ensaio enzimático foi realizado em condições ótimas (40 °C/15 min/ pH 6,5) usando a concentração final de substrato de 1 e 0,25 %, respectivamente.

4.7. Quantificação de proteína

O conteúdo de proteínas foi quantificado usando-se o método de leitura direta a 280 nm em espectrofotômetro Thermo Scientific Multiscan Go utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

A concentração da proteína foi calculada segundo a equação de Lambert-Beer onde $A = \epsilon \times c \times l$, com A sendo a absorvância a 280 nm, ϵ o coeficiente de extinção molar em $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c a concentração em M e l o caminho óptico da cubeta em centímetros.

O ϵ teórico de xilanases é de $61880,0 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Após obter a concentração molar, a concentração em mg/mL foi obtida dividindo-se esse valor pela massa molecular das xilanases que é de 25129,8 g/mol e de 25131,8 g/mol para XNM e XM, respectivamente.

4.8. Efeito de pH, temperatura, estabilidade em pH, termoestabilidade e meia vida

O efeito da temperatura na atividade xilanólítica foi medido em várias temperaturas (de 20–80 °C), em pH 6,5, de acordo com o método padrão descrito anteriormente. Arabinoxilana foi usada como substrato para caracterização enzimática.

Para monitorar a estabilidade térmica, amostras de sobrenadante foram pré-incubadas a 50 e 60 °C e alíquotas foram removidas a intervalos determinados de tempo, mantidos em gelo antes de serem ensaiados para determinar a atividade enzimática residual, usando o ensaio padrão. Para determinar a porcentagem de atividade residual após o tratamento com calor, as atividades das amostras sem pré-incubação foram consideradas como 100 % e as atividades das amostras foram expressas como porcentagens da amostra não tratada. O tempo de meia-vida foi determinado utilizando o programa Curve Expert, a partir do ajuste de uma equação exponencial decadente, do tipo $t = a.e^{-b.x}$.

O perfil de pH foi determinado a 40 °C, de 3 a 11, com incremento de 0,5, usando diferentes tampões McIlvaine. Para analisar o efeito do pH na atividade da xilanase, a amostra enzimática foi diluída no tampão específico para cada pH, sendo que a atividade das enzimas tratadas foi medida pelo ensaio padrão.

Para investigar a estabilidade ao pH, as amostras de enzima foram pré-incubadas em diferentes tampões de pH 3 a 11, a 4 °C por 1h. Frações foram coletadas e a atividade residual das enzimas tratadas foi medida pelo ensaio padrão.

4.9. Caracterização cinética

Os valores da constante de Michaelis-Menten (K_M) para a hidrólise do substrato foram calculados pelo ajuste dos dados numa curva não-linear, pelo programa Curve Expert 1.4. As concentrações da arabinosilana usadas para determinação variaram de 0,05 a 1,25 %.

A energia de ativação (E_a) foi determinada pela plotagem da curva de Arrhenius, baseada na expressão $k=Ae^{(-E_a/RT)}$, onde k é a constante de reação, A é o fator pré-exponencial, R é a constante universal dos gases (8,3144 J/K.mol), T a temperatura absoluta e E_a é a energia de ativação. O valor de E_a foi determinado pela medida da velocidade máxima, V , em diferentes temperaturas (20-55 °C) e plotado em um gráfico de $\log_{10}V$ por $1/T$. A inclinação da curva fornece o valor de E_a em kJ/mol.

O valor de K_{cat} foi calculado pelo mesmo experimento, através da equação $k_{cat} = V_{max}/[E]$, onde E corresponde ao valor de proteína total do extrato e a constante de eficiência catalítica $K = k_{cat}/K_M$.

4.10. Efeito de íons e outros compostos

Para determinar o efeito de diferentes íons e reagentes químicos na atividade enzimática da xilanase, 2 mM de vários compostos foram acrescentados no sistema reativo individualmente. O sistema sem nenhum aditivo foi usado como controle. Os efetores avaliados foram β -mercaptoetanol, cloreto de cálcio, cloreto de cobre, ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), cloreto de mercúrio, cloreto de magnésio, cloreto de manganês, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), e cloreto de zinco.

4.11. Análise da hidrólise de farinha de trigo integral

Xilanase purificada (50 U/g farinha para XNM e 20U para XM) foi incubada com farinha de trigo integral 10 % em água (p/v) a 27 e a 50 °C, 100 rpm, por 6 horas. Após a incubação, a mistura reativa foi centrifugada a 16000g por 5 minutos. O sobrenadante foi submetido a análises de cromatografia líquida (HPLC) com a coluna HPX-87P (para análise de carboidratos) mantida a 80 °C, fase móvel água, fluxo de 0,6 mL/min e volume de amostra injetado de 30 μ L para quantificação da xilose liberada no ensaio. O experimento foi conduzido com duas repetições para CN (controle negativo), XNM e XM.

4.12. Clarificação enzimática do suco de maçã

A metodologia seguiu o fluxograma abaixo (Figura 5).

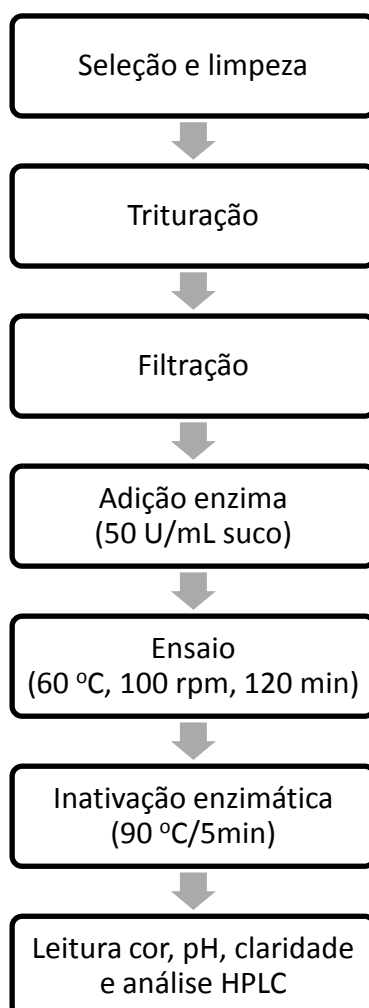


Figura 5 – Metodologia clarificação enzimática

A cor foi medida em colorímetro CIELAB para obtenção dos parâmetros L^* , a^* e b^* , a partir dos quais foram obtidos os valores de croma ($c = \sqrt{a^2 + b^2}$) e ângulo de tonalidade ($h = \arctg(b/a)$), com iluminante D_{65} e ângulo do observador de 10° (McGRUIRE, 1992). O pH foi medido em pHmetro segundo metodologia da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C, 1997) e a claridade em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm, utilizando-se água destilada como branco, de acordo com a metodologia de Karangwa et al (2010) adaptada. As análises de HPLC seguiram a mesma metodologia referenciada no item anterior.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção, purificação e atividade enzimática

As xilanases expressas em *E. coli* foram obtidas nas condições especificadas no item 4.2 e foram então submetidas ao processo de purificação descrito no item 4.3. O resumo da etapa de purificação das xilanases e a atividade com dois substratos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Tabela de Purificação das xilanases

Etapa	Atividade (U mL ⁻¹)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. Específica (U mg ⁻¹)	Fator de purificação
XNM				
Extrato bruto (os)	43862	6,60	6646	1,00
Troca iônica (os)	11335	1,40	8096	1,22
Extrato bruto (ax)	50093	6,60	7590	1,00
Troca iônica (ax)	17982	1,40	12844	1,69
XM				
Extrato bruto (os)	40015	5,33	7507	1,00
Troca iônica (os)	14997	1,94	7730	1,03
Extrato bruto (ax)	49080	5,33	9208	1,00
Troca iônica (ax)	20940	1,94	10794	1,17

Onde os = oat spelt 1% em água e ax=arabinoxilana 0,25 %em tampão Na₂PO₄ 100 mM pH 6,5.

Os valores de atividade específica das xilanases no extrato bruto variaram de 6646 U mg⁻¹ a 9208 U mg⁻¹. Os altos valores de atividade específica encontrados indicam que a super expressão das enzimas em *E. coli* foi eficiente e que estas enzimas se apresentavam de forma solúvel e ativa.

As enzimas foram purificadas em apenas uma etapa cromatográfica, utilizando coluna Q Sepharose. Nessa cromatografia de troca iônica a enzima não aderiu à resina e foi eluída nas primeiras frações coletadas. Uma vez que a enzima foi super expressa e representava a maior parte das proteínas presentes no extrato bruto, após a etapa cromatográfica, o fator de purificação, como esperado, teve apenas um pequeno acréscimo, e variou de 1,03 a 1,69. Esses dados indicam que esta etapa de purificação foi capaz de promover a retirada das proteínas contaminantes, mantendo as xilanases ativas.

Os dados de atividade determinados neste trabalho são muito superiores aos encontrados na literatura. Deesukon et al (2013) fizeram a purificação e caracterização de uma endo-β-1,4-xilanase GH11 de *Streptomyces* sp. SWU10 termotolerante e sua superexpressão em *Pichia pastoris* KM71H. A atividade específica da enzima nativa após três passos de purificação atingiu 13,3 U mg⁻¹ e para a recombinante, com apenas uma etapa de purificação, 77,4 U mg⁻¹, ambas ensaiadas com oat spelt a 37 °C.

Como mostrado na Tabela 1, as xilanases mutada e não mutada apresentaram maior atividade contra o substrato arabinosilana de trigo (9208 e 7590 U mg^{-1}) comparada ao substrato oat spelt (7507 e 6646 U mg^{-1}).

Gong et al (2013) destacam uma estranha preferência da xilanase de rúmen bovino por xilana oat spelt, que exibiram atividade específica de $247,5 \pm 4,5$ U mg^{-1} . Song e colaboradores (2013), que fizeram a expressão heteróloga de uma endo-1,4- β -xilanase A de *Schizophyllum commune* em *Pichia pastoris* encontraram a atividade específica contra arabinosilana de $316,32 \pm 32,904$ U mg^{-1} . Já Zhao et al. (2013) obtiveram valores de atividade específica da xilanase recombinante Xyn-b39, tanto para oat spelt quanto para arabinosilana de trigo de $55,09 \pm 1,51$ e $67,00 \pm 2,06$ U mg^{-1} , respectivamente.

Os dados encontrados no presente trabalho confirmam a superioridade das xilanases produzidas, especialmente no que se refere à alta atividade contra diferentes tipos de xilana. A maior afinidade das enzimas contra arabinosilana de trigo sugere que estas xilanases poderiam ter uma potencial aplicação na indústria de alimentos, para o processamento de farinha de trigo contendo xilana.

5.2. Determinação do grau de pureza e da massa molecular

Para confirmar a purificação das xilanases tanto o extrato bruto quanto a fração purificada foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %, sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). O perfil de migração das proteínas presentes nessa amostra está apresentado na Figura 6.

Apesar de compreender apenas uma etapa de purificação, esta foi suficiente para promover aumento eficiente da pureza das amostras, uma vez que foi observada uma diminuição expressiva do número de bandas protéicas na fração proveniente da troca iônica em comparação com a fração do extrato bruto, para ambas as enzimas. Este resultado confirma os dados obtidos na Tabela 1.

A massa molecular estimada destas xilanases foi de $25,4$ kDa, conforme estimado pela Figura 7, o que está de acordo com os valores calculados de $25,1298$ para XNM e $25,1318$ kDa para XM pelo programa ProtParam.

