

## Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos

Leandro Freire dos Santos<sup>1\*</sup> e Priscila Lumi Ishii<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia; Universidade Federal do Paraná; 81531-970; Curitiba - PR - Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular; Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 13506-900; São Paulo - SP - Brasil.

### ABSTRACT

*Endo-1,4-β-xylanases are extracellular enzymes that make the hydrolysis of substrates β 1,4. Xylan is the main representative among the substrates that are susceptible to hydrolytic attack of xylanases. Xylanases have a wide application in different sectors of the economy. The purpose of this study was to review the published literature on the main methodologies used to study these enzymes, as well as gather some kinetic parameters. The reviewed methodologies are centered mainly in the purification process, since that is an essential step for the optimization of its enzymatic activity and therefore industrial application. The highlights are the techniques that use the saline precipitation and refined methodologies as chromatography and its variations, as well as factorial design studies and enzyme immobilization. These methodologies aim respectively, among other things, optimal conditions for enzyme production and recycling.*

**Key words:** Enzymatic activity, purification techniques, immobilization of enzymes, xylan, thermostability

### INTRODUÇÃO

As endo β 1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por bactérias e fungos, que fazem a hidrólise das ligações β 1,4 na xilana principalmente. A xilana é composta por resíduos de β-xilopiranosose, unidos por ligações β 1,4, com graus variáveis de substituições em suas cadeias laterais. Os produtos da hidrólise das xilanases são constituídos de monômeros D-xilose e xilo-oligossacarídeos de diferentes tamanhos. (Heck, 2006; Jänis, 2007).

As xilanases apresentam amplo emprego industrial. Pesquisas recentes exploram sua aplicabilidade no setor alimentício e processamento do papel (Haros et al., 2002; Jiang et al., 2008; Bae et al., 2008). Sendo assim, é de grande importância estudos que objetivam obter maiores rendimentos na produção das xilanases. Obter altos rendimentos na produção da enzima é desejável no âmbito industrial. Otimizações no rendimento podem ser conseguidas através de planejamentos fatoriais de certas variáveis importantes para a produção. Fontes de nitrogênio, carbono, tempo e temperatura de cultivo, dentre outros, são variáveis importantes para serem estudados (Li et al., 2007). Além disso, otimizações no rendimento também podem ser

obtidos por processos apurados de purificação (Zuniga et al., 2003). A atividade enzimática sempre deve ser verificada, após um processo de purificação, para visualização de uma possível aplicação industrial (Decelle et al., 2004; Sapre et al., 2005; Kolenová et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi expor metodologias usadas para se trabalhar com xilanases e reunir alguns parâmetros cinéticos. Tais informações podem ser necessárias para otimizações do rendimento e ampliação da sua aplicabilidade industrial.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Metodologias utilizadas para se trabalhar com xilanases

A Tabela 1 mostra dados acerca dos microrganismos produtores de xilanases, especificando os substratos utilizados, condições de pH, temperatura e principais técnicas de purificação dos trabalhos revisados.

