

LETÍCIA PERSILVA FERNANDES

**PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS POR XILANASE FÚNGICA
RECOMBINANTE IMOBILIZADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Gabriela Píccolo Maitan-Alfenas

Coorientadora: Rafaela Zandonade Ventorim

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F363p
2022

Fernandes, Letícia Persilva, 1992-

Produção de xilooligossacarídeos por xilanase fúngica recombinante imobilizada / Letícia Persilva Fernandes. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (44 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Gabriela Pícolo Maitan-Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 39-44.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.639>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Hidrolases. 2. Enzimas - Aplicações industriais.
3. Hidrólise. 4. Endoxilanase. 5. Xilooligossacarídeos.
I. Maitan-Alfenas, Gabriela Pícolo, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.793

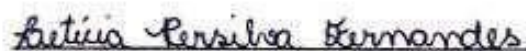
LETÍCIA PERSILVA FERNANDES

**PRODUÇÃO DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS POR XILANASE FÚNGICA
RECOMBINANTE IMOBILIZADA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2022.

Assentimento:



Leticia Persilva Fernandes

Autora



Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas

Orientadora

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família pelo apoio, palavras de incentivo, amparo e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração, reflexão e de tornar os dias mais leves.

A minha orientadora e coorientadora por todo o apoio científico, pelos ensinamentos, pela paciência e orientação.

Aos meus colegas de laboratório, técnicos e todas as pessoas que passaram pela minha vida nesse tempo pela contribuição para a obtenção dos resultados e para o meu crescimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

RESUMO

FERNANDES, Letícia Persilva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Produção de xilooligossacarídeos por xilanase fúngica recombinante imobilizada.** Orientadora: Gabriela Píccolo Maitan-Alfenas. Coorientadora: Rafaela Zandonade Ventorim.

A endoxilanase é uma enzima que hidrolisa a cadeia de xilana formando xilooligossacarídeos (XOS) menores que são ingredientes prebióticos com potencial aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Entretanto, o uso de enzimas na indústria pode ser limitado devido ao seu alto custo; portanto, faz-se necessário o uso de metodologias como a imobilização, que torna possível a recuperação da enzima, sua reutilização e melhora das características físico-químicas enzimáticas, de acordo com o processo desejado. O objetivo deste trabalho foi produzir XOS por uma xilanase fúngica engenheirada imobilizada. Para isso, a xilanase do fungo *Orpinomyces* sp., SM2, foi expressa em *Escherichia coli* e, após a expressão, foi realizada a imobilização do extrato bruto diluído 100 vezes pela metodologia de *cross-linking* com isopropanol 80 % e glutaraldeído 1 %. Então, fez-se o ensaio de pH ótimo, temperatura ótima e a termoestabilidade a 50 °C, para comparação das formas livre e imobilizada da enzima. Foi aplicado 1 U do agregado enzimático na sacarificação do farelo de arroz pré-tratado alcalinamente com NaOH 1 %. Alíquotas foram coletadas para a avaliação do perfil dos XOS. Por fim, realizou-se o teste de reutilização da enzima imobilizada na temperatura de 50 °C, por 10 ciclos, e o ensaio de armazenamento por 15 dias em temperatura ambiente e à 4 °C. O rendimento de imobilização foi de 1,48 %. A enzima imobilizada obteve melhor atividade na faixa de pH ácida para neutra, sendo 5 o seu pH de máxima atividade; enquanto que a enzima livre apresentou melhor desempenho na faixa básica e seu pH ótimo foi 8. A temperatura ótima foi de 60 °C para as duas enzimas, porém a xilanase imobilizada apresentou melhor estabilidade em uma faixa maior de temperatura. O tempo de meia vida da xilanase SM2 imobilizada foi de 216 horas e o da enzima livre de 30 horas. No ensaio de sacarificação, após 96 horas, houve a produção de $0,903 \pm 0,013$ g/L de xilobiose, $0,487 \pm 0,000$ g/L de xilotriose e $0,809 \pm 0,006$ g/L de xiloexose pela enzima imobilizada. Para o teste de reutilização, a atividade enzimática aumentou a cada ciclo, e no ensaio de armazenamento não houve diferença estatística nas atividades enzimáticas para as duas condições testadas. Portanto, conclui-se que apesar do baixo rendimento de imobilização da xilanase SM2, este processo melhorou a estabilidade da enzima, tornando-a mais estável em temperaturas mais altas, e aumentando o tempo de meia vida para

mais de 7 vezes em comparação com a xilanase livre no ensaio de termoestabilidade. Na sacarificação, mesmo com uma concentração baixa de xilanase imobilizada, houve hidrólise do farelo de arroz pré-tratado, com liberação de XOS. Por fim, foi demonstrado que a enzima imobilizada pode ser reutilizada por mais de 10 ciclos, e como não houve diferença entre as duas formas de armazenamento, sugere-se que não há necessidade de refrigeração para manutenção da atividade da xilanase imobilizada.

Palavras-chave: Xilanase. Expressão heteróloga. Imobilização. Xilooligossacarídeos.

ABSTRACT

FERNANDES, Letícia Persilva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **Xylooligosaccharides production by immobilized recombinant fungal xylanase**. Advisor: Gabriela Píccolo Maitan-Alfenas. Co-advisor: Rafaela Zandonade Ventorim.

Endoxylanases hydrolyze the xylan chain releasing smaller xylooligosaccharides (XOS). XOS are prebiotic ingredients with potential application in the food and pharmaceutical industries. However, the use of enzymes in the industry can be a limiting factor due to their high costs. Therefore, it is necessary to use methodologies such as immobilization that makes it possible to recover and reuse the enzyme several times and also to improve the enzymatic physicochemical characteristics according to the process. The purpose of this work was to produce XOS by an engineered and heterologously expressed immobilized fungal xylanase. For this, the SM2 xylanase from *Orpinomyces* sp. was expressed in *Escherichia coli*. After expression, the immobilization of the crude extract 100 times diluted was performed by the cross-linking methodology with 80 % isopropanol and 1 % glutaraldehyde. Then, the optimal pH, the optimal temperature and the thermostability at 50 °C assays were performed for the free and immobilized xylanase. 1 U of the enzymatic aggregate was applied for the saccharification of rice bran, pretreated with 1 % NaOH. Aliquots were collected for the evaluation of the XOS profile. Finally, the reuse test was carried out at temperature of 50 °C for 10 cycles and storage assay was performed for 15 days at room temperature and at 4 °C. The immobilization yield was 1.48 %. The immobilized enzyme showed better activity in the acidic to neutral pH range, with maximal activity at pH 5, while the free xylanase showed better performance in the basic range of pH, and its optimal pH was 8. The optimal temperature was 60 °C for both enzymes, but the immobilized xylanase showed better stability over a wider temperature range. The half-life of immobilized xylanase SM2 was 216 horas and the free enzyme showed half-life of 30 hours. After 96 hours of saccharification, there was release of 0.903 ± 0.013 g/L of xylobiose, 0.487 ± 0.000 g/L of xylotriose and $0,809 \pm 0.006$ g/L of xylohexose by the immobilized xylanase. In the reuse test, the enzymatic activity increased with each cycle and the storage assay showed that there was no statistical difference in the activities between the two tested temperatures. Therefore, it is concluded that despite the low immobilization yield of SM2 xylanase, the process improved the stability of the enzyme, making it more stable at higher temperatures and increasing the half-life to more than 7 times, compared to free xylanase for the thermostability test. For the saccharification assay, even using low concentration of

immobilized xylanase, it was able to hydrolyze the pre-treated rice bran. The reuse test showed that there was an increase in the enzymatic activity. Finally, as the storage assay demonstrated that there was no difference between the two forms of storage, it is suggested that there is no need for refrigeration to maintain the enzymatic activity of the immobilized xylanase.

Keywords: Xylanase. Heterologous expression. Immobilization. Xylooligosaccharides

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado da composição e hidrólise da xilana com as principais enzimas envolvidas no processo 13
- Figura 2.** Esquema de métodos de imobilização de enzimas 16
- Figura 3.** Esquema geral do processo de imobilização por formação de agregados enzimáticos reticulados. Adaptado de RAMOS, 2017. 17
- Figura 4.** Efeito do pH na atividade da xilanase SM2 livre e imobilizada. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem da atividade enzimática máxima sob condições de ensaio padrão. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas. 28
- Figura 5.** Efeito da temperatura na atividade da xilanase SM2 livre e imobilizada em pH 6,5. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem da atividade enzimática máxima sob condições de ensaio padrão. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas 29
- Figura 6.** Termoestabilidade a 50 °C das enzimas imobilizada e livre. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem da atividade enzimática máxima sob condições de ensaio padrão. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas. 30
- Figura 7.** Produção de XOS a partir da hidrólise do farelo de arroz pré-tratado pela xilanase SM2 imobilizada a 50 °C, 150 rpm, por 96 horas. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas. 32
- Figura 8.** Atividade relativa da xilanase SM2 imobilizada após cada ciclo de reutilização a 50 °C, por 10 minutos, totalizando 10 ciclos. 34
- Figura 9.** Avaliação da estabilidade da xilanase SM2 imobilizada durante o armazenamento sob refrigeração (4 °C) e à temperatura ambiente por 15 dias. 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Enzimas	12
2.2 Xilanases	13
2.3 Imobilização de enzimas	15
2.3.1 CLEA: <i>cross-linked enzyme aggregates</i>	17
2.4 Xilooligossacarídeos	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Geral.....	20
3.2 Específicos	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Cultivo e manutenção de <i>Escherichia coli</i>	21
4.2 Atividade de xilanase livre e imobilizada	21
4.3 Imobilização da Xilanase	22
4.4 Caracterização bioquímica da xilanase imobilizada e livre	23
4.4.1 Efeito da temperatura.....	23
4.4.2 Efeito do pH.....	23
4.4.3 Análise da termoestabilidade da xilanase imobilizada.....	23
4.5 Testes de reutilização da xilanase imobilizada	23
4.6 Teste de armazenamento da xilanase imobilizada	24
4.7 Biomassa	24
4.8 Pré-tratamento alcalino da biomassa lignocelulósica	24
4.8.1 Hidrólise enzimática	24
4.8.2 Quantificação de xilooligossacarídeos (XOS) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	25
4.9 Teste estatístico	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Expressão da xilanase SM2.....	26
5.2 Imobilização da xilanase SM2 pelo método CLEA	26
5.3 Temperatura e pH ótimos.....	28
5.4 Termoestabilidade	30
5.5 Sacarificação do farelo de arroz para produção de xilooligossacarídeos.....	31
5.6. Reutilização.....	34
5.7 Armazenamento	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Xilooligossacarídeos (XOS) são oligômeros de açúcares composto pela unidade de xilose a partir de ligações β -1,4 xilosídica e são encontrados em biomassas lignocelulósicas onde a xilana compõe a maior parte da hemicelulose (SANTIBÁÑEZ *et al.*, 2021).