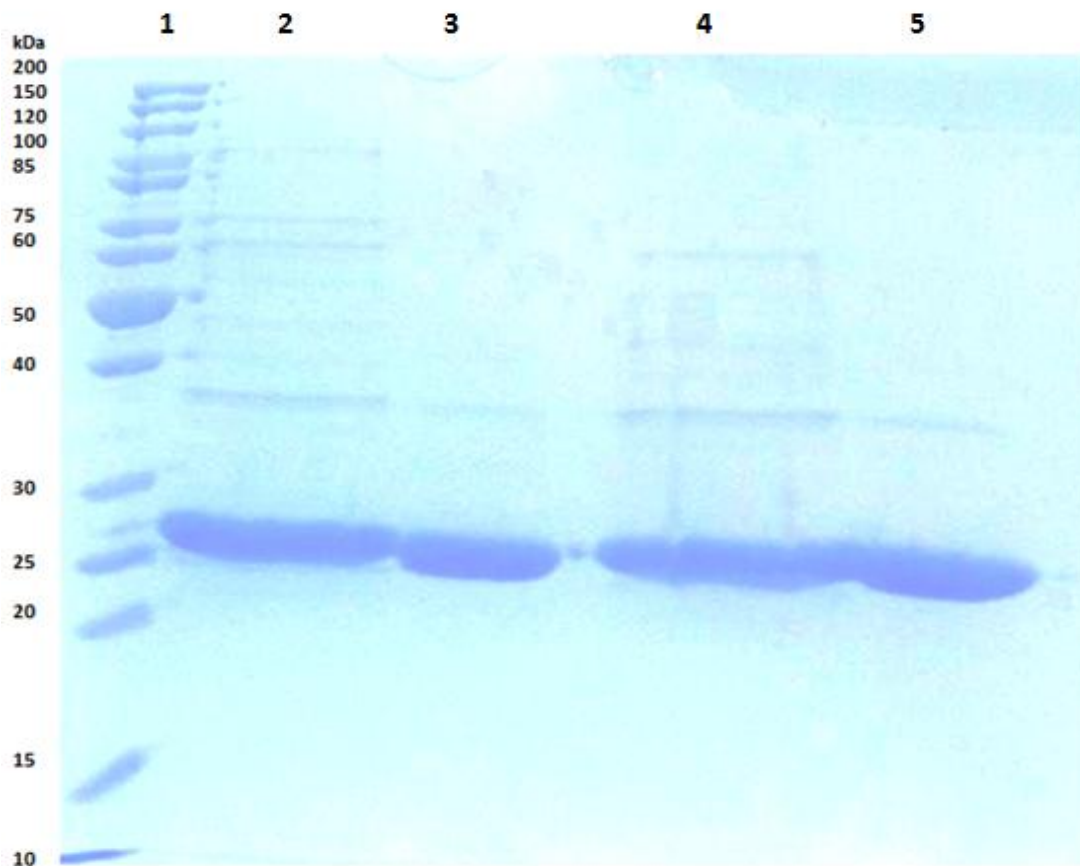


Figura 6 - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12 %) das frações protéicas contendo as xilanases presentes no extrato bruto e após a cromatografia de troca iônica. O gel foi corado com Coomassie blue. 1) Marcador de peso molecular. 2) Extrato bruto da xilanase não mutada - 60 µg ptn. 3) Troca iônica da xilanase não mutada - 28 µg ptn. 4) Extrato bruto da xilanase mutada - 48 µg ptn. 5) Troca iônica da xilanase mutada - 37,5 µg ptn.

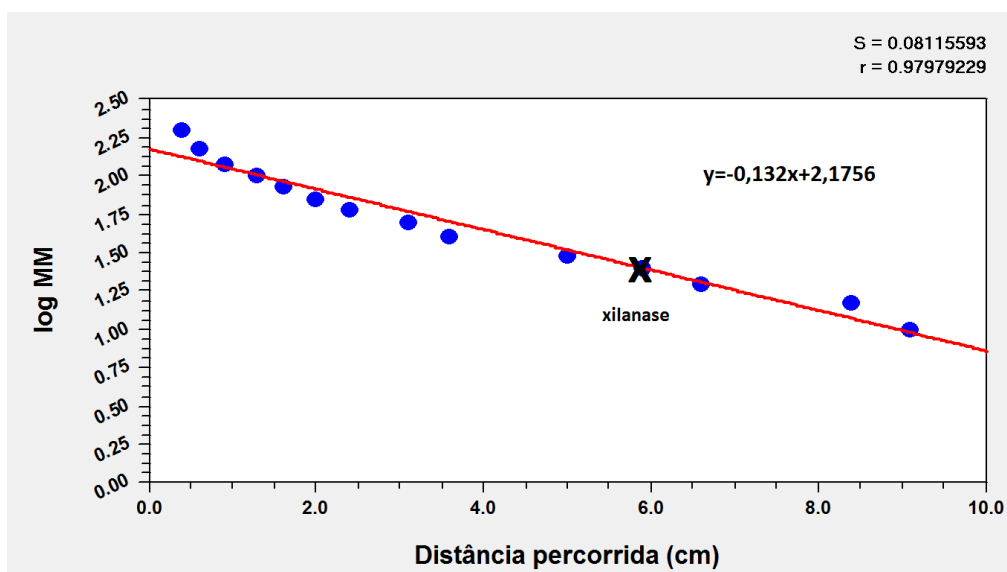


Figura 7 - Estimativa das massas moleculares das xilanases. Os coeficientes para as regressões foram calculados utilizando o programa Curve Expert.

5.3. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade das xilanases foi realizado conforme descrito no item 4.8. Foi observado que para XNM, a atividade em pH 3 foi em torno de 40 % e aumentou continuamente até o pH 5, no qual foi observada maior atividade. A partir deste ponto, houve queda discreta da atividade até o pH 7, mantendo sua atividade em aproximadamente 80 %. Em valores de pH superiores a 7, houve queda brusca e considerável da atividade e esta atingiu valor nulo nos valores de pH entre 8,5 a 11.

Para a XM, no entanto, foi observada a atividade máxima em pH 3, sendo que a enzima manteve mais de 60 % de sua atividade até o pH 8, a partir do qual foi detectada uma queda mais acentuada da atividade, atingindo a nulidade em pH 10 (Figura 8). Estes dados mostram que o efeito das mutações foi essencial na ampliação da faixa de pH de atividade da XM em relação a XNM, contra a arabinoxilana de trigo. Enzimas que atuam em ampla faixa de pH são desejáveis do ponto de vista industrial, visto que diferentes processos podem ocorrer com variações de pH.

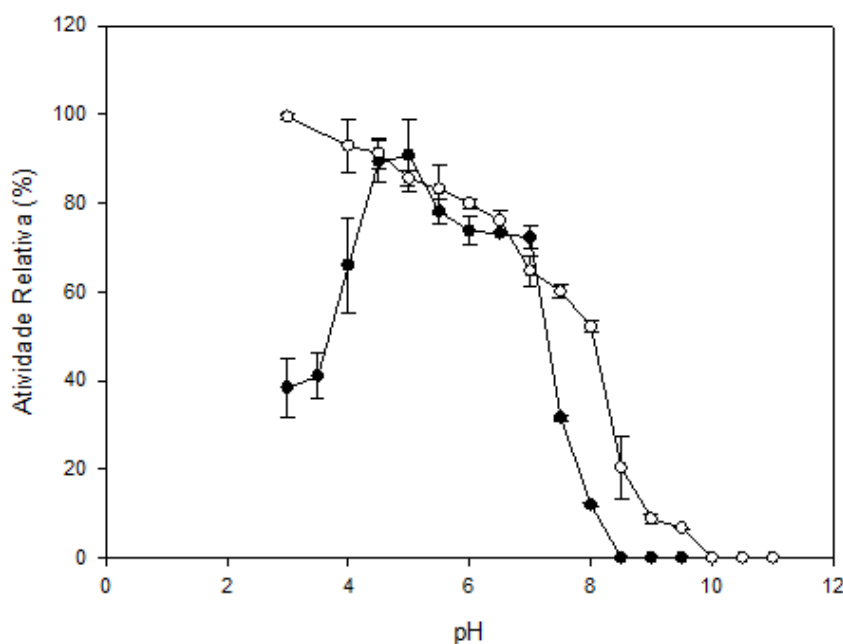


Figura 8 – Efeito do pH na atividade das xilanases mutada (○) e não mutada (●) com o substrato arabinoxilana de trigo.

Para a xilanase estudada por Gong et al (2013), a enzima exibiu máxima atividade quando incubada em uma faixa de pH entre 5,5 e 8,5, o que mostra um comportamento semelhante ao observado nas enzimas deste trabalho. Iniesta-Gonzalez et al (2013) observaram que uma endoxilanase de mamão sofre influência muito grande do pH na atividade e seu ponto ótimo ocorreu em pH 5,5 e para valores menores de 5 e maiores que 6, a atividade declinou drasticamente para menos que a metade.

Du et al (2013) também observaram que o pH ótimo de xilanases termoestáveis de *Humicola insolens* Y1 foi de 6 (para XynW, XynA e XynC) e 7 (para XynB). Mais de 75 % da atividade máxima ficou compreendida entre os pHs 5 a 8, sendo que apenas a XynA mostrou comportamento alcalino-tolerante, exibindo quase 70 % de atividade em pH 9 e aproximadamente 30 % em pH 10. Cai et al (2011) e Collins et al (2005) sugeriram que a maioria das xilanases fúngicas têm atividade ótima em pH ácido e perdem suas atividades em valores de pH maiores que 9.

Para a xilanase de *Penicillium funiculosum*, estudada por Lafond et al (2011), o pH ótimo compreendeu apenas os valores de 4,0-5,5.

Junpei et al (2013) mostraram que uma endoxilanase de *Humicola* sp. Ly01 apresentou atividade ótima em pH 6 e reteve mais de 75 % da atividade entre pH 5 e 7, mas valores próximos a 15 % para pH 2 e 9.

Verma et al (2013) estudaram uma xilanase estável em pH alcalino e termoestável, que apresentou ampla atividade entre pH 6 e 12, com valor ótimo em 9, com mais de 55 % de atividade residual em pH 10.

A xilanase termoestável de *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 estudada por Anand et al (2013) se apresentou estável entre pH 5 e 8, com mais de 40 % de atividade relativa e ponto ótimo em 7,5.

A estabilidade das xilanases após incubação por 1 hora em diferentes valores de pH foi realizada de acordo com o item 4.8. As atividades residuais são mostradas na Figura 9.

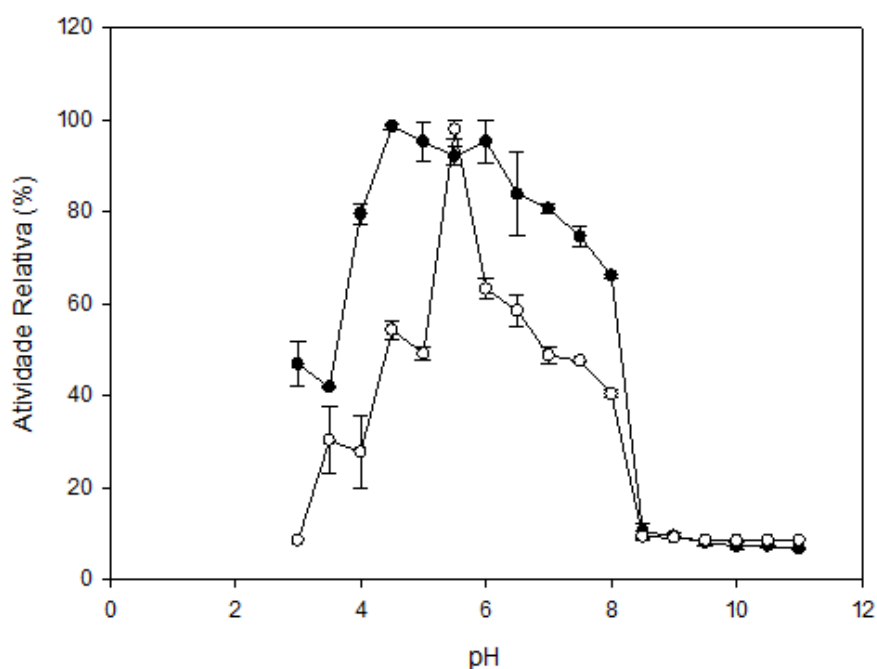


Figura 9 – Efeito do pH na estabilidade da xilanase mutada (○) e não mutada (●) com o substrato arabinoxilana de trigo.

A xilanase não mutada exibiu maior estabilidade em uma faixa mais ampla de pH, quando comparada a xilanase mutada.