---

Author for correspondence: leandrofreire@onda.com.br

**Tabela 1.** Microrganismos produtores de xilanases (\*)

Microrganismos Produtores	Substratos Utilizados	Condições de Cultivo (pH e temperatura)	Técnicas de Purificação	Autor(es)
<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	Xilana	pH 6,0; 70 e 90°C	Cromatografia de troca aniônica	Sunna et al., 2000
<i>Acrophialophora nainiana</i>	Xilana	pH 7,0; 55°C	Cromatografia de troca iônica e filtração a gel	Salles et al., 2000
Streptomyces SP.	Xilana; 4-nitrofenol beta-D-xilopiranosídeo; 4-nitrofenol celobiosídico; 4-nitrofenol arabinofuranosídico	pH 6,0; 60°C	Cromatografia de troca iônica e filtração a gel	Georis et al., 2000
<i>Euphausia superba</i>	Xilana; 4-nitrofenol beta-D-xilopiranosídeo	pH 5,7-6,0; 37-40°C	Cromatografia de troca iônica	Turkiewicz et al., 2000
<i>Lentinus edodes</i>	Xilana	pH 4,0 e 5,0; 50,60,90 °C	Cromatografia de troca iônica e filtração a gel	Ramos et al., 2000
Bacillus sp.	Xilana	pH 6,0-7,0; 70°C	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica	Takahashi et al., 2000
<i>Melanocarpus albomyces</i>	Xilana; 4-nitrofenol beta-D-xilopiranosídeo	Variável conforme isozima	Cromatografia de troca iônica e filtração a gel	Saraswat & Bisaria, 2000
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	1,4-beta-D-xilana	pH 6,0; 60°C	Cromatografia de troca iônica e filtração a gel	Kaneko et al., 2000
Bacillus sp.	Arabinoxilano; 1,4-beta-D-xilana	pH 6,0-7,0; 75°C	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica e filtração a gel	Bataillon et al., 2000
Staphylococcus sp.	1,4-beta-D-xilana	pH 7,5 e 9,2; nd (*)	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica e filtração a gel	Gupta et al., 2000
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Xilotrioses, xilotetroses, xilopentoses, xilohexoses, arabinoxilana, glucuronoxilana	pH 5,0; 50°C	Filtração a gel	Kalogeris et al., 2001
Thermomonospora sp.	Xilana	Nd; 80°C	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração a gel	George et al., 2000
<i>Phelbia radiata</i>	Xilana	nd	Cromatografia de troca iônica	Rogalski et al., 2001
<i>Fusarium proliferatum</i>	Xilana	pH 5,0-5,5; 55°C	Precipitação com sulfato de amônio e	Saha , 2002

<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Xilana e xilooligossacarídeos	pH 5,3-8,0 (25°C); 25°C	cromatografia Ultrafiltração e troca iônica	de Collins, 2002
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xilana e 4-O-metil-glucuronoxilana	pH 7,0; 60°C	Cromatografia de troca aniônica e filtração a gel	de Bakalova et al., 2002
<i>Acrophialophora nainiana</i>	Xilana	pH 6,5; 55-65°C	Ultrafiltração, cromatografia de troca iônica e filtração a gel	de Cardoso & Ferreira, 2003
<i>Cellulomonas flavigena</i>	Xilana	pH 6,5; 50-55°C	Filtração a gel	Martinez-Trujillo et al., 2003
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Derivados da xilobiose, xilotriose e glucuronoxilana	pH 5,0; 70°C	Cromatografia de troca iônica e filtração a gel	de Katapodis et al., 2003
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xilana	pH 6,0; 75°C	Filtração a gel	Damoso et al., 2003
<i>Streptomyces</i> sp. K37	Xilana e arabinogalactana	pH 6,0; 60°C	Cromatografia de troca catiônica e filtração a gel	de Mansour et al., 2003.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Xilana, p-nitrofenol beta-D-xilopiranosídico e p-nitrofenol beta-D-celobiosídico	pH 4,5; 60(iso*. B) e 70°C (iso.A,C)	Precipitação por sulfato de amônio, diálise, cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica	de Decelle et al., 2004
<i>Bacillus thermantarcticus</i>	Xilana	pH 5,6; 80°C	Filtração a gel	Lama et al., 2004
<i>Thermotoga maritima</i>	Xilana e xilooligossacarídeos	pH 6,1; 50°C	Enzima recombinante, Cromatografia por afinidade	Jiang et al., 2004
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i>	Xilana	pH 5,6; 38°C	Precipitação por sulfato de amônio e cromatografia por interação hidrofóbica	de Cepeljnik et al., 2004
<i>Bacillus</i> sp.	Xilana	pH 6,5;8,5;10,5; 50°C	Precipitação por sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica e filtração a gel	de Sapre et al., 2005
<i>Aspergillus versicolor</i>	Xilana	pH 6,0-7,0; 55°C	Diálise, cromatografia de troca iônica, osmose reversa	de Carmona et al., 2005
<i>Aspergillus caespitosus</i>	Xilana e polpa kraft	pH 5,5-6,5 (iso.II); 6,5-7,0 (iso.I); 50-	Filtração a gel	Sandrim et al., 2005

<i>Penicillium citrinum</i>	Xilana	55 °C pH 5,0; 55°C	Cromatografia de troca iônica filtração a gel	Tanaka et al., e 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Xilana	pH 5,0; 55°C	Cromatografia de troca iônica filtração a gel	Krisana et al., e 2005
<i>Schizophyllum commune</i>	Glucuronaxilana e ácido aldotetraurônico	pH 5,5; 50°C	Cromatografia de troca iônica filtração a gel	Kolenová et al., 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Xilana	nd; 50°C	Enzima recombinante, filtração a gel	Levasseur et al., 2005

(\*) Dados apresentados em ordem cronológica a partir de 2000; nd (não determinado); iso (isozima)

A Tabela 2 aborda referências revisadas acerca das constantes michaelianas (Km) e substratos utilizados. Tal compilação promove uma visão global das últimas pesquisas e resultados acerca de potenciais microrganismos produtores e substratos indutores.