Os XOS de cadeia curta, de 2 a 6 monômeros de xilose, são de interesse na indústria alimentícia, como ingredientes para os alimentos, pois são considerados prebióticos (MANO *et al.*, 2018). Prebióticos é um grupo de nutrientes resistentes a digestão no trato digestivo superior de mamífero, a fermentação é realizada somente pela microbiota intestinal, apresenta benefícios para saúde do hospedeiro, bem como para a saúde do intestino, reduzindo a constipação intestinal, prevenindo infecções gastrointestinais, melhorando a digestão e a absorção de nutrientes e inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos, estimulando a seleção do crescimento de probióticos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e por fim, são resistentes as várias condições de processos de produção de alimentos (JAIN *et al.*, 2015; MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017).

A xilanase ou endo β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) hidrolisa as ligações xilosídicas na cadeia de xilana e produz xilooligossacarídeos menores (DE QUEIROZ BRITO CUNHA *et al.*, 2018). A produção de xilanases por microrganismos apresenta várias vantagens para aplicações industriais em função do fácil cultivo e manutenção da cultura, além de rápida velocidade de crescimento (MELLITZER *et al.*, 2012). A xilanase SM2 foi desenvolvida a partir da engenharia genética da xilanase do fungo *Orpinomyces sp* PC-2, em que foi realizado o estudo de evolução dirigida para aumentar a termoestabilidade. Dentre os mutantes obtidos, o M2 foi escolhido, então foi removido 27 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal, essa variante de menor tamanho a SM2 foi clonada e expressa em *E. coli*. Dessa maneira, a SM2 apresentou melhora na estabilidade térmica e eficiência na hidrólise de arabinoxilana em comparação à selvagem, apresentando possibilidade de aplicação na indústria de panificação (TREVIZANO *et al.*, 2012; VENTORIM *et al.*, 2018; PASSARINHO *et al.*, 2018). Por fim, nos estudos realizados por ALMEIDA (2022), a SM2 apresentou eficiência para a hidrólise de biomassas lignocelulósicas para a produção de XOS, demonstrando a possibilidade de aplicação na indústria de alimentos.

A utilização de enzimas nas indústrias é carregada de diversas vantagens, porém o rígido controle das propriedades enzimáticas como estabilidade, eficiência catalítica e especificidade

dificulta a aplicação, sendo necessária a adoção de estratégias para tornar as enzimas mais adequadas às condições empregadas nos processos industriais. Algumas dessas estratégias são a engenharia genética e a imobilização enzimática (CHOI; HAN; KIM, 2015). A imobilização consiste em aprisionar a enzima de interesse, ou ligar covalentemente, ou adsorver a biomolécula em um suporte. O método de imobilização depende das características físico-químicas da enzima e das propriedades dos substratos e dos produtos, de forma que as condições ótimas são determinadas empiricamente e toda metodologia possui limitações. Além de permitir a recuperação e a reutilização da enzima no processo, a imobilização também pode promover a estabilização da enzima e até mesmo melhorar a eficiência catalítica (SOUZA *et al.*, 2017).

Dessa maneira, há um grande interesse em se obter xilanases com alta especificidade e bom rendimento de catálise para a obtenção de XOS, além de uma metodologia associada às suas aplicações que torne possível a reutilização enzimática, visando à diminuição dos custos para tornar este processo de aplicação biotecnológica economicamente viável.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram a produção e a imobilização da xilanase de *Orpinomyces sp. PC-2*, expressa em *Escherichia coli*, para a produção de XOS. As atividades das enzimas livre e imobilizada foram caracterizadas e comparadas, e as enzimas imobilizadas foram aplicadas em biomassas lignocelulósicas residuais pré-tratadas para produção de XOS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, altamente específicos, que facilitam as reações que ocorrem nos sistemas biológicos, tornando-as essenciais para a vida dos seres vivos, já que diminuem o tempo das reações. Além disso, são definidas como biocatalisadores versáteis, apresentando alto nível de eficiência e não são consumidas durante o processo reacional do qual participam. Todas essas características das enzimas geram vantagens comparadas aos catalisadores químicos convencionais (KRAJEWSKA, 2004; MOHAMAD *et al.*, 2015; PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016).

As enzimas são aplicadas em diversos setores da indústria, incluindo de detergentes, alimentícia e alimentos processados, produção de polpa e papel, farmacêutica, têxtil, dentre outras. O mercado global de enzimas está em ampla expansão, em 2020 foi avaliado em 10,69 bilhões de dólares e espera-se alcançar 20,31 bilhões de dólares em 2030 e crescer 6,5 % anualmente até 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2021). Elas são vantajosas em relação a processos com tratamentos químicos, pois as reações enzimáticas são altamente específicas, ocorrem em condições amenas, são isentas de etapas adicionais e formam menos subprodutos (AL-GHANAYEM; JOSEPH, 2020; BAJAJ; MAHAJAN, 2019b; RAY; PRAMANIK; BERA, 2016).

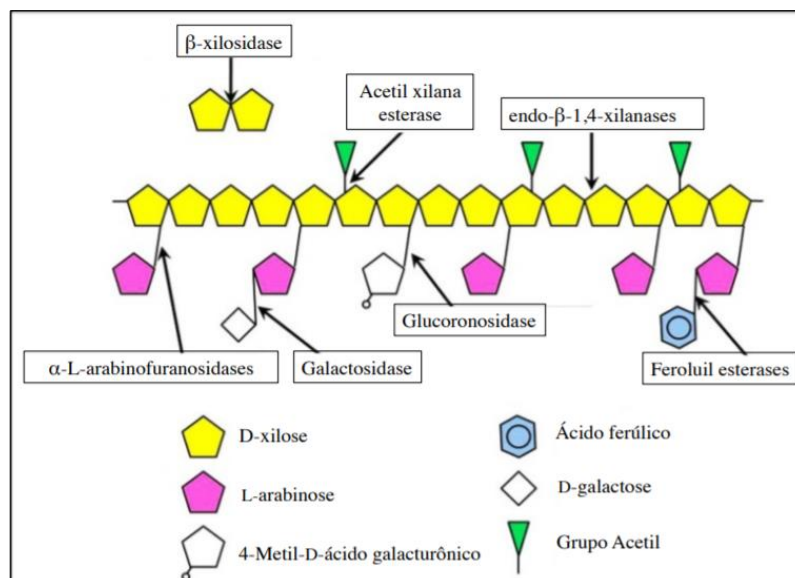
A maioria das enzimas aplicadas nas indústrias são de origem microbiana, e apresentam muitas vantagens em comparação com enzimas de plantas e de animais. Enzimas microbianas são mais econômicas devido à quantidade absoluta produzida de enzimas em um curto espaço de tempo, além da facilidade de extração, pois os microrganismos podem secretar estas biomoléculas. As vantagens técnicas incluem enzimas mais estáveis, além da maior facilidade na modificação genética dos microrganismos para produção de enzimas novas ou alteradas com métodos relativamente simples e, finalmente, há vantagens éticas, pois, a manipulação genética de animais e plantas ainda é uma preocupação (ROBINSON, 2015; YAMAGUCHI, 2017).

2.2 Xilanases

A xilana compõe a hemicelulose, que é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza e corresponde a um terço das fontes renováveis de carbono na Terra (CHAKDAR *et al.*, 2016). A estrutura da xilana pode variar de acordo com a planta de origem, e sua cadeia principal pode ser substituída por cadeias laterais com vários grupos, e em diferentes posições (BOUACEM *et al.*, 2014). Dessa maneira, devido à heterogeneidade e à complexidade da estrutura da xilana, se faz necessário um conjunto de enzimas cooperativas, que juntamente com as xilanases, catalisam a sua completa degradação (WANG *et al.*, 2014).

As endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) são as principais enzimas que degradam a xilana e elas realizam este processo de maneira aleatória, no interior da cadeia principal de xilana, culminando com a liberação de xilooligossacarídeos (DE QUEIROZ BRITO CUNHA *et al.*, 2018). Já as β -xilosidases hidrolisam a xilobiose e os xilooligossacarídeos menores, levando à liberação de resíduos de β -D-xilopiranosil, ou xilose. Conforme acontece a hidrólise da xilana pelas xilanases e a formação de xilooligossacarídeos, o acúmulo destes oligômeros inibe a ação das endo-xilanases; desta maneira, as β -xilosidases hidrolisam esses oligômeros e aumentam a eficiência da hidrólise da xilana até sua degradação total (Figura 1) (POLIZELI *et al.*, 2005).

Figura 1. Esquema simplificado da composição e hidrólise da xilana com as principais enzimas envolvidas no processo



Fonte: Cintra (2016)

Existe uma categorização das enzimas em famílias com base em seus domínios catalíticos e sequência de aminoácidos, de acordo com o banco de dados Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy – <http://www.cazy.org/>), em que as xilanases estão nas famílias das glicosil-hidrolases (GH): GH 5, GH 10, GH 11 e GH 30. As xilanases da família GH 10 são mais complexas, podendo ser altamente glicosiladas, e normalmente apresentam a topologia em barril tipo $\alpha/\beta 8$. Já as xilanases da família GH 11 são mais consistentes estruturalmente, possuem um peso molecular menor, não são glicosiladas, apresentam normalmente uma topologia *jelly-roll*. Além disso, normalmente as xilanases da família GH 11 apresentam maior interesse biotecnológico devido à sua maior afinidade ao substrato xilana, além de serem descritas como enzimas de maior estabilidade e atividade em diferentes valores de pH e temperatura. Os interesses biotecnológicos pelas xilanases das famílias GH 5 e GH 30 são mais recentes. As endoxilanases GH 5 são usadas para a degradação de xilanases com alto índice de substitutos de arabinose para a produção de arabinoxilooligossacarídeos e a da família GH 30 possui duas subfamílias (7 e 8) que hidrolisam glucuronoxilana (GOMES, 2014; GOWDHAMAN, 2019; MORALES *et al.*, 2022).

Xilanases podem ser produzidas por bactérias, fungos, algas marinhas, leveduras, protozoários, crustáceos, caramujos, insetos, dentre outros organismos (ÁLVAREZ-CERVANTES *et al.*, 2016; CHAKDAR *et al.*, 2016; LIAB *et al.*, 2000). Xilanases bacterianas possuem pH ótimo numa faixa entre o pH neutro e o pH alcalino, enquanto as xilanases produzidas por fungos normalmente apresentam máxima atividade em valores de pH mais ácidos (ALOKIKA; SINGH, 2019). As xilanases microbianas apresentam maior apelo industrial devido ao seu grande potencial de escalonamento para diversos processos, incluindo: clarificação de sucos e cervejas, branqueamento de papel na indústria de celulose, extração de óleos de plantas, processamento de ração animal, produção de biocombustíveis, além da produção de prebióticos para alimentação humana e animal (ALOKIKA; SINGH, 2019; BAJAJ; MAHAJAN, 2019b).