Por ser uma enzima alcalino-resistente, a xilanase estudada por Wang et al (2012) mostrou ampla adaptabilidade ao pH, exibindo atividade superior a 35 % entre os valores de pH de 5 a 11.

Para a xilanase de *Glaciecola mesophila* KMM241, Guo et al (2013), mostraram que as maiores atividades ocorreram em pH 6 e 7, mas a enzima se mostrou estável entre os valores de 6 a 10, retendo mais de 80 % de sua atividade após a incubação por 1 hora nos respectivos valores de pH.

5.4. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade das xilanases foi avaliado como descrito no item 4.8. De acordo com a Figura 10, XNM e XM exibiram perfil idêntico de atividade quando ensaiadas em uma faixa de temperatura entre 30 e 80 °C. A atividade destas enzimas aumentou com a elevação da temperatura de 30 para 50 °C, e atingiu atividade máxima em 60 °C. A atividade reduziu bruscamente em 70 e 80 °C .

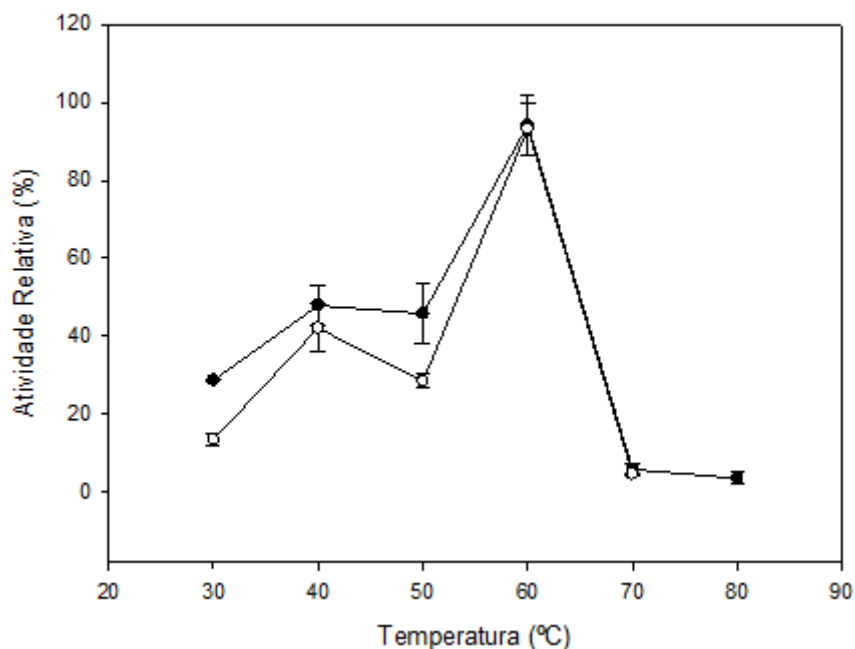


Figura 10 – Efeito da temperatura na atividade das xilanases mutada (○) e não mutada (●) com o substrato arabinoxilana de trigo.

Segundo Polizeli et al (2005), em geral, as endoxilanases apresentam pico de atividade entre as temperaturas de 40 a 80 °C.

A termoestabilidade das xilanases foi avaliada após pré-incubação das enzimas nas temperaturas de 50 e 60 °C, como descrito no item 3.8. A enzima mutada apresentou maior estabilidade em ambos os casos. Em 50 °C, a XNM reteve cerca de 30 % de sua atividade inicial após as 6 horas de incubação, enquanto a XM apresentou cerca de 50 % (Figura 11). A 60 °C, XNM apresentou em torno de 20 % da atividade ao longo dos 90 minutos de ensaio e XM mostrou valores aproximados a 50 % (Figura 12).

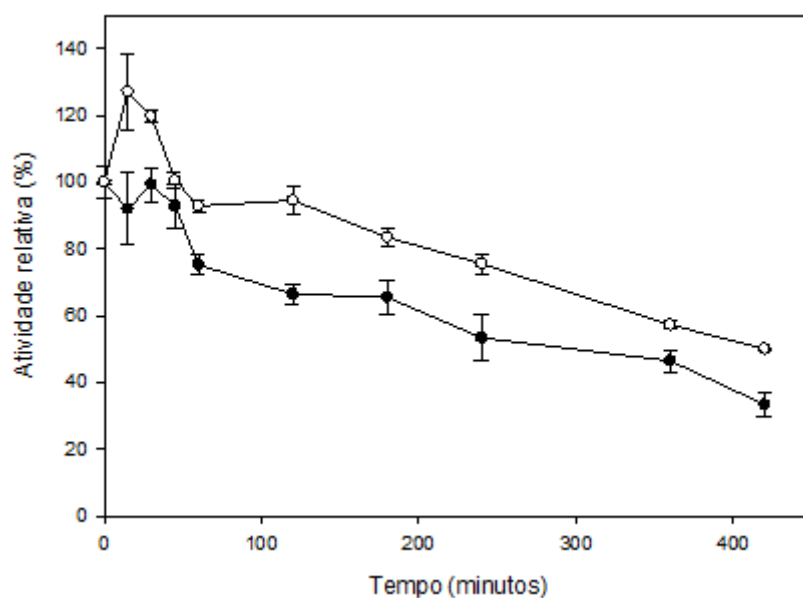


Figura 11 – Termoestabilidade a 50 °C das xilanases mutada (○) e não mutada (●) com o substrato arabinxilana de trigo.

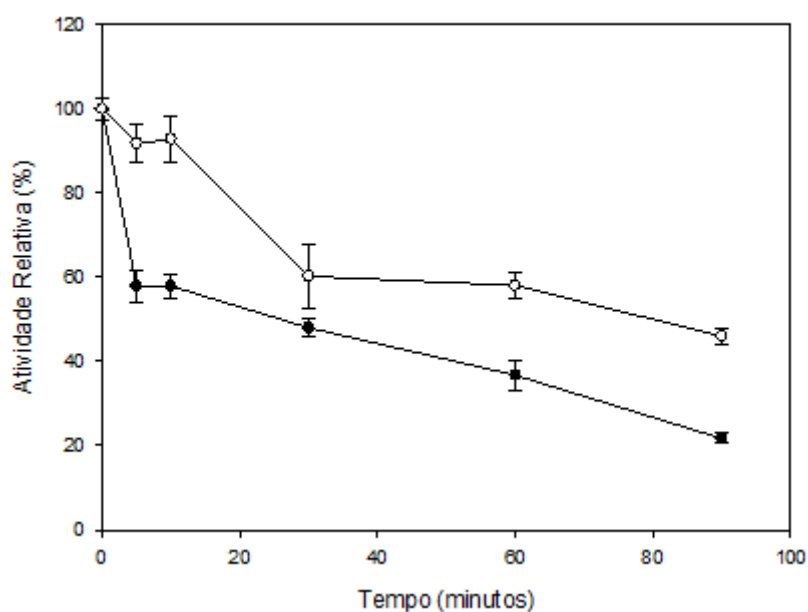


Figura 12 – Termoestabilidade a 60 °C das xilanases mutada (○) e não mutada (●) com o substrato arabinxilana de trigo.

A enzima mutante XM mostrou maior estabilidade em relação à não mutada em ambas as temperaturas testadas. Este resultado corrobora com a proposta de alteração estrutural da mesma para atingir maior estabilidade térmica.

Os valores de meia-vida das xilanases a 50 e 60 °C foram obtidos por meio de um ajuste dos dados obtidos nos experimentos de termoestabilidade a uma equação do tipo exponencial decadente ($y = a \cdot e^{-b \cdot x}$), utilizando o programa Curve Expert, como descrito no item 3.8. Os gráficos e os coeficientes obtidos em cada regressão são mostrados na Figura 13.

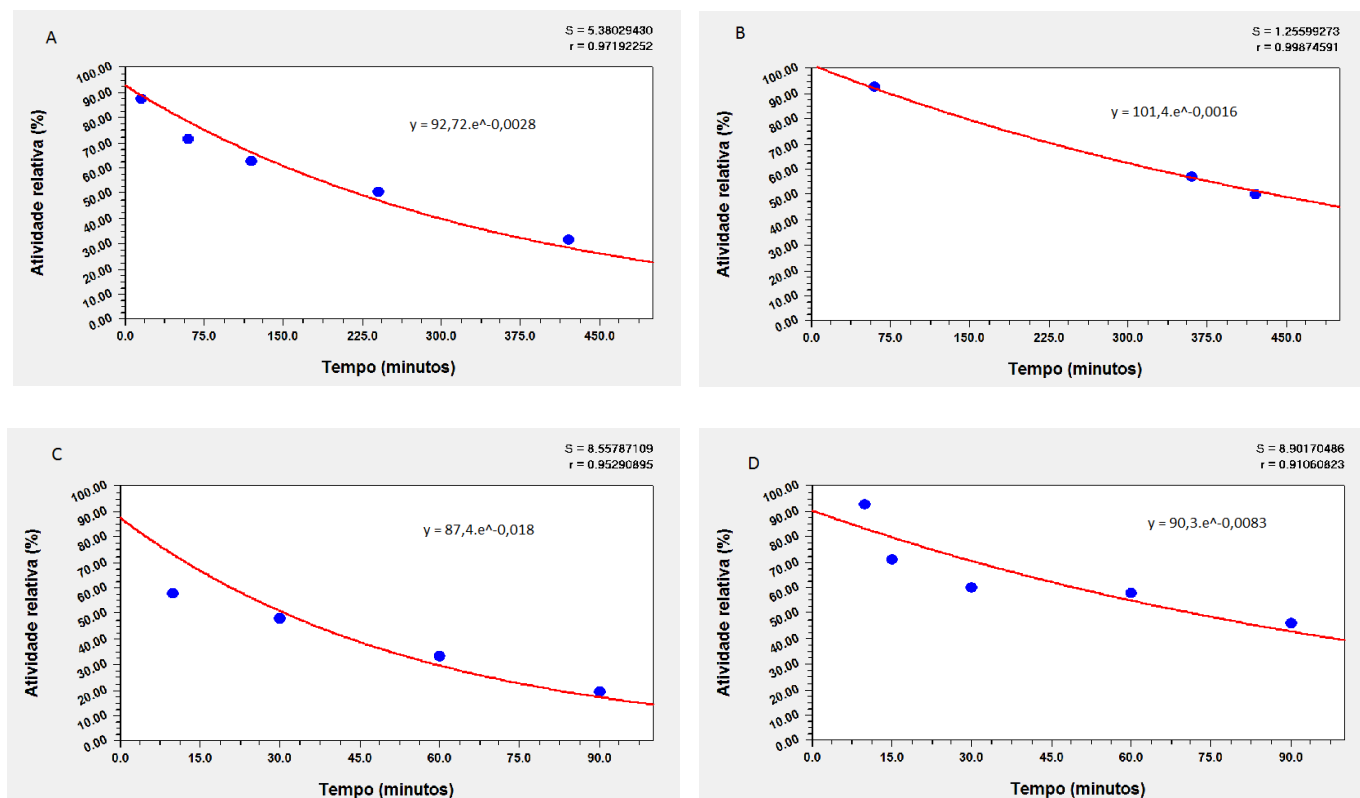


Figura 13 – Estimação da meia-vida das xilanases XNM e XM. (A) XNM a 50 °C, (B) XM a 50 °C, (C) XNM a 60 °C e (D) XM a 60 °C.

Para a XNM os valores de meia vida a 50 e a 60 °C foram de 220 e 31 minutos, respectivamente. Para a XM os valores foram de 440 e 71 minutos, respectivamente. A termoestabilidade é um parâmetro de grande importância para aplicação de enzimas em processos industriais. Muitos processos biotecnológicos são desenvolvidos em temperaturas superiores àquelas de atividade das enzimas nativas. Muitas vezes, para que o processo industrial se adeque à temperatura da enzima, torna-se necessário o acréscimo de etapas, o que pode inviabilizar técnica e economicamente a utilização de enzimas nesses processos. Dessa forma, a obtenção de enzimas com maior termoestabilidade é de grande interesse para aplicação industrial desses biocatalisadores.