**Tabela 2.** Valores das constantes de Michaelis Menten (Km)

Km (mg.ml <sup>-1</sup> )	Comentário	Substrato	Microrganismo*	Autor(es)
40,9	Km aparente; 50°C	Xilana solúvel	<i>Acrophialophora nainiana</i>	Salles et al., 2000
16,1	Km aparente; 50°C	Xilana insolúvel	<i>Acrophialophora nainiana</i>	Salles et al., 2000
0,97	56°C; pH 6,0	Xilana	<i>Aspergillus nidulans</i>	Fernández-Espinar et al., 1994
0,7	60°C; pH 6,0	Xilana	Bacillus sp.	Bataillon et al., 2000
1,0	Enzima recombinante,	Xilana (birchwood)	<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	Sunna et al., 2000.
1,72; 1,68; 1,25	Xilanase A, B e C respectivamente	Carboximetilcelulose e Xilana	<i>Cellulomonas fimi</i>	Khanna e Gauri, 1993
1,27	50-55°C;	Xilana (Birchwood)	<i>Cellulomonas flavigena</i>	Martinez-Trujillo et al., 2003
0,65	60°C; pH 5,8	Xilana (larchwood)	<i>Clostridium thermolacticum</i>	Debeire et al., 1990
4,1; 7,7	Endo-1,4-beta-xilanase A e B respectivamente	Xilana de aveia	<i>Euphausia superba</i>	Turkiewicz et al., 2000.
1,63	55°C	Xilana	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Khasin et al., 1990
2,14; 2,07; 0,4	Ia, Ib, Ic respectivamente	Xilana (Larchwood)	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Saraswat & Bisaria, 2000
5,56; 4,97; 6,90; 2,31	IIa, IIb, IIc, IId respectivamente	Xilana (Birchwood a,c; Beechwood b,d)	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Saraswat & Bisaria, 2000
4,86; 2,7	XA-1 e XA-2 respectivamente	Xilana (Larchwood)	<i>Phelbia radiata</i>	Rogalski et al., 2001
0,5 – 5,0	Km aparente; família 8 das xilanases,	Xilana	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Collins et al., 2002

4,0;7,0	enzimas recombinantes. Referente Birchwood e cereais respectivamente	Xilana	Staphylococcus sp.	Gupta et al., 2000
2,22; 1,05; 0,97	Xyl 1, Xyl 2 e Xyl 3 respectivamente	Xilana (Birchwood)	Streptomyces sp.	Georis et al., 2001
4,0	55°C; pH 5,5	Xilana	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Ghosh et al., 1990
0,11; 0,079	Xilana (birchwood) e xilana de cereais respectivamente; Km aparente; enzima recombinante	Xilana	<i>Thermotoga maritima</i>	Jiang et al., 2004
10,14	-	Xilana (cereais)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Chen et al., 1997

(\*) Dados apresentados em ordem alfabética

### Purificação e aplicação biotecnológica das xilanases

As xilanases são produzidas principalmente por bactérias e fungos e hidrolisam, em grande parte dos trabalhos revisados, a xilana. A purificação é uma etapa importante que precede a aplicação biotecnológica das xilanases, técnicas de purificação são utilizadas na maioria dos trabalhos (Tabela 1) e é essencial para obtenção de enzimas puras, específicas e sem perda de atividade enzimática (Zuniga et al., 2003). A purificação enzimática pode ser baseada na alteração da solubilidade. Tal mecanismo baseia-se principalmente na precipitação por sais. Sapre et al. (2005) realizaram a purificação e caracterização da xilanase termoalcalofílica proveniente de bactérias do gênero bacillus; esta xilanase foi purificada através da adição do sulfato de amônio. Mesmo procedimento foi utilizado por Decelle et al. (2004), com a purificação de endo-1,4- $\beta$ -xilanases da *Phanerochaete chrysosporium*.