Entretanto, a produção de xilanases para aplicação na indústria tem sido impedida devido ao seu alto custo; por isso é necessário buscar alternativas mais econômicas e com bom rendimento de produção (WALIA *et al.*, 2017). Atualmente, com as várias técnicas em biologia molecular e em engenharia genética, tem-se permitido obter enzimas mais estáveis e eficientes modificando-se os genes associados à sua expressão (BEG *et al.*, 2001). A partir da engenharia genética, desenvolveu-se uma xilanase mutante, proveniente do fungo *Orpinomyces sp.* PC-2, em que 27 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal foram retirados, obtendo uma enzima

com maior atividade e melhor estabilidade térmica em relação à selvagem, sendo denominada SM2 (PASSARINHO *et al.*, 2019; TREVIZANO *et al.*, 2012; VENTORIM *et al.*, 2018b).

2.3 Imobilização de enzimas

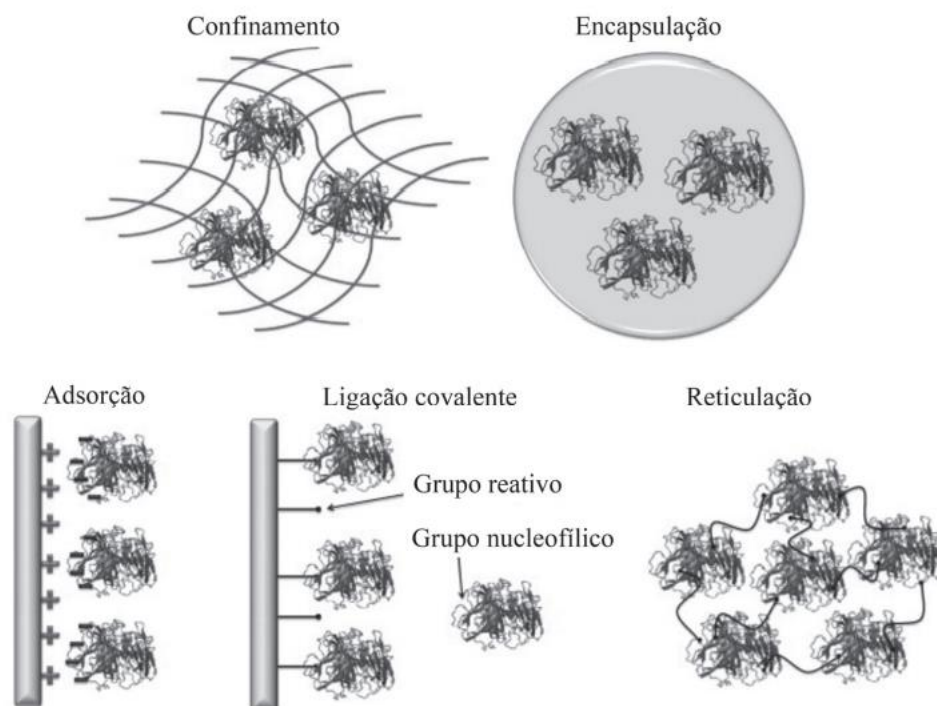
Para que a aplicação das enzimas em setores industriais se torne economicamente viável, é necessário desenvolver processos para sua recuperação e a reutilização. A imobilização enzimática é uma maneira de alcançar os objetivos anteriores, além de conseguir estabilizar a enzima, já que o processo pode alterar as propriedades intrínsecas da biomolécula e, desta maneira, produzir biocatalisadores com elevada atividade, especificidade e maior estabilidade (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; SOUZA *et al.*, 2017). As enzimas imobilizadas, quando comparadas com as solúveis, são mais resistentes a mudanças do meio reacional relativas à temperatura, pH e presença de solventes orgânicos, além de serem facilmente separadas do produto da reação e poderem atuar com a interrupção da reação quando necessário. Por fim, a imobilização é também mais vantajosa por possibilitar a condução de processos contínuos (BRADY; JORDAAN, 2009; MATEO *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2011)

Existem diversas metodologias de imobilização enzimática (Figura 2), com suportes e eficiência diferentes, porém não existe uma metodologia que consiga englobar todas as enzimas, pois cada enzima possui a sua característica físico-química, tornando necessário o conhecimento prévio das características do suporte, do seu efeito na ação da enzima que será imobilizada e do objetivo da imobilização. O ideal é que se encontre uma técnica simples e de baixo custo para imobilização do biocatalisador de interesse (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009).

A imobilização consiste em um aprisionamento da enzima em um suporte, que pode ser um polímero inerte ou um composto inorgânico. Existem quatro principais técnicas: (i) imobilização por ligações covalentes, em que a enzima interage com grupos funcionais do suporte (imidazol e indolil) pela sua cadeia lateral de aminoácidos como arginina, ácido aspártico ou histidina; (ii) imobilização por adsorção, caracterizada por interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas entre o suporte e a enzima; (iii) imobilização por afinidade, que explora a afinidade entre a enzima e a matriz; e (iv) imobilização por aprisionamento, em que a enzima é confinada em géis ou fibras (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013).

O suporte é um item importante na imobilização de enzimas, pois é ele que garante em grande parte o bom desempenho da ação enzimática. As características principais necessárias a serem observadas em um suporte são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano e resistência mecânica. Eles podem ser de materiais orgânicos, como a quitosana, ou sintéticos (ANSARI; HUSAIN, 2012; GUPTA *et al.*, 2011; KIM; GRATE; WANG, 2006; MENDES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2017).

Figura 2. Esquema de métodos de imobilização de enzimas



Fonte: (SOUZA *et al.*, 2017)

Além das técnicas de imobilização de enzimas, em que é necessário um suporte, há também a técnica de ligação cruzada entre as enzimas, na qual são formados agregados enzimáticos reticulados (CLEAs, do inglês: *cross-linked enzyme aggregates*) (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; FURLANI *et al.*, 2020).

2.3.1 CLEA: *cross-linked enzyme aggregates*

A técnica de imobilização sem suporte foi inicialmente estudada por Quicho e Richards (1966), que descobriram que as enzimas precipitadas insolúveis poderiam ser ligadas entre si por agentes bifuncionais, como o glutaraldeído, formando os agregados enzimáticos reticulados. Os agregados insolúveis podem ser formados por enzimas não purificadas e é baseado no fenômeno de precipitação induzida por sais inorgânicos, polímeros ou solventes orgânicos, em que a preservação da atividade catalítica é crucial e, após a precipitação, o agente bifuncional é utilizado para realizar as ligações covalentes entre as moléculas (Figura 3) (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; VELASCO-LOZANO *et al.*, 2016).

Figura 3. Esquema geral do processo de imobilização por formação de agregados enzimáticos reticulados. Adaptado de RAMOS, 2017.



Este tipo de imobilização tem ganhado importância por ser uma técnica fácil de ser executada, de baixo custo, eficaz e que evita a perda da atividade enzimática original, melhora a eficiência catalítica, e a estabilidade ao pH, à temperatura e aos solventes orgânicos (DONG CUI *et al.*, 2020). Além disso, é possível alimentar um biorreator com mais enzimas por não requerer um suporte de imobilização, o qual ocuparia um certo volume do reator (HERO *et al.*, 2018).

2.4 Xilooligossacarídeos

Xilooligossacarídeos (XOS) são oligossacarídeos de xilose, que contêm de 2 a 20 unidades deste monômero, e são encontrados naturalmente em frutas, vegetais, mel, leite, ou em plantas ricas em xilana, como bagaço de cana de açúcar, bambu, grãos de milho, farelo de trigo e caule de algodão. Além disso, os XOS podem ser obtidos por hidrólise da xilana, por ação das xilanases. Os XOS são sólidos cristalinos, sua cor depende da fonte de xilana, a massa molecular pode variar, sua ação adoçante corresponde a aproximadamente 30 % de sacarose e possuem excelente estabilidade em uma ampla faixa de temperatura (até 100 °C) e pH (2,5 até 8,0). Os XOS são carboidratos não digeríveis que apresentam propriedades prebióticas, ou seja, são usados para o crescimento de microrganismos probióticos do trato intestinal garantindo diversos benefícios para o organismo (ALOKIKA; SINGH, 2019; LI *et al.*, 2015; MANO *et al.*, 2018; NIETO-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2017; RASTALL; GIBSON, 2015; SAMANTA *et al.*, 2015).

A definição de prebióticos, atualizada em 2017, é: são substratos usados seletivamente por microrganismos hospedeiros, que conferem benefícios à saúde. Atualmente, eles não são vistos simplesmente como compostos que possibilitam o crescimento de *Bifidobactéria* e *Lactobacillus*; os prebióticos são reconhecidos por seus efeitos positivos no metabolismo de maneira geral, por inibirem o crescimento de outras bactérias nocivas ao organismo e, assim, evitarem infecções intestinais (GIBSON *et al.*, 2017). Além disso, são capazes de promover a redução dos níveis de colesterol no sangue, estimular a secreção de insulina e apresentar efeito preventivo de câncer do cólon (MANO *et al.*, 2018).

O mercado global dos prebióticos está em expansão: em 2022 está estimado em U\$ 5,3 bilhão e a perspectiva é de crescimento expansivo de 9,9% ao ano, podendo atingir U\$ 8 bilhão até 2026, correspondendo a 12,7 % do crescimento do setor (RESEARCH AND MARKETS, 2022). Os XOS são excelentes alternativas de prebióticos, pois podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais e florestais, pela ação das xilanases, o que reduz os custos do processo e garante a obtenção de um produto de alto valor agregado a partir de biomassas (AMORIM *et al.*, 2019a; WU *et al.*, 2019).

Segundo (AMORIM *et al.*, 2019b), diferentes estratégias têm sido estudadas para a produção e a aplicação de xilanases, como imobilização enzimática, modificação genética de genes que expressam xilanases, elaboração de coquetéis enzimáticos e produção heteróloga de

xilanases e, assim, houve um aumento no número de publicações relacionadas à hidrólise enzimática para produção de xilooligossacarídeos nos últimos anos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Imobilizar uma xilanase de *Orpinomyces* sp. PC-2 expressa em *E. coli* e aplicar a enzima imobilizada na hidrólise de biomassas lignocelulósicas para produção de xilooligossacarídeos (XOS).

3.2 Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Cultivar a *E. coli* BL21 transformada contendo o gene da xilanase SM2 do fungo *Orpinomyces* sp. PC-2 e induzir a expressão da xilanase;
- Verificar a atividade enzimática da xilanase;
- Formar os agregados reticulados de xilanase;
- Verificar a atividade da xilanase imobilizada para avaliação da eficiência de imobilização;
- Determinar os parâmetros bioquímicos da xilanase imobilizada para comparação com a enzima livre;
- Aplicar a xilanase imobilizada na produção de XOS a partir da hidrólise de biomassa lignocelulósica;
- Quantificar os XOS produzidos pela enzima imobilizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Testar a reutilização da xilanase imobilizada.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo e manutenção de *Escherichia coli*

O cultivo e a manutenção foram realizados a partir da metodologia de VENTORIM *et al.* (2018) com algumas adaptações, o clone de *E. coli* BL21 contendo o gene SM2 de xilanase de *Orpinomyces* sp. PC-2 foi cultivado em meio LB ágar (triptona 1,0 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 0,5 % e ágar 1,5 %) contendo 0,1 mg/mL de canamicina por 24 h a 37 °C. Um estoque foi preparado a partir destas colônias em glicerol 20 % e armazenado a -80 °C.

Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB (triptona 1,0 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 0,5 %) com 0,1 mg/mL de canamicina e acondicionada a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 14 h. Após esse período, 1 mL da cultura foi adicionado em 40 mL de LB com canamicina, em Erlenmeyer de 125 mL, e mantido sob agitação de 250 rpm por 14 h, a 37 °C. Na sequência, a cultura foi transferida para 1 L de meio SOB (triptona 2,0 %; extrato de levedura 0,5 % e 0,05 % de NaCl), acrescentado de 0,1 mg/mL de canamicina, 10 mL de KCl 0,25 M, 5 mL de MgSO₄ 2 M e 100 µL de NaOH 5 M, mantido sob agitação de 250 rpm a 37 °C até a cultura atingir densidade ótica a 660 nm (DO₆₀₀) de 1,0.

Para a indução da expressão da xilanase, foi usado soro de leite, contendo 5 mM de açúcares redutores aferidos pelo método do DNS (Miller, 1959), como substituinte do Isopropil-β-D-Tiogalactosídeo (IPTG). A cultura foi então mantida sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 4 h. Após o tempo decorrido, a cultura foi transferida para banho de gelo por 30 min e centrifugada a 4000 rpm por 30 min a 4 °C. O *pellet* foi recuperado e ressuspendido em 25 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5. Por último, as células foram rompidas em sonicador, configurado com 20 de amplitude, 10 s de tempo de pulso e 10 s de tempo de parada, por 5 minutos, a 13 °C. A solução foi centrifugada a 4000 rpm a 4 °C por 20 min e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C e utilizado como extrato enzimático.

4.2 Atividade de xilanase livre e imobilizada

A atividade de xilanase foi realizada de acordo com o método descrito por Miller (1959), em tubos de ensaio contendo 200 µl de xilana beechwood 1 % (p/v) diluída em tampão fosfato

de sódio 100 mM, pH 6,5 e 50 µL de enzima livre. Para a enzima imobilizada, o ensaio foi realizado em microtubo contendo 250 µL de xilana beechwood 1 % (p/v) diluída em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5 e 0,063 U de xilanase imobilizada. Os tubos e os microtubos foram homogeneizados e incubados em banho maria a 50 °C, por 10 min. A reação foi interrompida com 250 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e os tubos foram colocados em banho fervente por 5 min. Ao final, foram adicionados 500 µL de água destilada e aliquoteados 200 µL da mistura reacional para uma microplaca de 96 poços de fundo chato. A leitura de absorbância foi realizada em 540 nm no espectrômetro Multiskan Go (Thermo Scientific).

O ensaio de atividade enzimática foi realizado em triplicata mais um controle branco, no qual o DNS foi adicionado no início da reação enzimática. A atividade enzimática foi calculada pela diferença de concentração de açúcares redutores final e inicial, multiplicado pelo volume da reação, e normalizado pelo tempo de reação. Uma unidade de atividade enzimática (U) de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de açúcar redutor por minuto.

A concentração de açúcares redutores foi obtida pela equação da curva analítica padrão que foi construída com concentrações crescentes de 0 a 1 g/L de solução padrão de xilose.

4.3 Imobilização da xilanase

De acordo com Hero *et al.* (2018) adaptado, o extrato bruto contendo 11394 U de xilanase foi diluído 100 vezes e então adicionou-se 100 µL de enzima em um microtubo de 2 mL em 80 % de isopropanol e deixado por 1 hora a -20 °C para a precipitação da enzima. Depois da etapa de precipitação foi adicionado 1 % de glutaraldeído na solução anterior para a formação dos agregados, e deixou-se a solução agitando por 3 horas na mesa agitadora TS-2000A VDRL (Biomixer). Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos a 11200 g e lavou-se o agregado 3 vezes para a retirada de excesso de glutaraldeído. Por fim, foi realizado o ensaio de atividade da enzima imobilizada de acordo com o item 4.2.

4.4 Caracterização bioquímica da xilanase imobilizada e livre

4.4.1 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na atividade da xilanase imobilizada e livre foi avaliado nas temperaturas de 30 a 80 °C, em pH 6,5, conforme descrito no item 4.2.

4.4.2 Efeito do pH

O efeito do pH na atividade da xilanase imobilizada e livre foi avaliado em valores de pH entre 2 e 11, usando diferentes tampões na concentração de 100 mM: tampão McIlvaine (pH 2,2 a 8) e tampão carbonato de sódio (pH 9, 10 e 11). A atividade de xilanase foi mensurada conforme descrito no item 4.2.

4.4.3 Análise da termoestabilidade da xilanase imobilizada

Microtubos contendo xilanase imobilizada e livre juntamente com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5 foram incubados na temperatura de 50 °C. Os tempos em que foram realizados os ensaios de atividade, conforme o item 4.2, foram o 0 e depois de 24 horas em 24 horas, até chegar à atividade enzimática relativa de 50 %.

4.5 Testes de reutilização da xilanase imobilizada

Os ensaios de atividade enzimática da xilanase imobilizada foram realizados conforme descrito no item 4.2, utilizando-se microtubos contendo os agregados de xilanase, por inúmeros ciclos, visando testar a eficiência de catálise da xilanase. A atividade da xilanase no primeiro ciclo foi considerada 100 % e nos ciclos posteriores foram determinadas as atividades relativas.

4.6 Teste de armazenamento da xilanase imobilizada

A xilanase imobilizada em 20 microtubos foi armazenada nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias, a 4 °C e a temperatura ambiente. A cada tempo foi realizado o ensaio de atividade conforme o item 4.5.

4.7 Biomassa

O farelo de arroz utilizado no trabalho foi escolhido devido aos resultados de obtenção de XOS presente no trabalho de ALMEIDA (2022) e foi adquirido no comércio local de Viçosa - MG. Ele foi triturado em moinho de facas e as partículas peneiradas em malha de 20 mesh para hidrólise enzimática.

4.8 Pré-tratamento alcalino da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento alcalino da biomassa farelo de arroz, a ser posteriormente utilizada para hidrólise de xilana, foi realizado com 10 % (m/v) de sólidos em solução de NaOH 1 %. A mistura ficou por 1 hora a 120° C. Em seguida, a biomassa foi lavada com 4 L de água destilada, até sua clarificação, e armazenada em -20 °C. A massa exata de sólidos antes e após o pré-tratamento foi aferida e registrada para o cálculo de recuperação da etapa de pré-tratamento.

4.8.1 Hidrólise enzimática

A eficiência das enzimas imobilizadas na produção de xilooligossacarídeos (XOS) foi verificada a partir da sacarificação da biomassa pré-tratada de farelo de arroz. A hidrólise enzimática foi realizada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,5 e foram adicionados 10 mM de azida de sódio e 40 mg/L de tetraciclina para evitar contaminação microbiana. Os ensaios foram feitos com 10 % (m/v) de sólidos e 1 U de xilanase imobilizada por grama de biomassa pré-tratada, em tubos Falcon de 50 mL, incubados a 50 °C sob agitação de 150 rpm em incubadora shaker refrigerada M380 (Marconi). A reação foi monitorada nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 h, em triplicata, e um controle sem enzimas independente para cada ponto foi

realizado. Após cada tempo, foi coletado 1 mL de solução e os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 min a 8 °C. O sobrenadante foi estocado a -20 °C para quantificação de (XOS) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.8.2 Quantificação de xilooligossacarídeos (XOS) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras da hidrólise enzimática foram passadas em filtros de seringa 0,45 µm para serem aplicadas no cromatógrafo. A cromatografia líquida de alta performance foi executada no cromatógrafo modelo CBM-20A/20Alite (Shimadzu) com detector de índice de refração RID - 20A (Shimadzu). A quantificação de XOS foi realizada pela coluna Aminex 7 HPX-87P (BioRad) a 80 °C com fluxo de 0,6 mL/min e eluição com água deionizada. A curva analítica foi construída com padrões de xilobiose, xilotriose, xilotetose, xilopentose e xiloexose em concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0 g/L.

4.9 Teste estatístico

Foi realizado o teste T de Student ($p < 0,05$) no software Minitab 19 nos resultados do item 4.8 para verificar se houve diferença significativa entre as amostras nas diferentes condições de armazenamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Expressão da xilanase SM2

A atividade enzimática de xilanase SM2 expressa em *E. coli* BL21 empregando soro de leite como indutor foi de $11.393,88 \pm 444,330$ U/mL. A elevada atividade obtida respalda o potencial de aplicação dessa xilanase produzida em sistema heterólogo.

A indústria biotecnológica utiliza de enzimas em seus processos, porém as enzimas nativas não são necessariamente as melhores para os processos industriais, pois a produção é muitas vezes limitada, além de não terem uma estabilidade em condições mais extremas, como pH e temperatura. Então, uma forma de contornar esses problemas é recorrer a novas tecnologias, como as de DNA recombinante e de engenharia de proteínas (TRONO, 2019).

O sistema de expressão heteróloga tem sido usado, pois além de aumentar a produtividade da enzima, é possível realizar modificações que trazem benefícios para o processo, como no caso da xilanase SM2 obtida a partir da XynA do fungo filamentoso *Orpinomyces sp.* PC-2, a qual apresenta maior termoestabilidade e estabilidade em uma faixa maior de pH comparada à nativa, além de ser produzida em sistema de expressão heterólogo empregando *E. coli* (VENTORIM *et al.*, 2018a).

A produção da xilanase SM2 destaca-se também pelo uso do soro de leite para a indução da sua expressão substituindo o Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Essa substituição traz vantagens como uma maior viabilidade econômica, já que o soro de leite é um dos subprodutos da indústria de laticínios, tornando o custo de produção menor, além da sustentabilidade em que se emprega um subproduto industrial para o processo de produção (SAR *et al.*, 2022).

5.2 Imobilização da xilanase SM2 pelo método CLEA

A imobilização por CLEA é realizada em duas etapas, na primeira ocorre a precipitação da proteína por algum agente precipitante e a formação do agregado; e na segunda é adicionado um agente para formar as ligações cruzadas entre as moléculas do agregado. Dessa maneira,

são apresentados na Tabela 1 os resultados da precipitação do extrato bruto da SM2 com isopropanol 80 % e da imobilização com seus respectivos rendimentos.

TABELA 1 – Atividade da xilanase SM2 livre, atividade da fração precipitada com isopropanol 80 % e da SM2 imobilizada, com os respectivos rendimentos.

	U_{TOTAL}	Precipitação (%)	Imobilização (%)
SM2 Livre	11,394 ± 0,444	100	-
Precipitação Isopropanol 80 %	4,249 ± 0,197	37,29	100
Sobrenadante Precipitação	0,475 ± 0,020	4,17	-
CLEA SM2	0,063 ± 0,003	-	1,48
Sobrenadante CLEA	0,277 ± 0,029	-	6,52

A recuperação da atividade após a precipitação com isopropanol foi de aproximadamente 37,29 %. Uma vez que a atividade de xilanase remanescente no sobrenadante desta etapa foi de apenas 4,17 %; essa redução na atividade pode ser decorrente de mudanças conformacionais das moléculas de proteínas provocadas pelo isopropanol e que resultaram em perda de atividade enzimática. Outros trabalhos descrevem a desnaturação proteica e consequentemente a perda de atividade enzimática provocada por solventes orgânicos (HERO *et al.*, 2018; ADEMAKINWA, 2021).