Vafiadi et al (2010) observaram que a enzima nomeada *StXyn1* perdeu cerca de 50 % de sua atividade inicial quando incubada a 60 °C por 1 hora, resultado inferior ao demonstrado pela xilanase mutada do presente trabalho. Gallardo et al (2010) fizeram evolução dirigida para obter estabilidade das xilanases derivadas de *Paenibacillus barcinonensis* e os valores de meia vida a 50 °C encontrados foram de 1,8; 9,1; 7,1, 2,2 e 37,7 minutos para a wild type e mutantes E137D, D323N, S15L, M93V, E137D/D323N e S15L/M93V, respectivamente.

Kim et al (2010), verificando as propriedades catalíticas da endo- β -1,4-xilanase de *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 relataram que embora a XylG retivesse mais de 80 % de sua atividade original em temperaturas abaixo de 45 °C por menos de 1 hora, estas reduzem drasticamente quando expostas a temperaturas acima de 55 °C por 10 minutos. O tempo de meia vida da enzima a 50 °C foi estimado em aproximadamente 40 minutos.

Terresan et al (2013), estudando uma xilanase de *Penicillium janczewskii* observaram o tempo de 15 minutos para a enzima atingir a metade da atividade inicial a 50 °C e apenas 3 minutos a 60 °C.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a XM apresentou maior estabilidade térmica e de pH, comparada a XNM, quando ensaiadas com o substrato arabinoxilana de trigo. Isto indica que a XM poderia ser utilizada em processos industriais, especialmente para hidrólise da xilana de trigo.

5.5. Determinação das constantes cinéticas

O efeito da concentração da arabinoxilana sobre a atividade das enzimas e a energia de ativação para a catálise da hidrólise do substrato foram avaliados como descrito no item 4.9.

O valor das constantes cinéticas K_M e K_{cat} , da constante de eficiência catalítica K e da Energia de ativação (E_a) são mostrados na Tabela 2 a seguir. O cálculo de K_M está demonstrado na Figura 14 seguinte.

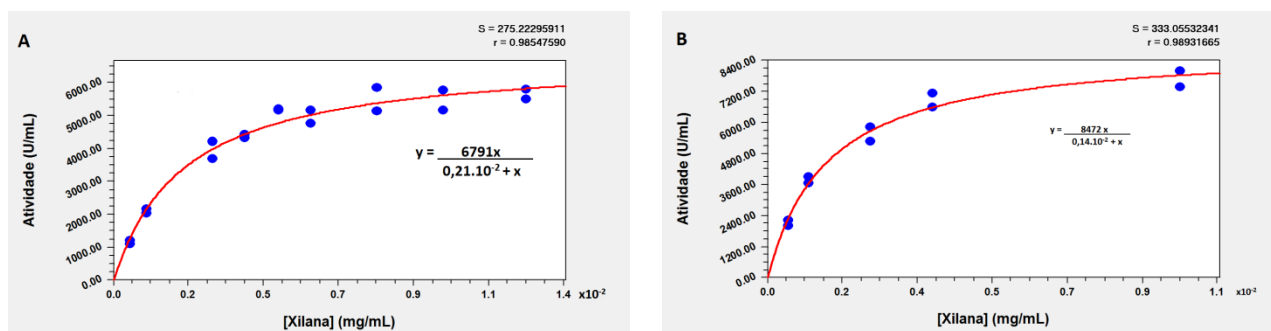


Figura 14 – Efeito da concentração do substrato arabinoxilana de trigo na velocidade da reação catalisada pelas enzimas (A) xilanase não mutada e (B) xilanase mutada

Tabela 2 – Valores de K_M , K_{cat} , K e E_a das XNM e XM com o substrato arabinoxilana de trigo

Constante	XNM	XM
K_M (mg mL ⁻¹)	0,0021	0,0014
k_{cat} (s ⁻¹)	$4,85 \times 10^3$	$4,61 \times 10^3$
k_{cat}/K_M (mL mg ⁻¹ .s ⁻¹)	$2,31 \times 10^6$	$3,29 \times 10^6$
E_a (kJ mol ⁻¹)	32,9	43,9

Em relação aos parâmetros cinéticos, as enzimas XNM e XM apresentaram uma grande afinidade pelo substrato, devido ao baixo valor de K_M . Estas enzimas apresentaram valores similares e elevados para a constante catalítica, k_{cat} , e o que resultou em alta eficiência catalítica (K_{cat}/K_M).

Lafond et al (2011) estudaram uma xilanase GH10 de *Penicillium funiculosum* e fizeram estudos bioquímicos para caracterização da enzima. Os valores de K_M , k_{cat} e K para a XynD, determinados pela mesma curva de M-M foram de $3,7 \pm 0,2$ mg mL⁻¹, 399 s⁻¹ e 108 mg mL⁻¹ s⁻¹, respectivamente. Em comparação, para a XynB estudada por Brutus et al (2004), os valores encontrados foram de $40,0 \pm 3,0$ g L⁻¹, 5404 s⁻¹ e 135 s⁻¹ mg⁻¹ para as mesmas constantes, contra xilana de baixa viscosidade; enquanto Berrin et al (2007) encontraram valores de $14,4 \pm 0,7$ mg mL⁻¹, 2939 s⁻¹ e 204 s⁻¹ mg⁻¹ para a XynC GH11 do mesmo fungo *P. funiculosum* em arabinoxilana de trigo. Embora os três pesquisadores tenham encontrado valores semelhantes de eficiência catalítica, esta ainda se mostra inferior em relação ao desempenho das xilanases do presente estudo.

Zhang et al (2010) fizeram evolução dirigida e mutação sítio-dirigida para melhorar a termoestabilidade da xilanase de *Geobacillus stearothermophilus*. A enzima selvagem e os 7 mutantes apresentaram K_M variando de $0,36$ a $0,99$ mg mL⁻¹, k_{cat} de 1238 a 2557 s⁻¹ e K de 1303 a 4360 mg mL⁻¹ s⁻¹, em xilana brichwood, sendo que os menores valores de k_{cat} e K foram da WT. As substituições de aminoácidos F52Y e F360L exibiram um pequeno efeito no K_M e no k_{cat} enquanto a substituição M270I resultou num decréscimo de 62 % no K_M , indicando um possível aumento na afinidade relativa deste

mutante ao substrato, o que contribuiu para um aumento de 200 % na eficiência catalítica.

Os gráficos de Arrhenius ($\log V_{\max}$ VS $1/T^{-1}$ (K)) para as enzimas XNM e XM são mostrados na Figura 15.

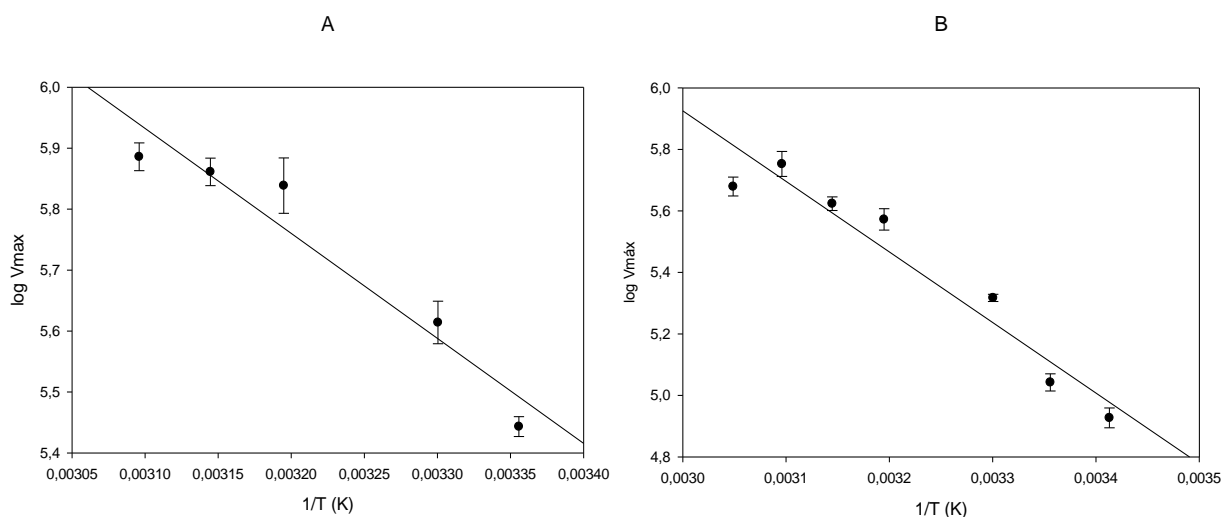


Figura 15 – Gráfico de Arrhenius para hidrólise de arabinosilana pela enzima sem mutação (A) XNM e mutante (B) XM.

Os valores encontrados de E_a para XNM e XM foram de 32,9 e 43,9 kJ mol^{-1} , respectivamente. A xilanase de *Bacillus subtilis* estudada por Bernier Jr et al (1983) apresentou um valor de energia de ativação de 35,1 kJ mol^{-1} . Raghukumar et al (2004) avaliaram o potencial de xilanases fúngicas marinhas de *Aspergillus niger* para o biobranqueamento de polpa de papel e encontraram o valor de E_a de $30,4 \pm 12,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a enzima I e de $38,8 \pm 8,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a II a 40 °C, enquanto a 50, o valor caiu para apenas 16 kJ mol^{-1} .

5.6. Efeito de íons e outros compostos na atividade enzimática

O efeito de íons e outros compostos na atividade de xilanase foi avaliado como descrito no item 4.10. A concentração testada foi de 2 mM para ambos os compostos, que são mostrados na Tabela 3. Os compostos que promoveram maior inibição na atividade enzimática foram o mercúrio (Hg), o zinco (Zn) e o dodecil sulfato de sódio (SDS), que reduziram a atividade em níveis inferiores a 30 %. Em seguida, cobre (Cu), mercúrio (Mg) e manganês (Mn) causaram uma queda na atividade até 75 %. Por fim, o

β -mercaptoetanol, o cálcio (Ca) e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) que apresentaram menor efeito na atividade enzimática.

Hg⁺² pode modificar covalentemente resíduos de aminoácidos, em particular, cisteína. Este efeito também foi observado por Khanna et al., (1993), Kang et al., (1996); Bataillon et al., (2000) e Qureshy et al., (2002). O Cu⁺² conhecidamente forma complexos coordenados com a cadeia principal das aminas. É possível que estes aminoácidos estejam sendo modificados por estes cátions e isto altera estruturalmente a proteína ou interfere na reação da enzima (COLLINS et al., 2005). Esta inibição é similar ao verificado em *Bacillus* sp. YJ6, *Staphylococcus* sp. SG-13, *Plectosphaerella cucumerina*, *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645, *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus ficuum* AF-98 (ZHANG et al., 2007; YIN et al., 2010; GUPTA et al., 2000; KAMBLE et al., 2012; SALAMA et al., 2008; LU et al., 2008).

Tabela 3 – Efeito de diversos efetores na atividade enzimática

Efedor	XNM Atividade relativa(%)	XM Atividade relativa(%)
Sem efedor	100	100
β -mercaptoetanol	80,9	92,9
CaCl ₂	72,3	84,8
CuCl ₂	49,5	64,2
EDTA	80,0	79,2
HgCl ₂	12,5	13,9
MgCl ₂	69,0	73,4
MnCl ₂	48,0	61,4
NaCl	79,7	91,0
SDS	17,9	24,0
ZnCl ₂	12,9	28,9

De forma semelhante ao encontrado neste trabalho, a xilanase estudada por Gong et al (2013) também não sofreu efeito significativo do EDTA, no entanto, Pal et al (2010) verificaram que a discreta queda na atividade está relacionada a capacidade quelante deste composto, o que sugere que os íons metálicos são necessários para a reação enzimática.

A ação do SDS foi observada em um trabalho de Rajagopalan et al (2013), em que este mostrou a maior inibição dentre todos os efetores. Na presença de 50 mM de SDS, a atividade da xilanase de *Clostridium* sp. BOH3 foi reduzida a 74 %. Já o EDTA, mesmo na concentração de 5 mM, não afetou a catálise para o trabalho em questão, bem como para a xilanase de *C. acetobutylicum* ATCC824, que também não sofreu ação de 5 mM de β -mercaptoetanol (LEE et al., 1987).

