

# Padronização de microensaio para dosagem de atividade xilanolítica

Helder Andrey Rocha Gomes<sup>1</sup>, Daiana Wischral<sup>2</sup>, Thályta Fraga Pacheco<sup>3</sup>, Thais Demarchi Mendes<sup>4</sup>, Thais Fabiana Chan Salum<sup>5</sup>, Sílvia Belem Gonçalves<sup>6</sup>, Mônica Caraméz Triches Damaso<sup>7</sup>

## Resumo

Métodos de quantificação de enzimas por microensaio são essenciais, principalmente, em processos de screening, pois reduzem a quantidade de reagentes utilizados e aumenta o número de amostras a serem analisadas no mesmo ensaio. As xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise da xilana para produção de xilose. Ainda não existe na literatura a padronização da determinação de microensaio desta enzima, portanto, o objetivo deste trabalho foi padronizar um ensaio para determinação de xilanase em microescala. Nos experimentos, utilizou-se endoxilanase comercial de *Trichoderma longibrachiatum* e xilana comercial de *beechwood* nas concentrações de 1% e 4% (p/v). A determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) foi realizada a partir de 5 µL de enzima (diferentes diluições) e 45 µL de xilana. Os ensaios foram incubados a 50 °C em termociclador. Em seguida, 120 µL de ácido dinitrisalicílico (DNS) foram adicionados e o ensaio foi submetido à fervura durante 10 minutos. Posteriormente, 150 µL do ensaio foram transferidos para a microplaca de leitura e a absorbância foi determinada (540 nm) para o cálculo das concentrações de ART. O mesmo ensaio foi avaliado em outra configuração na qual foi adicionada uma etapa de diluição do ensaio após a fervura. Os ensaios foram realizados com tempos de incubação em termociclador de 5, 10, 15 e 30 minutos. Considerando as velocidades iniciais das reações, a taxa de formação de produto foi linearmente proporcional à concentração de enzima utilizada, para uma mesma concentração de substrato. O tempo de incubação de 15 minutos foi estabelecido para os ensaios enzimáticos futuros. As velocidades de formação de produto foram semelhantes para as concentrações de 1% e 4% de substrato, o que evidencia que a enzima já está saturada a partir da concentração de 1%. A quantificação de ART foi semelhante para as duas configurações de ensaio. O ensaio sem diluição foi selecionado, uma vez que se elimina uma etapa, minimizando assim as chances de erro experimental e aumentando a sensibilidade do método. Portanto, foram estabelecidas como condições padrão para dosagem de atividade xilanolítica: concentração de substrato em 1% (p/v) e tempo de reação de 15 minutos. Outros estudos serão realizados para extratos brutos. Contudo, já foi possível observar que para a padronização do ensaio, a diluição adequada do extrato deve fornecer, ao fim da reação, aproximadamente 0,0025 mg de ART, garantindo que haja ainda o excesso de substrato recomendado para utilização do método das velocidades iniciais.

Auxílio Financeiro: BNDES.

**Palavras-chave:** xilana de *beechwood*. xilanase. microensaio.

<sup>1</sup> Biólogo, doutor em Biologia Molecular, consultor da Embrapa Agroenergia, helder.gomes@colaborador.embrapa.br.

<sup>2</sup> Engenheira de alimentos, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, consultora da Embrapa Agroenergia, daiana.wischral@colaborador.embrapa.br.

<sup>3</sup> Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br.

<sup>4</sup> Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br.

<sup>5</sup> Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br.

<sup>6</sup> Engenheira química, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br.

<sup>7</sup> Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br.