A etapa de imobilização com glutaraldeído resultou em um rendimento de imobilização de 1,48 %. HERO *et al.* (2018) apresentaram resultados semelhantes de rendimento de imobilização de 1,3 % do agregado de xilanase utilizando isopropanol como agente precipitante e glutaraldeído para ligar os agregados enzimáticos.

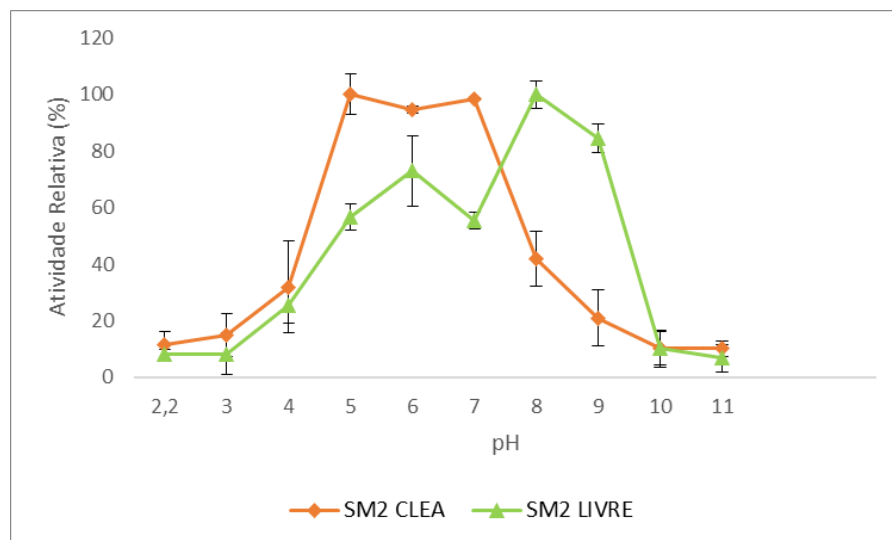
É importante ressaltar que a imobilização enzimática sem suporte é um processo empírico, no qual cada enzima tem as suas particularidades e, que a escolha dos agentes precipitante e de reticulação, o tempo e a temperatura de reticulação são fatores que interferem diretamente na formação do agregado e na sua imobilização (SHELDON, 2011; SINIRLIOGLU; SINIRLIOGLU; AKBAS, 2013). Dessa forma, é possível melhorar o rendimento da imobilização testando novas condições, agentes precipitantes e agentes reticulantes, porém é necessário ressaltar que este trabalho teve como objetivo imobilizar a SM2 e avaliar os resultados obtidos comparando com os resultados da enzima livre. Portanto, tendo em vista as propriedades bioquímicas promissoras da xilanase em estudo, a enzima proveniente

da etapa de imobilização foi avaliada quanto ao efeito da temperatura, do pH e a termoestabilidade.

5.3 Temperatura e pH ótimos

A xilanase imobilizada apresentou maiores atividades em valores de pH neutros e ácidos, enquanto que a xilanase livre apresentou maior atividade na faixa de pH mais básica (Figura 4). Essa mudança na faixa de pH de melhor atuação da enzima quando imobilizada é interessante quando se visa à aplicação em processos da indústria de alimentos, já que eles são normalmente realizados em faixas de pH mais ácidas para neutras.

Figura 4. Efeito do pH na atividade da xilanase SM2 livre e imobilizada. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem da atividade enzimática máxima sob condições de ensaio padrão. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas.

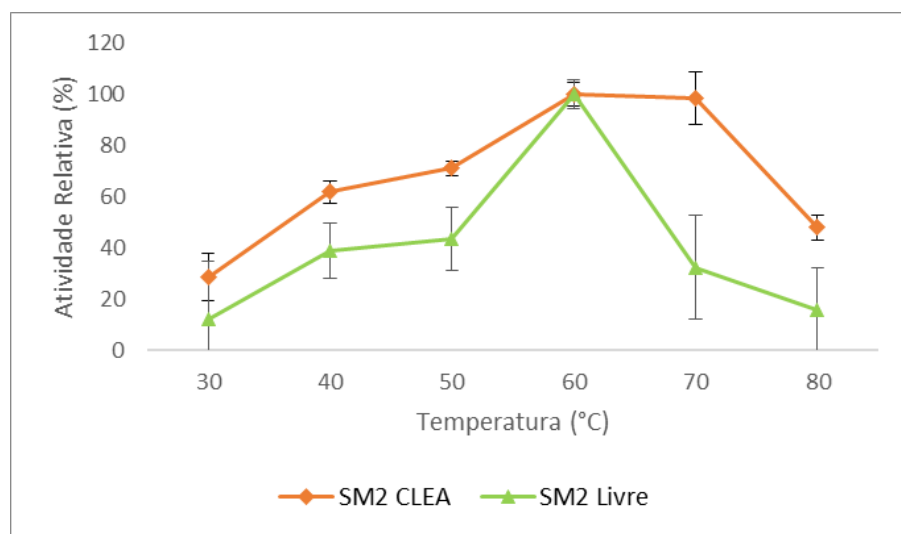


A maior atividade da xilanase SM2 imobilizada em valores de pH neutro e ácidos pode ser decorrente da estabilização de regiões carregadas da molécula no agregado proteico. O glutaraldeído forma interações com resíduos básicos livres na superfície da enzima, o que promove alterações eletrostáticas na molécula e modifica o microambiente da enzima imobilizada (ADEMAKINWA, 2021; VERMA; KUMAR; KUMAR, 2019).

Com relação ao efeito da temperatura, as xilanasas livre e imobilizada apresentaram um aumento gradativo da atividade relativa nas temperaturas de 30 a 60 °C, com temperatura ótima de 60 °C (Figura 5), assim como nos estudos de VENTORIM *et al.* (2018) e PASSARINHO *et*

al. (2018) com a xilanase livre. Porém, a enzima imobilizada apresentou maior atividade do que a enzima livre em temperaturas superiores a 60 °C, mantendo 99 % da atividade máxima a 70 °C e quase 50 % a 80 °C, sugerindo que o processo de imobilização promoveu a estabilização das moléculas e estendeu a faixa de atuação da enzima em temperaturas mais elevadas, em comparação com a SM2 livre.

Figura 5. Efeito da temperatura na atividade da xilanase SM2 livre e imobilizada em pH 6,5. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem da atividade enzimática máxima sob condições de ensaio padrão. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas



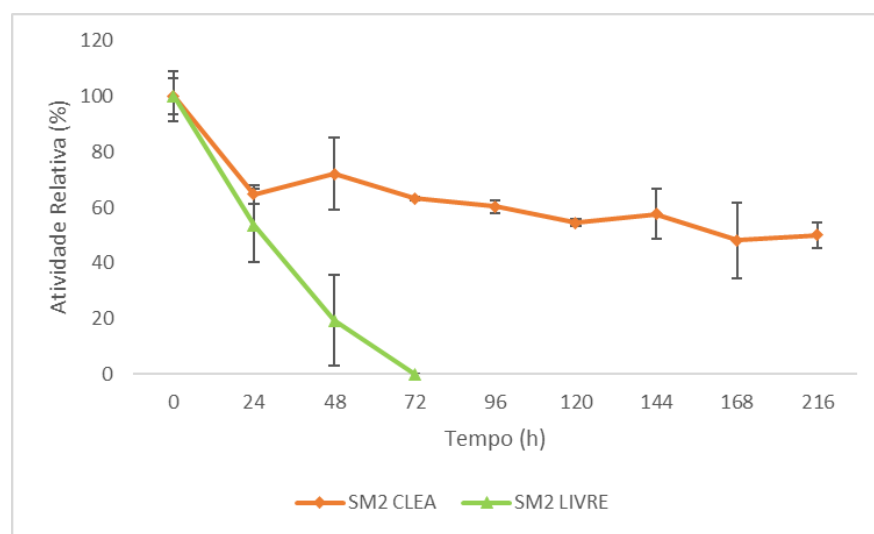
KUMAR *et al.*(2017), também obtiveram melhora na atividade enzimática da xilanase imobilizada em comparação com a enzima livre em temperaturas mais altas, como 70 e 80 °C), temperatura ótima de 60 °C para o agregado enzimático e 50 °C para a enzima livre.

Sugere-se que o processo de imobilização promove uma rigidez na estrutura da enzima devido às fortes ligações covalentes formadas entre os agregados enzimáticos e o glutaraldeído, além da maior proximidade entre as moléculas, protegendo-as de distorção ou dano por causa do calor (TALEKAR *et al.*, 2013; VERMA; KUMAR; KUMAR, 2019). A melhora observada na performance da xilanase em temperaturas mais altas parece ser decorrente desse efeito e destaca o potencial de aplicação dos agregados obtidos em processos da indústria em que a temperatura passa por grandes variações, como na produção de cerveja, que varia de 48 a 78 °C; e na indústria de polpa de sucos que varia entre 30 e 60 °C (BHUSHAN; PAL; JAIN, 2015; KUMAR, L. *et al.*, 2014; TRONO, 2019)

5.4 Termoestabilidade

A termoestabilidade é um parâmetro importante para processos industriais, pois indica o período de atuação eficiente da enzima em uma determinada temperatura. A termoestabilidade das xilanases livre e imobilizada a 50 °C pode ser visualizada na Figura 6.

Figura 6. Termoestabilidade a 50 °C das enzimas imobilizada e livre. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem da atividade enzimática máxima sob condições de ensaio padrão. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas.



A SM2 é uma xilanase obtida por evolução dirigida e selecionada devido à sua maior termoestabilidade em comparação à xilanase nativa. Essa enzima possui uma meia-vida de aproximadamente 30 horas a 50 °C (Ventorim *et al.*, 2018). O processo de imobilização, além de promover uma melhor atuação da xilanase SM2 em temperaturas mais elevadas, também levou a uma melhora significativa da termoestabilidade, pois a enzima alcançou 216 horas na mesma temperatura, com uma atividade de 50%, o que representa um aumento de mais de 7 vezes em comparação com a enzima livre. Este resultado reforça que as ligações formadas entre os agregados e o glutaraldeído promoveram alterações estruturais na molécula, tornando a xilanase imobilizada mais estável em temperaturas mais altas e por período de tempo prolongado.

A melhora na termoestabilidade com agregados enzimáticos também foi documentada no trabalho de HONG *et al.* (2021), em que a lacase imobilizada por *crosslinking* incubada a 50 °C por 7 horas apresentou maior termoestabilidade do que a livre; de ULLAH *et al.* (2021), com agregado de α -amilase incubada a 40, 50, 60 e 70 °C no tempo de 1 hora cujo resultado

também melhorou a termoestabilidade em todas as diferentes temperaturas, em comparação com a enzima livre; e de VERMA; KUMAR; KUMAR (2019) com xilanase imobilizada em que a enzima tanto imobilizada quanto livre foram incubadas a 60 e 70 °C por 4 horas, e nas duas temperaturas o agregado reticulado de xilanase apresentou melhor performance.