Wang et al (2012) observaram, de forma similar, uma inibição parcial na atividade enzimática da xilanase de *Saccharomonospora viridis* pelo Ca⁺² a 1 mM.

O Na⁺, segundo o mesmo autor, não apresentou efeito aparente. Okazaki et al (2013) também não observaram efeito significativo dos mesmos íons Ca⁺² e Na⁺.

Verma et al (2013) destacaram que o Mn⁺² causou perda de mais de 30 % na atividade enzimática, o que também foi visto por Guo e colaboradores (2013), sendo que a 5 mM, este efector reduziu a atividade da xilanase a 54 %.

5.7. Hidrólise da Farinha de Trigo Integral

O objetivo do ensaio de hidrólise a 27 °C realizado neste trabalho foi simular uma possível utilização da xilanase na indústria de panificação, preconizando a metodologia de esponja em que na primeira fase de preparação, faz-se a mistura da massa com farinha de trigo, fermento, água, aditivos e outros ingredientes (BANNWART, 2001; HOSENEY, 1991). A esponja é uma massa líquida feita com as mesmas quantidades de farinha e água e com quantidade de fermento proporcional ao tempo de fermentação, que pode variar de 2 a 8 horas antes da produção da massa do pão (SEBESS, 2010). Este momento seria o ideal para adição da enzima uma vez que a hidrólise ocorreria simultaneamente com a fermentação prolongada, feita a 27 °C.

O ensaio de hidrólise da farinha de trigo integral com as xilanas XNM e XM foi conduzido segundo a metodologia descrita em 4.11. O ensaio a 27 °C não mostrou resultados expressivos de hidrólise da farinha de trigo integral na presença das enzimas. Na Tabela 4 estão os resultados da liberação de xilose e glicose da farinha de trigo integral após aplicação das enzimas não mutada (XNM) e mutada (XM) em ensaio conduzido a 50 °C. No controle negativo, o volume de enzima foi substituído por água.

Tabela 4 – Concentração de açúcares em mg/g de farinha de trigo integral liberados no ensaio a 50 °C com XNM e XM

T (h)	Glicose			Xilose		
	0	6	Δ	0	6	Δ
CN	0,99±0,08	5,99±0,02	5,00	0	0	0
XNM	0,92±0,01	5,92±0,87	5,00	0	2,38±0,22	2,38
XM	0,90±0,83	4,16±4,02	3,26	0,85±0,08	2,40±0,22	1,55

Nos cereais, as xilanas são tipicamente conhecidas como arabinoxilanas (arabinose/xilose - AX) que são xilanas que apresentam como grupo substituinte moléculas de L-arabinose ligadas ao carbono C-2 e/ou C-3 da xilose através de uma ligação glicosídica α-1,2 e/ou α-1,3. Arabinoxilanas de cereais, também conhecidas como pentosanas, são mais solúveis em água e em solução alcalina do que as xilanas de materiais lignocelulósicos devido à sua estrutura ramificada (KULKARANI *et al.*, 1999).

Por este motivo, a hidrólise enzimática da farinha de trigo por xilanases GH11 pode liberar xilose, um de seus monossacarídeos constituintes, uma vez que a arabinoxilana apresenta uma cadeia principal de xilose 50 % substituída com arabinose. Akpinar et al (2009) verificaram que quando a xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* foi utilizada para tratamento da palha de trigo, esta liberou uma maior quantidade de arabinose enquanto para o pedúnculo de tabaco e de algodão foi observado uma maior quantidade de xilose e um pouco de glicose. A hidrólise de xilana de bétula por xilanase de *Thermotoga marítima* MBS8 expressa em *E. coli* produziu 66 % de xilobiase, 20 % de xilose. Segundo Li et al (2012), dependendo do substrato, diferentes quantidades de açúcares redutores são produzidos pela xilanase.

Trabalhos de Li et al (2000) mostraram que os grupos substituintes influenciam na taxa de hidrólise da cadeia de xilana, o que é regulado pelo grau de ramificação da cadeia principal. A presença de ramificação pode ser um entrave mais ou menos acentuado dependendo do modo de ação da enzima. Xilanase de *Aspergillus niger* hidrolisa melhor xilana não ramificada, enquanto xilanase de *Trichoderma longibrachiatum* age sobre ambas as xilanas (AKPINAR et al., 2009).

Segundo Courtin et al (2001), xilanases que preferencialmente atacam a arabinoxilana não extraídas com água causam um impacto positivo sobre as propriedades da massa e volume do pão. Assim, hoje o grande desafio é obter xilanases que atuem sobre este substrato do trigo, modificando sua estrutura e funcionalidade. Outro ponto de destaque está relacionado à vantagem do uso de enzimas termoestáveis, uma vez que sua ação seria continuada durante a etapa de forneamento, momento de maior atividade.

Nas condições dos ensaios realizados neste trabalho, não foi possível obter resultados expressivos de hidrólise da farinha de trigo integral utilizando XNM e XM. O que podemos destacar como possíveis causas da baixa hidrólise enzimática compreendem diversos fatores. Primeiramente, a baixa temperatura do ensaio compromete significativamente a atividade da enzima. A 27 °C, ela retém menos de 40 % de sua atividade máxima, uma vez que sua temperatura ótima é a 60 °C. A enzima requer uma elevada temperatura para atuação, o que não é condizente com o processo (esponja). A 50 °C, já foi percebida uma pequena liberação dos açúcares.

Outro fator está relacionado às próprias condições do sistema. A atividade da enzima foi ensaiada em um sistema modelo, com xilana a 0,25 %, enzima em tampão de pH ótimo para atuação, o que pouco se aproxima do modelo real encontrado na farinha suspensa em água. A agitação é outro parâmetro que deve ser considerado, pois uma movimentação mais vigorosa do sistema proporcionaria um maior acesso da enzima ao substrato, facilitando a hidrólise. Podemos destacar, também, que uma maior

concentração enzimática, talvez influenciasse de forma positiva na liberação da xilose. O pH do sistema foi de $5,18 \pm 0,02$, o que, provavelmente, exerceu pouca influência sobre a atividade enzimática.

Por estes motivos, outro teste, a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi realizado. A análise da tabela permite perceber uma discreta liberação de xilose nos tratamentos com enzima, o que não foi encontrado no controle negativo. Para a glicose, a XNM exibiu o mesmo teor do controle negativo, enquanto a XM liberou uma quantidade menor deste açúcar.

Conclui-se, desta forma, que a hidrólise da farinha de trigo integral se mostrou mais aplicável quando realizada em uma temperatura mais elevada, que também se aproxima mais do valor ótimo para esta enzima.

5.8. Clarificação enzimática do suco de maçã

A metodologia para este experimento seguiu a descrita no item 4.12. Os valores encontrados estão dispostos na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Análises Físico-químicas do suco de maçã

t(min)	pH		A660		C		h*	
	0	60	0	60	0	60	0	60
CN	$4,29 \pm 0,015$	$4,32 \pm 0,017$	$0,7591 \pm 0,007$	$0,7447 \pm 0,003$	$23,10 \pm 0,26$	$22,82 \pm 0,03$	1,25	1,17
XNM	$4,30 \pm 0,008$	$4,30 \pm 0,023$	$0,7336 \pm 0,007$	$0,7325 \pm 0,005$	$23,11 \pm 0,04$	$21,36 \pm 0,04$	1,28	1,19
XM	$4,30 \pm 0,003$	$4,30 \pm 0,013$	$0,7320 \pm 0,004$	$0,7377 \pm 0,007$	$22,83 \pm 0,06$	$23,03 \pm 0,02$	1,29	1,20

*os valores calculados para este parâmetro foram idênticos em todas as repetições

O primeiro parâmetro avaliado durante o ensaio de clarificação do suco foi o pH. O que se deve ressaltar é que o aparelho (pHmêtro) é bastante preciso e suas medidas foram bem próximas, portanto, se sugere uma variabilidade decorrente da amostragem. Mas o aumento inicial de pH pode ter sido ocasionado pela simples presença das enzimas que, por serem proteínas, agem como substâncias-tampões. Segundo Braverman (1967), soluções de proteínas têm excelente ação tamponante, pelo grande número de tipos que podem interagir reversivelmente com prótons num intervalo grande de pH. Outra hipótese é a ocorrência de reações bioquímicas, inter e intramoleculares, como ligações cruzadas e fixações de grupamentos acídicos, por ocasião da elevação da temperatura ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante o tratamento enzimático (BRASIL *et al.*, 1995).

Para a claridade (A660), Grassin (1996) afirmou que o efeito da xilanase pode ser explicado pelo fato de que a hemicelulose é o principal constituinte da parede celular do fruto e a xilana é grande parte desta. O que se pôde observar quanto a isto foi que os sucos tratados com enzimas se mostraram ligeiramente mais claros ao início do ensaio, o que, mais uma vez, pode ter sido proveniente da amostragem experimental, no

entanto, a diferença entre o valor inicial e o final não demonstrou uma clarificação efetiva para os tratamentos com enzima. Claridade é um dos índices mais importantes de sucos clarificados (SIN *et al.*, 2006).

Para o croma (C), que indica a intensidade da cor, o controle negativo e a XNM se tornaram menos intensos enquanto para a XM, a cor ficou mais forte. Apesar de a diferença ser bem pequena, este foi o único tratamento que demonstrou esta tendência.

Os valores de ângulo de tonalidade (h), por se tratarem de uma arctangente obtida pelas repetições de a^* e b^* , que foram muito semelhantes, originaram valores idênticos, por isso não há desvios nestes valores. Para sua análise, devemos considerar que o ângulo $h^\circ = 0^\circ$ é fixado no eixo horizontal com a^+ (vermelho) e, girando no sentido anti-horário, tem-se, $h^\circ = 90^\circ$ (amarelo), $h^\circ = 180^\circ$ (verde) e $h^\circ = 270^\circ$ (azul). O h° entre 0° e 90° caracteriza a qualidade da cor de vermelho a amarelo. Para $\arctg=1$, temos o ângulo de 45° , que representa a cor laranja. Desta forma, o que se percebe é que com a queda deste valor ao final do experimento, os sucos se aproximaram da coloração laranja. Os tratamentos com enzima mostraram um ligeiro comportamento mais acentuado neste sentido.

Para os açúcares liberados, a xilose, principal açúcar indicativo da ação da endoxilanase, apresentou uma liberação bem discreta e alguns possíveis motivos podem ser apontados. Primeiramente, o que se mostra como um ponto de muita interferência na atividade, é o pH. Em 4,3 (pH médio do suco de maçã), a estabilidade em pH da xilanase, por 1 hora, é em torno de 40 %. Como o ensaio foi realizado em 1 hora, esta atividade pode ter sido consideravelmente reduzida.

Em relação à temperatura, a adotada foi escolhida propositalmente por ser a que a enzima exibe sua maior atividade. Segundo Lee *et al* (2006), o aumento da temperatura aumenta a taxa de reações enzimáticas e, portanto, exerce influência na clarificação, desde que a temperatura utilizada esteja abaixo da temperatura de desnaturação da enzima. No entanto, a meia vida das enzimas XNM e XM a esta temperatura foi de 31 e 71 min, o que pode, também, ter promovido a redução da hidrólise. Talvez se o ensaio tivesse sido realizado a 50°C , a ação enzimática seria mantida por um maior período de tempo, uma vez que o tempo de meia vida nesta temperatura para as enzimas XNM e XM foi de 220 e 440 minutos.

A própria composição do suco deve ser analisada para responder algumas perguntas. Sabe-se que o meio é rico em minerais, fibras, ácidos, diversos sólidos solúveis, fenóis, dentre outros compostos. Além de alterar a composição do sistema modelo (xilana 0,25 % em tampão de pH ótimo) tornando-se um meio complexo, existe a possibilidade de haver inibição da enzima por algum deles. Sugere-se um estudo mais aprofundado desta composição para posterior teste de inibição com a xilanase.