A purificação também pode ser baseada na carga inerente da enzima. A cromatografia de troca-iônica permite a migração diferencial das enzimas numa mistura. Kolenová et al. (2005) utilizaram a cromatografia de troca-iônica para a purificação de endo-1,4- $\beta$ -xilanases de *Schizophyllum commune*. Outra técnica cromatográfica muito utilizada para a purificação das xilanases é a cromatografia em gel ou filtração a gel; esta análise cromatográfica baseia-se no tamanho molecular da enzima. Geralmente é usada após a realização de uma separação baseada na carga da enzima (Kolenová et al., 2005; Sapre et al., 2005).

O conhecimento dos parâmetros cinéticos é de extrema importância para a modelagem de um processo bioquímico. Através do estudo desses parâmetros pode-se inferir, por exemplo, a velocidade de utilização de substratos e de crescimento da biomassa. A caracterização da endo-1,4- $\beta$ -Xilanase do *Penicillium citrinum*, e a atividade enzimática ótima a pH 5,0; 55°C, usando xilana como substrato, foram verificadas tendo-se conhecimentos prévios dos parâmetros cinéticos da enzima (Tanaka et al., 2005). Dados referentes à atividade enzimática ótima são levados em consideração na sua aplicação em um processo industrial.

A aplicação biotecnológica das xilanases tem aumentado nas últimas décadas. Grande destaque tem sido dado para as xilanases termoestáveis. A termoestabilidade é essencial para certas aplicações industriais que se desenvolvem em temperaturas elevadas (Wu et al., 2008). Recentemente, xilanases termoestáveis têm sido usadas na indústria de panificação. Jiang et al. (2008), estudou o efeito da xilanase termoestável, da *Thermotoga maritima* na melhora da qualidade no congelamento parcial de pães assados. A xilanase aumentou a maciez e o volume do pão, melhorou a firmeza da migalha e diminuiu a recristalização da amilopectina do pão assado parcialmente congelado (Jiang et al., 2008). Sendo assim, as xilanases termoestáveis se colocam como boa estratégia para a aditivção de produtos panificados nas etapas de produção e armazenamento (Haros et al., 2002; Jiang et al., 2008;). Xilanases termoestáveis podem ser utilizadas também na produção de papel. A

verificação da aplicação industrial da xilanase termoestável, obtida da *Thermotoga marítima*, no pré-branqueamento da polpa Kraft (Jiang et al., 2004), onde este procedimento é essencial para a obtenção de um papel de boa qualidade (Bae et al., 2008).

## RESUMO

As endo  $\beta$  1,4 xilanases são enzimas extracelulares que fazem a hidrólise de substratos que possuem ligações do tipo  $\beta$  1,4. A xilana é o principal representante dentre os substratos susceptíveis ao ataque hidrolítico das xilanases. Encontra vasta aplicação em diferentes setores da economia. O objetivo do presente trabalho foi revisar a literatura publicada sobre as principais metodologias utilizadas para se trabalhar com estas enzimas, bem como reunir alguns parâmetros cinéticos. As metodologias revisadas estão centralizadas principalmente no processo de purificação, haja vista que é uma etapa essencial para otimização da sua atividade enzimática e consequente aplicação industrial. Destacam-se as técnicas que utilizam a precipitação por sais e metodologias refinadas como a cromatografia e suas variações. Tem ganhado destaque, em pesquisas acadêmicas, os estudos de planejamentos fatoriais e imobilização enzimática. Tais metodologias buscam respectivamente, dentre outras coisas, condições otimizadas de produção e reciclagem enzimática.

**Palavras-chave:** Atividade enzimática, técnicas de purificação, imobilização de enzimas, xilanas, termoestabilidade

## REFERÊNCIAS

Bae, H. J.; Kim, H. J.; Kim, Y. S. (2008), Production of a recombinant xylanase in plants and its potential for pulp biobleaching applications. *Bioresource Technology*, **99**, 3513-3519.

Bakalova, N. G.; Petrova, S. D.; Atev, A. P.; Bhat, M. K.; Kolev, D. N. (2002), Biochemical and catalytic properties of endo-1,4-beta-xylanases from *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). *Biotechnology Letters*, **24**, 1167-1172.

Bataillon, M.; Nunes Cardinali, A. P.; Castillon, N.; Duchiron, F. (2000), Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 187-192.