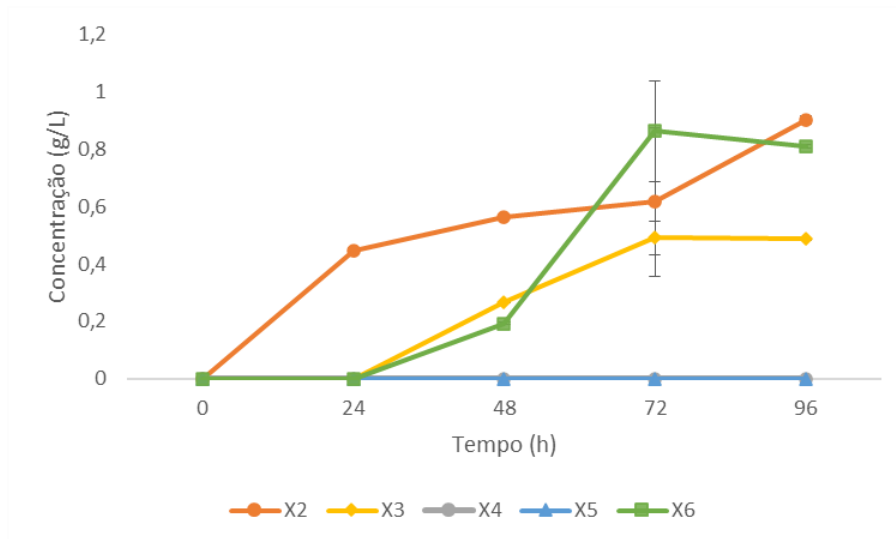
Baseado nas características apresentadas pelo agregado enzimático de SM2, como atuação em condições de pH neutras e ácidas, atividade e estabilidade em temperaturas iguais ou superiores a 50 °C, procedeu-se com o teste de aplicação da enzima imobilizada na sacarificação do farelo de arroz a 50 °C.

5.5 Sacarificação do farelo de arroz para produção de xilooligossacarídeos

No trabalho de Almeida (2022), a hidrólise enzimática de farelo de arroz pré-tratado utilizando a SM2 foi realizada a fim de se investigar o potencial de produção de xilooligossacarídeos de interesse para a indústria de alimentos e foi confirmado pela produção de xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilopentose (X5) e xiloexose (X6). Então, a partir dos resultados obtidos anteriormente, o farelo de arroz foi escolhido para realizar os testes de hidrólise enzimática com o agregado de SM2. O pré-tratamento alcalino do farelo de arroz apresentou um rendimento de 75,69 % de massa.

A sacarificação do farelo de arroz com 1 U de xilanase imobilizada por grama de biomassa pré-tratada se mostrou eficaz para a produção de XOS de baixo grau de polimerização, formados por 2 a 6 resíduos de xilose (Figura 7).

Figura 7. Produção de XOS a partir da hidrólise do farelo de arroz pré-tratado pela xilanase SM2 imobilizada a 50 °C, 150 rpm, por 96 horas. Todos os dados plotados são a média dos ensaios em triplicatas.



Nas primeiras 24 horas de sacarificação foi detectada apenas a produção de $0,447 \pm 0,008$ g/L de xilobiose (X2) dentre os XOS investigados. Após 48 horas foi possível observar a produção de $0,267 \pm 0,002$ g/L de xilotriose (X3), $0,192 \pm 0,003$ g/L de xiloxose (X6), além da continuidade da liberação de X2 ($0,564 \pm 0,001$ g/L). Em 72 horas de hidrólise enzimática, a concentração de X2 foi de $0,616 \pm 0,258$ g/L e as de X3 e X6 atingiram o valor máximo de $0,491 \pm 0,059$ g/L e $0,863 \pm 0,176$ g/L, respectivamente. Por fim, após 96 horas, não houve variação nas concentrações de X3 e X6, entretanto X2 continuou sendo liberada ($0,903 \pm 0,013$ g/L). As endo-xilanases, principalmente as da família GH 11, como a SM2, que são consideradas xilanases verdadeiras pela sua alta especificidade ao substrato, clivam aleatoriamente as ligações β -1,4-xilosídicas entre dois resíduos D-xilopiranosídeo e não nas extremidades (BIELY, P. *et al.*, 1997; BIELY, PETER *et al.*, 1993; FU *et al.*, 2019). Isso explica porque não houve liberação do monômero xilose. Além disso, em nenhum dos tempos de hidrólise avaliados houve a detecção de xilotetraose (X4) e xilopentose (X5).

MANRICH (2012), produziu XOS utilizando xilanase imobilizada a partir da hidrólise de 10 % bagaço de cana de açúcar após pré-tratamento alcalino com NaOH 1,4 % (m/v). A sacarificação foi realizada a 50 °C, por 4 horas, com a carga enzimática de 20 U/grama de biomassa pré-tratada e obteve produção de X5 e X4 na concentração de 2,46 g/L, X3 de 2,6 g/L e X2 de 4,13 g/L. Entretanto, antes de imobilizar, este estudo realizou a diálise da xilanase, um processo de ultrafiltração e de aminação, e após essas etapas a enzima foi imobilizada em

agarose-glioxil. Assim, apesar da produção de XOS ter sido maior tanto em variedade quanto em concentração do que no presente trabalho, vale ressaltar que aqui o método de imobilização utilizado foi por ligação cruzada, a concentração enzimática usada foi vinte vezes menor, a enzima foi imobilizada a partir do extrato bruto e foi utilizada uma biomassa diferente. Portanto, quanto menos operações em um processo, menos oneroso ele é, e mais viável economicamente se torna para a aplicação na indústria (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018), demonstrando que o agregado reticulado de xilanase SM2 possui vantagens econômicas e é efetivo para a produção de XOS.

AI *et al.* (2005), imobilizou xilanase de forma não covalente em um copolímero aniônico Eudragit S-100 e realizou o pré-tratamento alcalino em espiga de milho moída (60-80 mesh) com 2 % de NaOH em uma proporção de 6:1 (kg/kg), *overnight* em temperatura ambiente. o trabalho utilizou 4 g de biomassa pré-tratada para 600 U de enzima imobilizada por 24 horas, a 55 °C. A enzima imobilizada teve um rendimento de 15,5 mg/mL de produção de açúcares, sendo 32 % de xilobiose e 12 % de xilotriose, durante as 24 horas de sacarificação da espiga de milho.

Uma xilanase de *Bacillus halodurans* foi imobilizada por ligação iônica em uma resina de troca aniônica e foi utilizada para a produção de XOS a partir de pó de sabugo de milho e pré-tratado alcalinamente com 15 % de NaOH em uma proporção de 1:20 (m/v). Então o trabalho utilizou 0,255 U de enzima imobilizada para 1 mL de 2,0 % (m/v) de xilana, a 50 °C, 30 rpm por 24 horas. No final das 24 horas de reação, apresentou 25,2 % (m/m) de mistura de xilobiose e xilotriose (LIN; TSENG; LEE, 2011).

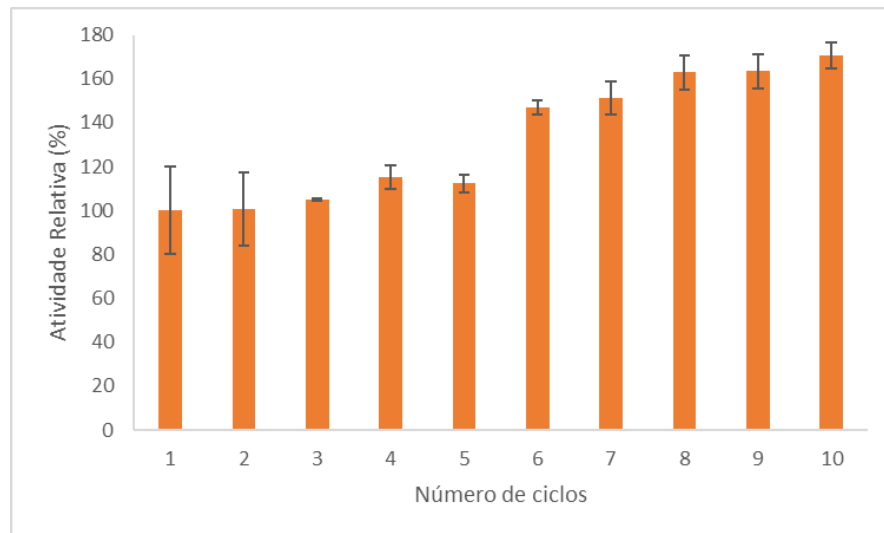
Portanto, pode-se afirmar que a xilanase SM2 imobilizada foi eficiente para a produção de XOS, sendo que a variedade destes oligossacarídeos depende da biomassa escolhida para a hidrólise, do tipo de xilanase, a composição da xilana, o tipo de pré-tratamento e o tempo de reação (CARVALHO *et al.*, 2013). O farelo de arroz demonstrou ser uma fonte de carbono interessante para a produção de XOS empregando a xilanase SM2 imobilizada. Apesar da baixa concentração de enzima imobilizada, foi possível produzir XOS diversificados. Além disso, o emprego da xilanase na forma imobilizada possibilita a reutilização, indicando o potencial de aplicação para a produção de XOS de baixo custo com propriedades prebióticas, principalmente para serem aplicados nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

5.6. Reutilização

A reutilização é um parâmetro que determina o número de ciclos que é possível utilizar a mesma enzima e é imprescindível para a indústria, pois com o reuso os custos dos processos tendem a diminuir (ABDUL WAHAB *et al.*, 2019; MULEY *et al.*, 2021).

Normalmente a atividade enzimática decai a cada ciclo realizado. Entretanto, a atividade da xilanase imobilizada aumentou gradativamente com o passar dos ciclos de reutilização, atingindo quase o dobro da atividade inicial após o décimo ciclo (Figura 8).

Figura 8. Atividade relativa da xilanase SM2 imobilizada após cada ciclo de reutilização a 50 °C, por 10 minutos, totalizando 10 ciclos.



Uma hipótese para este comportamento de aumento da atividade da xilanase imobilizada durante o ensaio de reutilização é que a formação do agregado enzimático reticulado se dá primeiramente pela aproximação das moléculas, em que interações estabilizadoras acontecem entre elas, como ligações de hidrogênio, força de van der Waals, interação hidrofóbica e ligações iônicas. Em seguida, com a adição do agente bifuncional, são formadas ligações cruzadas covalentes entre esses agregados, podendo formar agregados densos e com pouca flexibilidade. Essa baixa flexibilidade e a aproximação entre as moléculas de enzima, podem afetar o posicionamento do substrato no sítio catalítico, diminuindo a atividade enzimática. Ao incubar o agregado a 50 °C por ciclos sequenciais, o aumento da energia cinética do agregado reticulado decorrente do aumento da temperatura, pode promover o rompimento dessas interações mais fracas e, conseqüentemente, aumentar a flexibilidade das moléculas expondo

sítios catalíticos que antes não estavam expostos. Com isso, a interação entre o substrato e a enzima é facilitada e, dessa maneira, a atividade enzimática aumenta a cada ciclo.