Outro motivo está relacionado com a maior viscosidade deste meio (devido, mais uma vez, a todos estes compostos solúveis), o que dificulta a ação enzimática pela sua mobilidade reduzida. A variação em parâmetros do processo, como a própria agitação do sistema, pode, de certa forma, interferir nesta hidrólise, uma vez que proporcionaria um maior contato da enzima com seu substrato.

Deve-se, também, destacar a quantidade de enzima testada. Não se sabe se a concentração de enzima utilizada foi suficiente para uma ação mais pronunciada da xilanase.

A escolha do suco de maçã se deu devido ao fato de a parede celular destas frutas consistirem em diferentes polissacarídeos, especialmente pectina, hemicelulose e celulose, bem como proteínas estruturais e lignina (DONGOWSKI *et al.*, 2001). Por este mesmo motivo, sugere-se um novo estudo de sinergismo entre a xilanase deste trabalho com pectinases, o que, provavelmente, resultará em uma clarificação mais pronunciada.

Por fim, recomenda-se, também, a aplicação desta metodologia considerando-se os parâmetros destacados acima com novas frutas que se adequem mais às condições da enzima, como pH menos ácido (em torno de 6, que é o ótimo para enzima) e que não apresente (ou que apresente de forma reduzida) possíveis inibidores da ação enzimática. Citam-se os sucos de laranja (6,3-6,7), melancia (5,4) e uva (5,2-5,6).

6. CONCLUSÕES

- ✓ As xilanases XNM e XM expressas em *E. coli* apresentaram elevada atividade específica com o substrato arabinoxilana de trigo e foram eficientemente purificadas por cromatografia de troca iônica.
- ✓ As xilanases apresentaram massa estimada de 25 kDa, pH e temperatura ótimos de 5 e 60 °C para XM e 3 e 60 °C para a XNM. A XM exibiu maior estabilidade térmica e de pH comparada a XNM.
- ✓ As constantes cinéticas para a XNM foram K_M de 0,0021 mg mL⁻¹, K_{cat} de $4,85 \cdot 10^3$ s⁻¹ e E_a de 32,9 kJ mol⁻¹.
- ✓ As constantes cinéticas para a XM foram K_M de 0,0014 mg mL⁻¹ (maior afinidade pelo substrato arabinoxilana em relação a XNM), K_{cat} de $4,61 \cdot 10^4$ s⁻¹ (conversão de substrato em produto mais eficiente) e E_a de 43,9 kJ mol⁻¹.
- ✓ Ambas as enzimas foram inibidas por Hg⁺², Zn⁺² e SDS, seguida por Mn⁺², Cu⁺² e Mg⁺².
- ✓ A liberação de açúcares a partir da hidrólise da farinha de trigo integral usando as xilanases não se mostrou eficiente a 27 °C. A 50 houve pequena liberação de xilose após ensaio por 6h.
- ✓ A clarificação do suco de maçã utilizando as xilanases não foi eficiente nas condições testadas.
- ✓ A remoção da cauda e a substituição dos aminoácidos na enzima mutada (XM) promoveu melhora na termoestabilidade e em parâmetros cinéticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, G. Desenvolvimento de metodologia para avaliação da degradação enzimática do amido do suco de maçã. Trabalho de conclusão de curso, 40 p., Porto Alegre, RS, 2011.

AKPINAR, O.; BOSTANCI, S. Xylooligosaccharide production from lignocellulosic wastes with *Trichoderma longibrachiatum* xylanase. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, 7(1):70-74, 2009.

ALAN, M.; GOMES, I.; MOHIUDDIN, G.; HOQ, M. M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces laniginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, 16: 298-302, 1994.

ALCADE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysts: from remediation with enzymes to novel green process. **Trends Biotechnol**, 24:281-287, 2006.

ALVAREZ, S.; ALVAREZ, R.; RIERA, F. A.; COCA, J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 138(2-3):377-382, 1998.

ANDREAS, J.; FILHO, E. X. F.; BON, E. P. S. Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: **Biocatalysis and Bioenergy**. Hou, C. T.; Shaw, J. F. John Wiley & Sons:United States of America, p.197-229, 2008.

ARO, N. N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 29:719-739, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16 ed, Arlington:AOAC, 1997.

BACHMANN, S. L.; MCCARTHY, A. J. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. **Applied and Environmental Microbiology**, 57:2121- 2130, 1991.

BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae* production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme Microb. Technol.**, 29:328-334, 2001.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, 10:411-421, 1999.

BANNWART, A. C. A qualidade na produção. **Aditivos e Ingredientes**. São Paulo, 13:60-62, 2001.

BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 8: 353-368, 1992.

BATAILLON, M.; CARDINALI, A. P. N.; CASTILLON, N.; DUCHIRON, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. Strain SPS-O. **Enz Microb Technol**, 26:187-192, 2000.

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

BERNER JR., R.; DESROCHERS, M.; JURASEK, L.; PAICE, M. G. Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 46(2):511-514, 1983.

BERRIN, J. G.; AJANDOUZ, E. H.; GEORIS, J.; ARNAUT, F.; JUGE, N. Substrate and product hydrolysis specificity in family 11 glycoside hydrolases: an analysis of *Penicillium funiculosum* and *Penicillium griseofulvum* xylanases. **Appl Microbiol Biot**, 74:1001-1010, 2007.

BHAT, M. K.; HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: **Enzymes in farm animal nutrition**, Bedford, M. R.; Partridge, G. G. CABI Publishing, p.11-23, 2001.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances** 18: 355–383, 2000.

BIELY, P.; VRSANSKA, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, 57:151–166, 1997.

BIELY, P.; KLUEPFEL, D.; MOROSOLI, R.; SHARECK, F. Mode of action of three endo-beta-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1162: 246–254, 1993.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, 3:286-290, 1985.

BORGES, C. P. Curso Teórico – Prática em Engenharia de Bioprocessos. Centro Argentino Brasileiro de Biotecnologia (CABB) – Programa de Engenharia Química COPPE/UFRJ. Rio de Janeiro, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – instrução Normativa 12, 4 de setembro de 2003. Padrões de identidade para sucos e néctares. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2003.

BRASIL, I. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W. Estudo do rendimento do suco de goiaba extraído por tratamento enzimático. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 16(1):57-61, 1996.

BRASIL, I. M.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W. Mudanças físico-químicas durante a extração e clarificação de suco de goiaba (*Psidium guajava* L. var. *pomifera*). **Pesq Agropec Bras**, 30(8):1097-1106, 1995.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introducción a la bioquímica de los alimentos**. Barcelona:Ediciones Omega, 377 p., 1967.

BRUTUS, A.; VILLARD, C.; DURAND, A.; TAHIR, T.; FUMISS, C.; PULGSERVER, P.; JUGE, N.; GIARDINA, T. The inhibition specificity of recombinant *Penicillium funiculosum* xylanase B towards wheat proteinaceous inhibitors. **Biochim Biophys Acta**, 1791:121-128, 2004.

CAI, H.; SHI, P.; BAI, Y.; HUANG, H.; YUAN, T.; YANG, P.; LUO, H.; MENG, K.; YAO, B. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1. **Process Biochem**, 46:2341-2342, 2011.

CARVALHO, W. R. Caracterização bioquímica da endoxilanase recombinante (HXYN2r) do fungo termofílico *Humicola grisea* VAR. *thermoidea* e sua aplicação na sacarificação de resíduos agrícolas. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Goiás, 2008.

CHEILAS, T.; STOUPIS, T.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Hemicellulolytic activity of *Fusarium oxysporum* grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinase. **Process Biochemistry**, 35: 557 – 561, 2000.

CHEN, Y. L.; TANG, T. Y.; CHENG, K. J. Directed evolution to produce an alkalophilic variant from a *Neocallimastix patriciarum* xylanase. **Can. J. Microbiol.**, 47:1088-1094, 2001.

CHIDI, S. B.; GODANA, B.; NCUBE, I.; VAN RENSBURG, E. J.; CRONSHAW, A.; ABOTSI, E. K. Production, purification and characterization of cellulose-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, 7(21):3939-3948, 2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 29: 5-23, 2005.

COLLINS, T.; MEUWIS, M-A.; STALS, I.; CLAEYSSENS, M.; FELLER, G.; GERDAY, C. A Novel Family 8 Xylanase, functional and Physicochemical Characterization. **Journal of Biological Chemistry**, 277: 35133-35139, 2002.

CORRÊA NETO, R.S.; FARIA, J. A. F. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 19(1): 153-161, 1999.

COUGHLAN, M. P. Towards an understanding of the mechanism of action of main chain-hydrolyzing xylanases. In: **Xylans and xylanases**. (Visser, J., Beldman, G.; Kusters-van Someren, M.A.; Voragen, A.G.J., eds.), pp. 111-139, Elsevier, Amsterdam. 1992.

COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. **Journal of Cereal Science**, 35:225-246, 2002.

COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Relative activity endoxylanases towards water-extractable and unextractable arabinoxylan. **Journal of Cereal Science**, 33:301-312, 2001.

DAMASO, M. C. T.; ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O. B.; PEREIRA JR., N.; ANDRADE, C. M. M. C.; ALBANO, R. M. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(10):6064-6072, 2003.

DE ALMEIDA, M. N.; GUIMARAES, V. M.; BISCHOFF, K. M. Cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 165(2):594-610, 2011.

DE PAULA, E, H.; FARIA, F. P.; BARBOSA, C. D.; CORNELIO, I. N.; PEREIRA, L. R.; AZEVEDO, M. O. Sacarificação de compostos lignocelulósicos pelo extrato enzimático do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Anais da Enzitec, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.

DEESUKON, W.; NISHIMURA, Y.; SAKAMOTO, T.; SUKHUMSIRICHART W. Purification. Characterization of GH11 Endo- β -1,4-xylanase from Thermotolerant *Streptomyces* sp. SWU10 and Overexpression in *Pichia pastoris* KM71H. **Mol Biotechnol**, 57:37-46, 2013.

DEKKER, R. F. H.; RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 32:277-352, 1976.

DONGOWSKI, G.; SEMBRIES, S. Effects of commercial pectolytic and cellulolytic enzyme preparations on the apple cell wall. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(9):4236-4242, 2001.

DRISS, D.; BHIRI, F.; SIELA, M.; BESSESS, S.; CHAABOUNI, S.; GHORBEL, R. Improvement of breadmaking quality by xylanase GH11 from *Penicillium occitanis* Pol6. **Journal of Texture Studies**, 44:75-84, 2013.

DUSTERHOFT, E. M.; LINSSEN, V. A. J. M.; VORAGEN, A. G. J.; BELDMAN, G. Purification characterization and properties of two xylanases from *Humicola insolens*. **Enzyme and Microbial Technology**, 20: 437, 1997.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARAES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N. *Chrysophorte cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification process. **Bioresource Technology**, 130:296-305, 2013.

FARIA, F. P. Clonagem, Caracterização e Análise de Expressão de um gene de xilanase (Hxyn2) do Fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, 2000.

FENEL, F.; LEISOLA, M.; JANIS, J. T. O. A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II. **J Biotechnol**, 108(2):137-143, 2004.

FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, 173:335 – 339, 1999.

FRINHANI, E. M. D. Estudos de aplicação de corantes naturais (norbixina, curcumina e clorofila cúprica) para produção de papéis. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa-MG, 2003.

FUSHINOBU, S.; ITO, K.; KONNO, M.; WAKAGI, T.; MATSUZAWA, H. Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acidstable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. **Protein Engineering**, 11:1121-1128, 1998.

GALLARDO, O.; JAVIER PASTOR, F. I.; POLAINA, J.; DIAZ, P.; LYSEK, R.; VOGEL, P.; ISORNA, P.; GONZALES, B.; SANZ-APARICIO, J. Structural insights into the specificity of xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. **J. Biol. Chem.**, 285:2721-2733, 2010.

GEORIS, J.; DE LEMOS ESTEVES, F.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; BOUGNET, V.; DEVREESE, B.; GIANNOTTA, F.; GRANIER, B.; FRERE, J. M. An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: Structural basis and molecular study. **Protein Sci**, 9:466-475, 2000.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H.K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresource Technology**, 73:113 – 121, 2000.