Cardoso, O. A. V. and Ferreira Filho, E. X. (2003), Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora*

*nainiana*. *FEMS Microbiology Letters*, **223**, 309-314.

Carmona, E. C.; Fialho, M. B.; Buchgnani, E. B.; Coelho, G. D.; Brocheto-Braga, M. R.; Jorge, J. A. (2005), Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry*, **40**, 359-364.

Cepeljnik, T.; Krizaj, I.; Marinsek-Logar, R. (2004), Isolation and characterization of the *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T xylanase XynT - the first family 11 endoxylanase from rumen *Butyrvibrio*-related bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 219-227.

Chen, C.; Chen, J-L.; Lin, T-Y. (1997), Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 91-96.

Collins, T.; Meuwis, M. A.; Stals, I.; Claeysens, M.; Feller, G.; Gerday, C. (2002), A Novel Family 8 Xylanase, Functional and Physicochemical Characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 35133-35139.

Damaso, M. C. T.; Almeida, M. S.; Kurtenbach, E.; Martins, O. B.; Pereira-Jr. N.; Andrade, C. M. M. C.; Albano, R. M. (2003), Optimized expression of a thermostable xylanase from *thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Applied and environmental microbiology*, **69**, 6064-6072.

Debeire, P.; Priem, B.; Strecker, G.; Vignon, M. (1990), Purification and properties of an endo-1,4-xylanase excreted by a hydrolytic thermophilic anaerobe, *Clostridium thermolacticum*: A proposal for its action mechanism on larchwood 4-O-methylglucuronoxylan. *European Journal of Biochemistry*, **187**, 573-580.

Decelle, B.; Tsang, A.; Storms, R. K. (2004), Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-*b*-xylanases. *Current Genetics*, **46**, 166-175.

Fernández-Espinar, M.; Piñaga, F.; Graaff, L. de; Visser, J.; Ramón, D., Vallés, S. (1994),

- Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, 1994.
- George, S. P.; Ahmad, Rao, M. B. (2001), Involvement of a Lysine Residue in the Active Site of a Thermostable Xylanase from *Thermomonospora* sp. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **282**, 48-54.
- Georis, J.; Giannotta, F.; De Buyl, E.; Granier, B.; Frèrea, J-M. (2000), Purification and properties of three endo- $\beta$ -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 178-186.
- Ghosh, A. K.; Banerjee, P. C.; Sengupta, S. (1980), Purification and properties of xylan hydrolase from mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Biochimica Biophysica Acta*, **612**, 143-152.
- Gupta, S.; Bhushan, B.; Hoondal, G. S. (2000), Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 325-334.
- Haros, M.; Rosell, C. M.; Benedito, C. (2002), Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *European Food Research and Technology*, **215**, 425-430.
- Heck, J. X.; Soares, L. H. B.; Hertz, P. F.; Ayub, M. A. Z. (2006), Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, **32**, 179-184.
- Jänis, J.; Pulkkinen, P.; Rouvinen, J.; Vainiotalo, P. (2007), Determination of steady-state kinetic parameters for a xylanase-catalyzed hydrolysis of neutral underivatized xylooligosaccharides by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **365**, 165-173.
- Jiang, Z. Q.; Deng, W.; Zhu, Y. P.; Li, L. T.; Sheng, Y.J.; Hayashi, K. (2004), The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **27**, 207-213.
- Jiang, Z.; Bail, A. L.; Wu, A. (2008), Effect of the thermostable xylanase B (XynB) from *Thermotoga maritima* on the quality of frozen partially baked bread. *Journal of Cereal Science*, **47**, 172-179.
- Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Vrsanská, M.; Kekos, D.; Macris, B. J. (2001), Catalytic properties of the endoxylanase I from *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**, 491-501.
- Kaneko, S.; Kuno, A.; Muramatsu, M.; Iwamatsu, S.; Kusakabe, I.; Hayashi, K. (2000), Purification and characterization of a family G/11 beta-xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **634**, 447-451.
- Katapodis, P.; Vrsanská, M.; Kekos, D.; Nerinckx, W.; Biely, P.; Claeysens, M.; Macris, B. J.; Christakopoulos, P. (2003), Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum thermophile*. *Carbohydrate Research*, **338**, 1881-1890.
- Khanna, S. and Gauri. (1993), Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme and Microbial Technology*, **15**, 990-995.
- Khasin, A.; Alchanati, I.; Shoham, Y. (1993), Purification and Characterization of a Thermostable Xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and environmental microbiology*, **59**, 1725-1730.
- Kolenová, K.; Vrsanská, M.; Biely, P. (2005), Purification and characterization of two minor endo- $\beta$ -1,4-xylanases of *Schizophyllum commune*. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 903-910.
- Kolenová, K.; Vrsanská, M.; Biely, P. (2005), Purification and characterization of two minor endo- $\beta$ -1,4-xylanases of *Schizophyllum commune*. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**, 903-910.
- Krisana, A.; Rutchadaporn, S.; Jarupan, G.; Lily, G.; Sutipa, T.; Kanyawim, K. (2005), Endo-1,4- $\beta$ -

- xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 Isolated in Thailand: Purification, Characterization and Gene Isolation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**, 17-23.
- Lama, L.; Calandrelli, V.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B. (2004), Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research in Microbiology*, **155**, 283-289.
- Levasseur, A.; Asther, M.; Record, E. (2005), Overproduction and characterization of xylanase B from *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**, 177-183.
- Li, Y.; Cui, F.; Liu, Z.; Xu, Y.; Zhao, H. (2007), Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1381-1388.
- Mansour, F. A.; Shereif, A. A.; Nour El-Dein, M. M.; Bou-Dodara, M. I.; Ball, A. S. (2003), Purification and characterization of xylanase from a thermophilic *Streptomyces* sp. K37. *Acta Microbiologica Polonica*, **52**, 159-172.
- Martínez-Trujillo, A.; Pérez-Avalos, O.; Ponce-Noyola, T. (2003), Enzymatic properties of a purified xylanase from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 401-406.
- Ramos, C.; Morais, H.; Forgacs, E.; Cserhati, T.; Matos, N.; Oliveira, J. S. (2000), Biochemical characterization of xylanases of four strains of *Lentinus edodes*. *Environmental Research Letters*, **9**, 219-227.
- Rogalski J, Oleszek M, Tokarzewska-Zadora J. (2001), Purification and characterization of two endo-1,4-beta-xylanases and a 3-xylosidase from *Phlebia radiata*. *Acta Microbiologica Polonica*, **50**, 117-128.
- Saha, B. C. (2002), Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, **37**, 1279-1284.
- Salles, B. C.; Cunha, R. B.; Fontes, W.; Sousa, M. V.; Filho, E. X. F. (2000), Short communication Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology*, **81**, 199-204.
- Sandrima, V. C.; Rizzatti, A. C. S.; Terenzi, H. F.; Jorgeb, J. A.; Milagres, A. M. F.; Polizeli, M. L. T. M. (2005), Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochemistry*, **40**, 1823-1828.
- Sapre, M. P.; Jha, H.; Patil, M. B. (2005), Purification and characterization of a thermoalkalophilic xylanase from *Bacillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**, 649-654.
- Saraswat, V. and Bisaria, V. S. (2000), Purification and characterization and substrates specificities from xylanases isoenzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **64**, 1173-1180.
- Sunna, A.; Gibbs, M. D.; Bergquist P. L. (2000), A novel thermostable multidomain 1,4- $\beta$ -xylanase from '*Caldibacillus cellulovorans*' and effect of its xylan-binding domain on enzyme activity. *Microbiology*, **146**, 2947-2955.
- Takahashi, H.; Nakai, R.; Nakamura, S. (2000), Purification and partial characterization of a basic Xylanase Produced by Thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. Strain TAR-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **64**, 887-890.
- Tanaka, H.; Nakamura, T.; Hayashi, S.; Ohta, K. (2005), Purification and Properties of an Extracellular Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase from *Penicillium citrinum* and Characterization of the Encoding Gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**, 623-630.
- Turkiewicz, M.; Kalinowska, H.; Zielinska, M.; Bielecki, S. (2000), Purification and characterization of two endo-1,4-xylanases from Antarctic krill, *Euphausia superba* Dana. *Comparative Physiology and Biochemistry*, **27**, 325-335.



Wu, H.; Pei, J.; Wu, G.; Shao, W. (2008), Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application. *Enzyme and Microbial Technology*, **42**, 230-234.

Zuniga, A. D. G.; Pereira, J. A. M.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A.; Rojas, E. E. G. (2003), Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. *Boletim do Ceppa*, **21**, 61-82.