A partir do ensaio enzimático realizado em diferentes tempos para a α -amilase, até 30 minutos, tanto livre quanto em forma de agregado reticulado, observou-se que a enzima livre apresentou atividade máxima aos cinco minutos de ensaio, enquanto que para a imobilizada, a atividade foi crescente até atingir a máxima aos 15 minutos de experimento. As propriedades físico-químicas das enzimas tanto livres quanto imobilizadas são governadas pela sua estabilidade; então a partir desse experimento, observou-se uma maior estabilidade do agregado reticulado de α -amilase devido às ligações cruzadas formadas, resistindo à inativação enzimática pela temperatura (ULLAH *et al.*, 2021). Com isso, sugere-se que a xilanase imobilizada deste trabalho, no ensaio de reuso, ao ser colocada consecutivamente dez vezes em contato com o substrato na temperatura de 50 °C, apresentou atividade enzimática crescente devido à estabilização do agregado e à resistência à inativação pela temperatura. Seria interessante para um melhor entendimento deste ensaio de reutilização, um experimento do efeito do tempo no ensaio de atividade, para encontrar o tempo da atividade máxima da xilanase imobilizada.

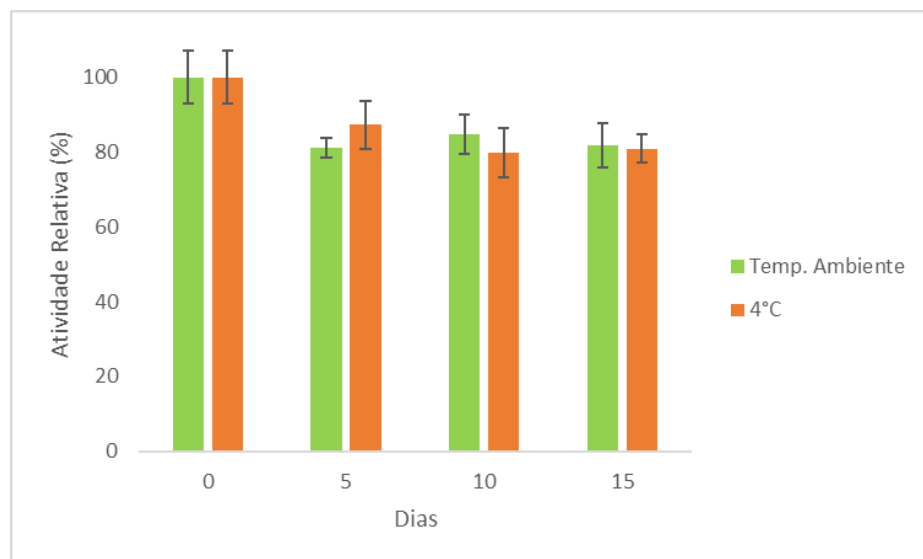
Esse aumento da atividade apresentado pela enzima imobilizada com o decorrer dos ciclos de reutilização reforça o potencial de sua aplicação em processos industriais que requerem altos rendimentos, especificidade, baixo custo e condições de temperatura elevada e pH ácido.

5.7 Armazenamento

A estabilidade da enzima durante o armazenamento é um critério importante para a viabilidade da aplicação na indústria (KUMAR, S. *et al.*, 2017). A xilanase imobilizada apresentou boa manutenção da atividade enzimática durante o período avaliado de 15 dias, com resultados semelhantes nas duas condições testadas, temperatura ambiente e sob refrigeração, mantendo cerca de 80 % da sua atividade inicial após os 15 dias (Figura 8). Após 5 dias de armazenamento a 4 °C, a atividade se mostrou ligeiramente superior em comparação com a atividade da enzima imobilizada mantida à temperatura ambiente, enquanto que nos outros dias avaliados, a atividade da enzima mantida à temperatura ambiente apresentou valores ligeiramente superiores. Para verificar se os valores de atividade obtidos se diferenciam

estatisticamente foi realizado o teste T de Student ($p < 0,05$) no Minitab 19 e confirmou-se que não houve diferença estatística entre as atividades nas duas condições avaliadas. Dessa forma, sugere-se que não é necessário o gasto de energia para o armazenamento sob refrigeração, diminuindo assim os custos de utilização da enzima e os cuidados com transporte e armazenamento.

Figura 9. Avaliação da estabilidade da xilanase SM2 imobilizada durante o armazenamento sob refrigeração (4 °C) e à temperatura ambiente por 15 dias.



NADAR *et al.* (2016) apresentaram dados semelhantes de armazenamento a 4 °C para uma amilase imobilizada por *cross-linking*, porém os autores não testaram o armazenamento em temperatura ambiente.

BHUSHAN; PAL; JAIN (2015), trouxeram dados de armazenamento a 4 e a 25 °C, por 28 dias, de agregados reticulados de xilanase. No trabalho, a condição de 4 °C apresentou melhores resultados do que a 25 °C. Nos 15 dias de armazenamento a 4 °C, a xilanase imobilizada apresentava quase 100 % de atividade, enquanto a 25 °C apresentava aproximadamente 80 %.

DORAISWAMY; SARATHI; PENNATHUR (2019), também demonstraram aproximadamente 80 % de atividade do agregado reticulado de esterase após armazenamento de 15 dias a 4 °C.

AYTAR; BAKIR (2008), observaram que não houve diferença no armazenamento a 4 °C e à temperatura ambiente de tirosinases imobilizadas por ligações cruzadas, durante 90 dias. Nas duas condições testadas, a atividade relativa foi de 84 e 83 %, respectivamente, em comparação com a atividade inicial.

Portanto, novamente é possível sugerir que a imobilização por agregados reticulados favorece a estabilização das moléculas, não apenas no que se refere ao armazenamento a longo prazo, mas também nas condições de aplicação nos processos industriais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enzimas imobilizadas possuem grande potencial para aplicação industrial devido à possibilidade de reuso, além de serem mais estáveis e mais resistentes às condições de processos. Neste trabalho, mostrou-se que foi possível imobilizar a enzima xilanase SM2 por ligações cruzadas, utilizando o glutaraldeído como agente bifuncional para a formação das ligações covalentes entre as moléculas de enzimas e, assim, dos agregados reticulados enzimáticos.

Os agregados reticulados da xilanase SM2 apresentaram o pH ótimo em 5, enquanto o pH de máxima atividade da enzima livre foi em 8; além disso, as atividades dos agregados foram maiores na faixa de pH ácida para neutra, enquanto a xilanase livre apresentou maior atividade na faixa básica. Apesar do rendimento da imobilização ter sido baixo, os agregados reticulados demonstraram maior estabilidade do que a enzima livre. A temperatura ótima da xilanase SM2, tanto imobilizada quanto livre, foi a 60 °C, porém a enzima imobilizada conseguiu manter a atividade por uma faixa maior de temperatura, e em 70 °C apresentou 99 % de atividade, enquanto a 80 °C a atividade foi de aproximadamente 50 %. No ensaio de termoestabilidade a 50 °C, o tempo de meia vida da enzima imobilizada foi de 216 horas, enquanto que o da xilanase livre foi de aproximadamente 30 horas, demonstrando um aumento de mais de 7 vezes na estabilidade térmica.

Com os resultados anteriores, seguiu-se para a aplicação da xilanase imobilizada na sacarificação de farelo de arroz pré-tratado, para a produção de XOS. O agregado reticulado enzimático demonstrou-se eficiente para a hidrólise da biomassa, mesmo que em baixa concentração, produzindo em 96 horas 0,903 g/L de xilobiose, 0,487 g/L de xilotriose e 0,809 g/L de xiloexose.

Por fim, o ensaio de reutilização da enzima imobilizada demonstrou que a atividade enzimática aumentou com o passar dos 10 ciclos realizados, e o ensaio de armazenamento tanto a 4 °C quanto à temperatura ambiente, durante 15 dias, mostrou que não houve diferença estatística nas duas condições testadas, indicando que a xilanase imobilizada não precisa ser armazenada sob refrigeração durante o tempo testado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL WAHAB, M. K. H. *et al.* Improvement of cross-linking and stability on cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-xylanase by protein surface engineering. *Process Biochemistry*, v. 86, p. 40–49, 1 nov. 2019.
- ADEMAKINWA, A. N. A heat-resistant intracellular laccase immobilized via cross-linked enzyme aggregate preparation: Characterization, application in bisphenol A removal and phytotoxicity evaluation. *Journal of hazardous materials*, v. 419, 5 out. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34218192/>>. Acesso em: 9 jul. 2022.
- AI, Z. *et al.* Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. [S.d.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/procbio>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- AL-GHANAYEM, A. A.; JOSEPH, B. *Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.]: Springer. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32037467/>>. Acesso em: 26 abr. 2021. , 1 abr. 2020
- ALMEIDA, L. F. Produção enzimática de xilooligosacarídeos com atividade prebiótica *in vitro*. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG, 2022.
- ALOKIKA; SINGH, B. *Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.]: Appl Microbiol Biotechnol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31641815/>>. Acesso em: 13 out. 2021. , 1 nov. 2019
- ÁLVAREZ-CERVANTES, J. *et al.* Mycosphere Essay 10: Properties and characteristics of microbial xylanases. *Mycosphere*, v. 7, n. 10, p. 1600–1619, 2016. Disponível em: <www.mycosphere.org>. Acesso em: 13 out. 2021.
- AMORIM, C. *et al.* From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnology Advances*. [S.l.]: Elsevier Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31075307/>>. Acesso em: 13 jun. 2021a. , 15 nov. 2019
- AMORIM, C. *et al.* From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnology Advances*. [S.l.]: Elsevier. , 15 nov. 2019b
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. *Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. Biotechnology Advances*. [S.l.]: Biotechnol Adv. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21963605/>>. Acesso em: 17 out. 2021. , maio 2012
- AYTAR, B. S.; BAKIR, U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 2, p. 125–131, 1 fev. 2008.
- BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. *Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.]: Appl Microbiol Biotechnol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31628521/>>. Acesso em: 13 out. 2021a. , 1 nov. 2019
- BEG, Q. K. *et al.* *Microbial xylanases and their industrial applications: A review. Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.: s.n.]. , 2001
- BHUSHAN, B.; PAL, A.; JAIN, V. (No Title). 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/210784>>.
- BIELY, P. *et al.* Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of biotechnology*, v. 57, n. 1–3, p. 151–166, 16 set. 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9335171/>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