GHOSHAL, G.; SHIVHARE, U. S.; BANERJEE, U. C. Effect of xylanase on quality attributes of whole-wheat bread. **Journal of Food Quality**, 36:172-180, 2013.

GIVER, L.; GERSHENSON, A.; FRESKGARD, P-O.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of a thermostable esterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:12809-12813, 1998.

GOSH, M.; NANDA, G. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. **Applied and Environmental Microbiology**, 60(12):4620-4623, 1994.

GONG, X.; GRUNINIGER, R. J.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M.; McALLISTER, T. A. Biochemical analysis of a high specific, pH stable xylanase gene identified from a bovine rumen-derived metagenomic library. **Appl Microbiol Biotechnol**, 97:2423-2431, 2013.

GONZALEZ CANGA, A.; FERNANDEZ MARTINEZ, N.; SAHAQUN, A. M.; GARCIA VIEITEZ, J. J.; DIEZ LIEBANA, M. J.; CALLE PARDO, A. P.; CASTRO ROBLES, L. J.; SIERRA VEGA, M. Glucomannan: properties and therapeutic applications. **Nutr Hops**, 19(1):45-50, 2004.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Application of pectinases in beverages. **Prog Biotechnol**, 14:453-462, 1996.

GRAY, K. A.; ZHAO, L. S.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, 10:141-146, 2006.

GRUBER, K.; KLINSTSCHAR, G.; HAYN, M.; SCHLACHER, A.; STEINER, W.; KRATKY, C. Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high-resolution X-ray structure and modeling studies. **Biochem**, 37(39):1347-1385, 1998.

GUO, B.; LI, P.; YUE, Y.; ZHAO, H.; DONG, S.; SONG, X.; SUN, C.; ZHANG, W.; CHEN, X.; ZHANG, X.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. Gene Cloning, Expression and Characterization of a Novel Xylanase from the Marine Bacterium, *Glaciecola mesophila* KMM241. **Mar. Drugs**, 11:1173-1187, 2013.

GUPTA, S.; BHUSHAN, B.; HOONDA, G. S. Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. **Journal of Applied Microbiology**, 88(2):325-334, 2000.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, 58: 137-161, 1996.

HAMMES, G.; WOOD, L. F. J. **Enzymes in food processing**. 2 ed. Blackier Academic and Professional:Glasgon, 1995.

HARKKI, A.; MANTYLA, A.; PENTILLA, M.; MUTTILAINEN, S.; BAHLER, R.; SUOMINEN, P.; KNOWLES, J.; NEVALAINEN, H. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* to produce strains with novel cellulase profiles. **Enzyme and Microbial Technology**, 13:227-233, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, 293:781-788, 1993.

HOCH, G. Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. **Functional Ecology**, 21:823-834, 2007.

HON, D. N. S. Weathering and photochemistry of wood. In: **Wood and cellulosic chemistry**, 2.ed., Hon, D. N. S.; Shiraishi, N. New York: Marcel Dekker, p.513-546, 2001.

HOPPE-SEYLER, E. Hemicellulose degrading microorganisms from river mud. **Hoppe-Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, 3:65-101, 1889.

HOSENEY, R. C. **Principios de ciencia y tecnologia de los Cereales**. Zaragoza:Acribia, 321 p., 1991.

INAMI, M.; MOROKUMA, C.; SUGIO, A.; TAMANOI, H.; YATSUNAMI, R.; NAKAMURA, S. Directed evolution of xylanase J from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1: Restore of alkaliphily of a mutant with an acidic pH optimum. **Nucleic Acids Res. Suppl**, 3:315-316, 2003.

INIESTA-GONZALEZ, J. J.; LINO-LOPES, G. J.; PAULL, R. E.; DE LA ROSA, A. P. B.; MANCILLA-MARGALLI, N. A.; SANUDO-BARAJAS, J. A.; IBARRA-JUNQUERA, V.; CHEN, N. J.; HERNANDEZ-VELASCO, M. A.; OSUNA-CASTRO, J. A. Papaya endoxylanase biochemical characterization and isoforms expressed during fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, 81:13-22, 2013.

JAIN, A.; GARG, S. K.; JOHRI, B. N. Properties of a thermostable xylanase produced by *Melanocarpus albomyces* ISS-68 in solid state fermentation. **Bioresource Technology**, 64:225-228, 1998.

JIA, H.; FAN, G.; YAN, Q.; LIU, Y.; YAN, Y.; JIANG, Z. High-level expression of a hyperthermostable *Thermotoga maritime* xylanase in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **J Mol Catal B Enzym**, 78:72-77, 2012.

JOVANOVIC, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocelluloses: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellulose**, 16:687-697, 2009.

JUN, H.; BING, Y.; ZHANG, K.; DING, X.; DAIWEN, C. Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene in *Escherichia coli* and activity of the enzyme on fiber-bound substrates. **Protein Expr Purif**, 67:1-6, 2008.

JUNPEI, Z.; WU, Q.; ZHANG, R.; YANG, Y.; TANG, X.; LI, J.; DING, J.; DONG, Y.; HUANG, Z. Production and Characterization of Ethanol- and Protease-Tolerant and Xylooligosaccharides-Producing Endoxylanase from *Humicola* sp. Ly01. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23(6):794-801, 2013.

KARANGWA, E.; KHIZAR, H.; RAO, L.; NSHIMIYIMANA, D. S.; FOH, M. B. K.; LI, L.; XIA, S. Q.; ZHANG, X. M. Optimization of processing parameters for clarification of blended carrot-orange juice and improvement of its carotene content. **Advance Journal of Food Science and Technology**, 2(5):268-278, 2010.

KAMAL KUMAR, B.; BALAKRISHNAN, H. & RELE, M.V. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 31(2):83-87, 2004.

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. **Internacional Journal of Microbiology**, 8: 1-8, 2012.

KANG, M. K.; MAENG, P. J.; RHEE, Y. H. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202. **Appl Environ Microbiol**, 62:3480-3482, 1996.

KATAPODIS, P.; VRSANSKA, M.; KEKOS, D.; NERINCKX, W.; BIELY, P.; CLAEYSSENS, M.; MACRIS, B. S.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*, **Carbohydrate Research**, 338: 1881-1890, 2003.

KAUR, J.; SHARMA, R. Directed evolution: an approach to engineer enzymes. **Crit Rev Biotechnol**, 26:165-199, 2006.

KHANNA, S.; GAURI. Regulation, purification and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. **Enz Microb Technol**, 15:990-995, 1993.

KIM, D. Y.; HAN, M. K.; OH, H. W.; PARK, D. S.; KIM, S. J; SHIN, D. H.; SON, K. H.; BAE, K. S.; PARK, H. Y. Catalytic properties of a GH10 endo- β -1,4-xylanase from *Streptomyces thermocarboxydus* HY-15 isolated from the gut of *Eisenia fetida*. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, 62(1):32-39, 2010.

KUCHNER, O.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of enzyme catalysts. **Trends Biotechnol.**, 15:523-530, 1997.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.;ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Biochemical Engineering Biotechnology**, 57: 45-126, 1997.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A. & R. A. O, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 23:411-456, 1999.

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

LAFOND, M.; TAUZIN, A.; DESSEAUX, V.; BONNIN, E.; AJANDOUZ, E.; GIARDINA, T. GH10 xylanase D from *Penicillium funiculosum*: biochemical studies and xylooligosaccharide production. **Microbial Cell Factories**, 10:20-28, 2011.

LANDBO, A. K.; KAACK, K.; MEYER, A. S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 8(1):135-142, 2007.

LANDBO, A. K.; MEYER, A. S. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 73(1):55-63, 2004.

LEA, A. G. H. **Produccion y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gás**. Ed. Acribia: Espana, p.149-189, 1995.

LEE, S. F.; FORSBERG, C. W.; RATTRAY, J. B. Purification and characterization of two endoxylanases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Appl Environ Microbiol**, 53:644-650, 1987.

LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N. S. A.; BAHARIN, B. S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, 73(1):55-63, 2006.

- LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 89-94, 2000.
- LI, X.; LI, E.; ZHU, Y.; TENG, CHAO, SUN, B.; SONG, H.; YANG, R. A typical endo-xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its unique characteristics in xylooligosaccharide production. **Carbohydrate research**, 359:30-36, 2012.
- LI, X. L.; SKORY, C. D.; XIMENES, E. A. Expression of an AT-rich xylanase gene from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. stain PC-2 in and secretion of the heterologous enzyme by *Hypocrea jecorina*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74:1264-1275, 2007.
- LI, X.; LJUNGDAHL, L .G. Cloning, sequencing and regulation of a xylanase gene from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. **Applied and Environmental Microbiology**, 60:3160-3166, 1994.
- LIEW ABDULLAH, A. G.; SULAIMAN, N. M.; AROUA, M. K.; MEGAT MOHD NOOR, M. J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**, 81(1):65-71, 2007.
- LIMA, D. U.; OLIVEIRA, R. C.; BUCKERIDGE, M. O. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. **Carbohydrate Polymers**, 52:367-373, 2003.
- LIU, H. L.; WANG, W. C. Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on molecular dynamics simulations. **Protein Eng**, 16:19-25, 2003.
- LIU, M. Q.; LIU, G. F. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. **Protein Expr Purif**, 57(2):101-107, 2008.
- LU, F.; LU, M.; LU, Z.; BIE, X.; ZHAO, H.; WANG, Y. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. **Bioresour Technol**, 99(13):5938-5941, 2008.
- LUH, B. S. Nectars, pulp juice and fruit juice blends. In: **Fruit and vegetable juice processing technology**. Nelson, P.; Tressler, D. Wesport:AVI, p.436-505, 1980.
- MAGALHÃES, P. O. Purificação de hemicelulases e uma β -glicosidase de *Ceriporiopsis subvermispota* produzidas em condições de biopolpação. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, São Paulo, 2005.
- McGUIRE, R. G. Reporting of objective colour measurements. **HortScience**, 27(12):1254-1255, 1992.
- MERGULHAOA, F. J. M.; SUMMERSB, D. K.; MONTEIRO, G. A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. **Biotechnol Adv**, 23:177-202, 2005.
- MICHELIN, M.; POLIZELI, M. L. T. M.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; TEIXEIRA, J. A. A new strategy for xylanase production using wheat straw autohydrolysis liquor as substrate. **Proceedings of the 10th Internacional Chemical and Biological Engineering Conference – CHEMPOR**. Braga, Portugal, p.9, 2008.

MILAGRES, A. M. F.; PRADE, R. A. Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. **Enzyme and Microbial Technology**, 16:627-632, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31:426-428, 1959.

MILANEZI, N. V. Purificação e caracterização de uma endo-1,4- β -xilanase produzida por *Aspergillus niger* com características de interesse industrial. Tese (Mestrado), Brasília-DF, 2010.

MOLONEY, A.; COUGHLAN, M. P. Sorption of *Talaromyces emersonii* cellulase on cellulosic substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, 25:271-280, 1983.

MORAES, W. P.; FARIA, F. P.; AZEVEDO, M. O. Produção de enzimas xilanólíticas pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos. 5^o Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, p.121, 2002.

MORISON, I. M. Hemicellulose contamination of acid detergent residues in cell-wall analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 31:639-645, 1980.

MUILU, J.; TORRONEN, A.; PERAKYLA, M.; ROUVINEN, J. Functional conformational changes of endo-1,4-xylanase II from *Trichoderma reesei*: a molecular dynamics study. **Proteins**, 31(4):434-444, 1998.

MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; VIEIRA, D. S.; DEGREVE, L.; RULLER, R.; WARD, R. J. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). **FEBS Lett**, 579(28):6505-6510, 2005.

NAGAR, S.; MITTAL, A.; GUPTA, V. K. Enzymatic clarification of fruit juices (apple, pineapple and tomato) using purified *Bacillus pumillus* SV-85S xylanase. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 17:1165-1175, 2012.

NAKAMURA, S. Structure and function of a multidomain alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1. **Catalysis Surveys from Asia**, 7:157-164, 2003.

NARANG, S.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS68 in solid state fermentation using response surface methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 91(4): 425 - 427, 2001.