- BIELY, PETER *et al.* Mode of action of three endo- β -1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, v. 1162, n. 3, p. 246–254, 26 mar. 1993.
- BOUACEM, K. *et al.* Partial Characterization of Xylanase Produced by *Caldicoprobacter algeriensis*, a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from an Algerian Hot Spring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 174, n. 5, p. 1969–1981, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25161038/>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. *Advances in enzyme immobilisation*. *Biotechnology Letters*. [S.l.]: Biotechnol Lett. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19590826/>>. Acesso em: 17 out. 2021. , out. 2009
- CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters*, v. 2, n. 10, p. 1361–1364, 18 maio 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol005593x>>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- CARVALHO, A. F. A. *et al.* Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, v. 51, n. 1, p. 75–85, 1 abr. 2013.
- CHAKDAR, H. *et al.* *Bacterial xylanases: biology to biotechnology*. 3 *Biotech*. [S.l.]: 3 *Biotech*. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28330222/>>. Acesso em: 12 out. 2021. , 1 dez. 2016
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts 2018, Vol. 8, Page 238*, v. 8, n. 6, p. 238, 5 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4344/8/6/238/htm>>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>>.
- CINTRA, L. C. Produção de hemicelulases recombinantes e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. 2016. 181 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2016.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, v. 3, n. 1, p. 1–9, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/243563746/>>. Acesso em: 17 out. 2021.
- DE MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. *Ciência Rural*, v. 38, n. 2, p. 587–592, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cr/a/ShPPqyjNKQdZTXKLtgjLgMr/?lang=pt>>. Acesso em: 10 jul. 2022.
- DE QUEIROZ BRITO CUNHA, C. C. *et al.* Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, v. 13, n. 2, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29481569/>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- DONG CUI, J. *et al.* Carrier-Free Immobilization of Rutin Degrading Enzyme Extracted From *Fusarium* spp. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* | www.frontiersin.org, v. 1, p. 470, 2020. Disponível em: <www.frontiersin.org>.
- DORAISWAMY, N.; SARATHI, M.; PENNATHUR, G. Cross-linked esterase aggregates (CLEAs) using nanoparticles as immobilization matrix. *Preparative biochemistry & biotechnology*, v. 49, n. 3, p. 270–278, 16 mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30794034/>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. *et al.* Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 5, p. 565–569, 1 out. 2007.

FU, L. H. *et al.* Purification and characterization of an endo-xylanase from *Trichoderma* sp., with xylobiose as the main product from xylan hydrolysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2019 35:11, v. 35, n. 11, p. 1–13, 31 out. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-019-2747-1>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

FURLANI, I. L. *et al.* IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: CONCEITO E EFEITOS NA PROTEÓLISE. *Quím. Nova*, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170525>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

GIBSON, G. R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28611480/>>. Acesso em: 13 jun. 2021. , 1 ago. 2017

GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market Size Worth \$20.31 Billion By 2030 | CAGR 6.5%. 2022. Disponível em: Acessado em: <<https://www.grandviewresearch.com>> 06 de julho de 2022.

GUPTA, M. N. *et al.* Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, v. 39, n. 2, p. 98–109, abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20958099/>>. Acesso em: 17 out. 2021.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 2, p. 453–468, 26 jan. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19169460/>>. Acesso em: 14 out. 2021.

HERO, J. S. *et al.* Designing cross-linked xylanase aggregates for bioconversion of agroindustrial waste biomass towards potential production of nutraceuticals. *International journal of biological macromolecules*, v. 111, p. 229–236, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307801/>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

HONG, J. *et al.* Immobilization of laccase via cross-linked enzyme aggregates prepared using genipin as a natural cross-linker. *International journal of biological macromolecules*, v. 169, p. 541–550, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33358952/>>. Acesso em: 9 jul. 2022.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, v. 61, n. 3, p. 1017–1026, 2006. Disponível em: <<https://koreauniv.pure.elsevier.com/en/publications/nanostructures-for-enzyme-stabilization>>. Acesso em: 17 out. 2021.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 5 ago. 2004

KUMAR, L. *et al.* Immobilization of xylanase purified from *Bacillus pumilus* VLK-1 and its application in enrichment of orange and grape juices. *Journal of Food Science and Technology*, v. 51, n. 9, p. 1737–1749, 1 set. 2014. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-014-1268-z>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

KUMAR, S. *et al.* Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 98, p. 24–33, 1 maio 2017.

LI, Z. *et al.* In vitro study of the prebiotic xylooligosaccharide (XOS) on the growth of *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus* spp. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 66, n. 8, p. 919–922, 17 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09637486.2015.1064869>>. Acesso em: 18 out. 2021.

- LIAB, K. *et al.* Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 1–2, p. 89–94, 1 jul. 2000.
- LIN, Y. S.; TSENG, M. J.; LEE, W. C. Production of xylooligosaccharides using immobilized endo-xylanase of *Bacillus halodurans*. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 11, p. 2117–2121, 1 nov. 2011.
- MANO, M. C. R. *et al.* *Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.]: Springer Verlag. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29032473/>>. Acesso em: 13 jun. 2021. , 1 jan. 2018
- MANRICH, A. Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas. 2012. 103 f. Tese (Doutorado em Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal de São Carlos – SP, 2012.
- MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, v. 9, n. 9, 15 set. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5622781/>.
- MATEO, C. *et al.* *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. *Enzyme and Microbial Technology*. [S.l.: s.n.]. , 2 maio 2007
- MELLITZER, A. *et al.* Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, v. 11, n. 1, p. 1–11, 14 maio 2012. Disponível em: <<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-11-61>>. Acesso em: 18 out. 2021.
- MENDES, A. A. *et al.* Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/qn/a/T3NJvK4Cm8qbJ7BtRV98gyj/?lang=pt>>. Acesso em: 17 out. 2021.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.
- MOHAMAD, N. R. *et al.* *An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. [S.l.]: Biotechnol Biotechnol Equip. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26019635/>>. Acesso em: 8 out. 2021. , 2015
- MORALES, M. DA L. *et al.* Purification of xylanase from *Kretzschmaria zonata* with potential interest in the production of xylooligosaccharides. *Journal of Food Processing and Preservation*, p. e16910, 19 jul. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfpp.16910>>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- MULEY, A. B. *et al.* Preparation of cross-linked enzyme aggregates of lipase from *Aspergillus niger*: process optimization, characterization, stability, and application for epoxidation of lemongrass oil. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 7, p. 1383–1404, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-021-02509-7>>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- NADAR, S. S. *et al.* Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 84, p. 69–78, 1 mar. 2016.
- NIETO-DOMÍNGUEZ, M. *et al.* Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chemistry*, v. 232, p. 105–113, 1 out. 2017.
- PASSARINHO, A. T. P. *et al.* Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 2, p. 741–747, 30 jan. 2019.
- POLIZELI, M. L. T. M. *et al.* *Xylanases from fungi: Properties and industrial applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. [S.l.]: Appl Microbiol Biotechnol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15944805/>>. Acesso em: 12 out. 2021. , jun. 2005

PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem*, v. 17, n. 3, p. 197–203, 2016.

QUIOCHO, F. A.; RICHARDS, F. M. The Enzymic Behavior of Carboxypeptidase-A in the Solid State. *Biochemistry*, v. 5, n. 12, p. 4062–4076, 1966. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00876a041>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

RAMOS, M. D. Imobilização de lipases pela técnica CLEA para síntese de biodiesel em reator de fluxo em vórtice. 2017. 127 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos – SP, 2017.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R. *Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. Current Opinion in Biotechnology*. [S.l.]: Elsevier Current Trends. , 1 abr. 2015

RAY, L.; PRAMANIK, S.; BERA, D. Enzymes- An Existing and Promising Tool of Food Processing Industry. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 58–71, 19 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27468817/>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

RESEARCH AND MARKETS. Prebiotics – Global Market Trajectory & Analytics. 2022. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/1206755/prebiotics_global_market_trajectory_and#:~:text=Global%20Prebiotics%20Market%20to%20Reach%20%248%20Billion%20by%202026&text=Rsearch%20has%20indicated%20the%20positive,cholesterol%20and%20blood%20sugar%20levels.>>. Acesso em: 15 de julho de 2022.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, v. 59, p. 1–41, 15 nov. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26504249/>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

ROESSL, U.; NAHÁLKA, J.; NIDETZKY, B. Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnology Letters* 2009 32:3, v. 32, n. 3, p. 341–350, 27 nov. 2009. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-009-0173-4>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

SAMANTA, A. K. *et al.* Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 5, n. 1, p. 62–71, 1 jan. 2015

SANTIBÁÑEZ, L. *et al.* Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, v. 251, p. 117118, 1 jan. 2021.

SAR, T. *et al.* Potential utilization of dairy industries by-products and wastes through microbial processes: A critical review. *Science of The Total Environment*, v. 810, p. 152253, 1 mar. 2022.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, n. 3, p. 467–477, 2 nov. 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3554-2>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

SINIRLIOGLU, Z. A.; SINIRLIOGLU, D.; AKBAS, F. Preparation and characterization of stable cross-linked enzyme aggregates of novel laccase enzyme from *Shewanella putrefaciens* and using malachite green decolorization. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 807–811, 1 out. 2013.

SOUZA, L. T. DE A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *Biociencia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*, p. 529–568, 31 jan. 2017.

TALEKAR, S. *et al.* Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs): A tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 269–275, 1 nov. 2013.

- TREVIZANO, L. M. *et al.* Thermostability improvement of Orpinomyces sp. xylanase by directed evolution. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 81, p. 12–18, 1 set. 2012.
- TRONO, D. Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*, p. 349–387, 1 jan. 2019.
- ULLAH, H. *et al.* Preparation, characterization and stability studies of cross-linked α -amylase aggregates (CLAAs) for continuous liquefaction of starch. *International journal of biological macromolecules*, v. 173, p. 267–276, 15 mar. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33454331/>>. Acesso em: 9 jul. 2022.
- VELASCO-LOZANO, S. *et al.* Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. *Biocatalysis*, v. 1, n. 1, p. 166–177, 25 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/boca-2015-0012/html>>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- VENTORIM, R. Z. *et al.* Impact of the removal of N-terminal non-structured amino acids on activity and stability of xylanases from Orpinomyces sp. PC-2. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 312–319, 2018a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.015>>. Acesso em: 13 out. 2021.
- VERMA, R.; KUMAR, A.; KUMAR, S. Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from Geobacillus thermodenitrificans X1. *Process Biochemistry*, v. 80, p. 72–79, 1 maio 2019.
- WALIA, A. *et al.* Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*, v. 7, n. 1, p. 1–12, 8 abr. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-016-0584-6>>. Acesso em: 13 out. 2021.
- WANG, G. *et al.* High phylogenetic diversity of glycosyl hydrolase family 10 and 11 xylanases in the sediment of Lake Dabusu in China. *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, p. e112798, 13 nov. 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112798>>. Acesso em: 12 out. 2021.
- WILSON, L. *et al.* Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnology and bioengineering*, v. 86, n. 5, p. 558–562, 5 jun. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15129439/>>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- WU, B. *et al.* Expansin assisted bio-affinity immobilization of endoxylanase from Bacillus subtilis onto corn cob residue: Characterization and efficient production of xylooligosaccharides. *Food Chemistry*, v. 282, p. 101–108, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/30711093>>. Acesso em: 13 jun. 2021.
- YAMAGUCHI, S. The quest for industrial enzymes from microorganisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 81, n. 1, p. 54–58, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27885927/>>. Acesso em: 26 abr. 2021.