NOVO DISK FERMENT. **Ficha Técnica, Novo AFP – L**. Genebra, 2001.

OLIVEIRA, M. C. S. D.; SILVA, N. C. C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 26:906-915, 2006.

OKAZAKI, F.; NAKASHIMA, N.; OGINO, C.; TAMARU, Y.; KONDO, A. Biochemical characterization of a thermostable β -1,3-xylanase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* strain DSM 4359. **Appl Microbiol Biotechnol**, 97:6749-6757, 2013.

OZKAN, M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. **Food Chemistry**, 78(4):499-504, 2002.

PAICE, M. G.; BERNIER, R.; JURASEK, L. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. **Biotechnology and Bioengineering**, 32: 235-239, 1988.

PAL, A.; KHANUM, F. Characterization and improving the thermostability of purified xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 grow on solid-state-medium. **J Biochem Tech**, 2(4):203-209, 2010.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modifications as a resource for biofuels. **Plant Journal**, 54:559-568, 2008.

PENSTONE, K. Zooming in on enzymes. **Food Rev**, 23:36-41, 1996.

PEREIRA, J. L.; NORONHA, E. F.; MILLER, R. N. G.; FRANCO, O. L. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. **Letters in Applied Microbiology**, 44:573-581, 2007.

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 67: 577-591, 2005.

POLLET, A.; VANDERMARLIERE, E.; LAMMERTYN, J.; STRELKOV, S. V.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Crystallographic and activity based evidence for thumb flexibility and its relevance in glycoside hydrolase family 11 xylanases. **Proteins**, 77(2):395-403, 2009.

POUTANEM, K. Enzymes and important tool in the improvement of the quality of cereal food. In: **Trends in Food Science Technology**, 8 ed. Woodhead Publishing:Cambridge, p.300-306, 1997.

PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, 13:100-131, 1995.

PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e sucos de frutas ácidas. **Ciênc Tecnol Aliment**, 25(1):147-152, 2005.

PULS, J.; SCHRODER, N.; STEIN, A.; JANZON, R.; SAAKE, B. Xylans from oat spelts and birch kraft pulp. **Macromolecular Symposia**, 232:85-92, 2006.

QURESHY, A. F.; KHAN, L. A.; KHANNA, S. Cloning, regulation and purification of cellulose-free xylanase from *Bacillus circulans* Teri-42. **Ind J Microbiol**, 42:35-41, 2002.

RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHARAN, U.; GAUD, V. R.; MISHRA, R. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 31(9):433-441, 2004.

RAJAGOPALAN, G.; YEW, K. W.; HE, J.; YANG, K. L. Production, purification and characterization of a xylooligosaccharides-forming xylanase from high-butanol-producing strain *Clostridium* sp. BOH3. **Bioenerg. Res.**, 6:448-457, 2013.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, 26:863-871, 2003.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, 8:423-488, 1992.

RYTTERSGAARD, C.; LO LEGGIO, L.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; LARSEN, S. *Aspergillus aculeatus* beta-1,4-galactanase: substrate recognition and relations to other glycoside hydrolases in clan GH-A. **Biochemistry**, 41: 15135–15143, 2002.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 30:279-291, 2003.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proleferatum*. **Process Biochemistry**, 37(11):1279-1284, 2002.

SAHA, B. C. Xylanase from a newly isolated *Fusarium verticillioides* capable of utilizing corn fiber xylan. **Appl Microbiol Biotechnol**, 56:762-766, 2001.

SALAMA, M. A.; ISMAIL, M. I.; AMANY, H. A.; EL-LILL, A.; GEWEELY, N. S. I. Biochemical studies of purified extracellular xylanases from *Aspergillus versicolor*. **Internacional Journal of Botany**, 4(1):49-55, 2008.

SCHOENLECHNER, R.; SZATMARI, M.; BAGDI, A.; TOMOSKOZI, S. Optimisation of Bread quality produced from wheat and poroso millet (*Panicum miliaceum* L.) by adding emulsifiers, transglutaminase and xylanase. **LWT- Food Science Technology**, 51:361-366, 2013.

SEBESS, P. Ação da levedura na fermentação. In: **Técnicas de Padaria Profissional**. Rio de Janeiro: SENAC Nacional, p. 56-66, 2010.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial Hemicellulases, **Current Opinion in Microbiology**, 6: 219-228, 2003.

SHARMA, M.; KUMAR, A. Xylanases: an overview. **British Biotechnology Journal**, 3(1):1-28, 2013.

SIN, H. N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; RAHMAN, R. A. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, 73(4):313-319, 2006.

SINGH, S.; REDDY, P.; HAARHOFF, J.; BIELY, P.; JANSE, B.; PILLAY, B.; PILLAY, D.; PRIOR, B. A. Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase. **J. Biotechnol**, 81:119-128, 2000.

SOMERVILLE, C. Biofuels. **Current Biology**, 17:R115-R119, 2007.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, 115:113-128, 2005.

SOUZA, M. C. O.; ROBERTO, I.C.; MILAGRES, A. M. F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**, 52: 768 – 772, 1999.

SREENATH, H. K.; SANTHANAM, K. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 73(3):241-243, 1992.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22(1):33-64, 2002.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, 56:195-204, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83:1-11, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, 17: 39-67, 1997.

TANRIOVEN, D.; EKSI, A. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. **Food Chemistry**, 93(1):89-93, 2005.

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

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; SARTO, C.; SILVA JUNIOR, F. G.; CARMONA, E. C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: production, physico-chemical properties and application of the crude extract to pulp biobleaching. **Bioresources**, 8(1):1292-1305, 2013.

TIKHOMIROV, D. F., SINITSYN, A. P., ZOROV, I. N.; WILLIAMS, C. Non-starch polysaccharide hydrolysing microbial enzymes in grain processing. In: **Recent Advances in Enzymes in Grain Processing** (Courtin, C.M., Veraverbeke, W.S.; Delcour, J.A., Eds.) Kat. Univ. Leuven: Leuven, p. 413-41, 2003.

TORRONEN, A.; ROUVINEN, J. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-beta-xylanases. **J Biotechnol**, 57(1):137-149, 1997.

TORRONEN, A.; KUBICEK, C. P.; HENRISSAT, B. Amino acid sequence similarities between low molecular weight endo-1,4- β -xylanases and family H cellulases revealed by clustering analysis. **FEBBS Lett**, 321:135-139, 1993.

TREVIZANO, L. M. Produção e caracterização de xilanases mutantes derivadas do gene *xynA* de *Orpinomyces* melhoradas para aumento da estabilidade térmica e de pH. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa – MG. 2013.

TREVIZANO, L. M.; VENTORIM, R. Z.; REZENDE, S. T.; SILVA JUNIOR, F. P.; GUIMARAES, V. M. Thermostability improvement of *Orpinomyces* sp. xylanase by directed evolution. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 81:12-18, 2012.

TREVIZANO, L. M. Melhoramento por evolução dirigida da termoestabilidade da xilanase *xynA* de *Orpinomyces* sp. PC-2. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa-MG. 2009.

TURUNEN, O.; VUORIO, M.; FENEL, F.; LEISOLA, M. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. **Protein Eng**, 15:141-145, 2002.

TURUNEN, O.; ETUAHO, K.; FENEL, F.; VEHEMAANPERA, J.; WU, X. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the alpha-helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase II increases the thermal stability through synergism. **J Biotechnol**, 88:37-46, 2001.

UJIE, M.; ROY, C.; YAGUCHI, M. Low-molecular-weight xylanase from *Trichoderma viride*. **Appl Environ Microbiol**, 57(6):1860-1862, 1991.

VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P.; TOPAKAS, E. Purification, characterization and mass spectrometric identification of two thermophilic xylanases from *Sporotrichum thermophile*. **Process Biochemistry**, 45:419-424, 2010.

VAN DER BROECK, H. C.; DE GRAAF, L. L.; HILLE J. D. R.; VAN OOYN, A. J. J.; VESSER, J.; HARDER, A. A cloning and expression of fungal xylanase genes and use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. European Patent Ap., 90/202,020, 1990.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología**. Ed. Acribia S.A., Espana, 487 p., 1994.

VIEIRA, D. S.; DEGREVE, L.; WARD, R. J. Characterization of temperature dependent and substrate-binding cleft movements in *Bacillus circulans* family 11 xylanase: a molecular dynamics investigation. **Biochim Biophys Acta**, 1790(10):1301-1306, 2009.

VIIKARI, L.; KANTELINEM, A.; SUNDQUIST, J. & LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, 13: 335-350, 1994.

VIIKARI, L. Pulp and the environment. Paperi ja Puu- Paper and Timber, 73:384- 389, 1991.

VERMA, D.; KAWARABAYASI, Y.; MIYAZAKI, K.; SATYANARAYANA, T. Cloning, Expression and Characteristics of a Novel Alkalistable and Thermostable Xylanase Encoding Gene (*MyxI*) Retrieved from Compost-Soil Metagenome. **Plos One**, 8:1-9, 2013.

WAKARCHUK, W. W.; CAMPBELL, R. L.; SUNG, W. L.; DAVOODI, J.; YAGUCHI, M. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. **Protein Sci**, 3(3):467-475, 1994.

WANG, Z.; JIN, Y.; WU, H.; TIAN, Z.; WU, Y.; XIE, X. A novel alkali-tolerant thermostable xylanase from *Saccharomonospora viridis*: direct gene cloning, expression and enzyme characterization. **World J Microbiol Biotechnol**, 28:2741-2748, 2012.

WEEGELS, P. L.; MARSEILLE, J. P.; HAMER, R. J. Enzymes as a processing aid in the separation of wheat flour into starch and gluten. **Starch/Stark**, 44(2):44-48, 1992.

WIGHTMAN, J. D.; WROLSTAD, R. E. b-glucosidase activity in juice-processing enzymes based on anthocyanin analysis. **Journal of Food Science**, 61(3): 544-548, 1996.

WILLIAMS, G. J.; DOMANN, S.; NELSON, A.; BERRY, A. Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100:3143-3148, 2003.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, 52: 305-317, 1988.

WONG, T. S.; TEE, K. L.; HAUER, B.; SCHWANEBERG, U. Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. **Nucleic Acids Res.**, 32:e26, 2004.

WYMAN, C. E.; DECKER, J. W.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. In: **Polysaccharides** (Dekker, M.), Dimitriu:New York, p.995-1034, 2005.

XUE, G. P.; DENMAN, S. E.; GLASSOP, D.; JOHNSON, J. S.; DIERENS, L. M.; GOBIUS, K. S.; AYLWARD, J. H. Modification of a xylanase cDNA isolated from an anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum* for high-level expression in *Escheria coli*. **J Biotechnol**, 38:269-277, 1995.

YIN, L. J.; LIN, H. H.; CHIANG, Y. I.; JIANG, S. T. Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(1):557-562, 2010.

ZHANG, G. M.; HUANG, J.; HUANG, G. R.; MA, L. X.; ZHANG, X. E. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74(2):339-346, 2007.

ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T.; TANG, M.; TENKANEN, M.; VIKARI, I. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in hydrolysis and pretreated wheat straw. **Biotechnol Biofuels**, 4(1):12-24, 2011.

ZHANG, Z. G.; YI, Z. L.; PEI, X. Q.; WU, Z. L. Improving the thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* xylanase XT6 by directed evolution and site-directed mutagenesis. **Bioresource Technology**, 101:9272-9278, 2010.

ZHAO, H.; KWAK, J. H.; ZHANG, Z. C.; BROWN, H. M.; AREY, B. W.; HOLLADAY, J. E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, 68(2):235-241, 2007.

ZHAO, Y.; MENG, K.; LUO, H.; HUANG, H.; YUAN, T.; YANG, P.; YAO, B. Molecular and biochemical characterization of a new alkaline active multidomain xylanase from alkaline wastewater sludge. **World J Microbiol Biotechnol**, 29:327-334, 2013.

ZHOU, C.; BAI, J.; DENG, S.; WANG, J.; ZHU, J.; WU, M.; WANG, W. Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usarii* and its expression in *Escherichia coli*. **Bioresour Technol**, 99:831-838, 2008.