



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento

Produção, purificação e caracterização bioquímica funcional de uma α -L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *Coriolopsis byrsina*

São José do Rio Preto

2023

Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento

Produção, purificação e caracterização bioquímica funcional de uma α -L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *Coriolopsis byrsina*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES – Financiamento/001

Orientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

Coorientador: Dr^a Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2023

N244p

Nascimento, Carlos Eduardo de Oliveira

Produção, purificação e caracterização bioquímica funcional de uma
-L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *Coriolopsis byrsina* / Carlos Eduardo de
Oliveira Nascimento. -- São José do Rio Preto, 2023

70 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências
Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Ronivaldo Rodrigues da Silva

Coorientadora: Eleni Gomes

1. -L-arabinofuranosidases. 2. agliconas terpênicas. 3. cultivo em estado sólido. 4.
fungos. 5. microrganismos. I. Título.

Carlos Eduardo de Oliveira Nascimento

Produção, purificação e caracterização bioquímica funcional de uma α -L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *Coriolopsis byrsina*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES – Financiamento/001

Orientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

Coorientador: Dr^a Eleni Gomes

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Eduardo Martins
UEMG – Câmpus Frutal – MG

Prof^a. Dr^a. Gabriela Salvador De Amo
IF – Câmpus Catanduva – SP

Prof^a. Dr^a. Ana Lucia Ferrarezi Duarte
CEO – Biomade Soluções Biotecnológicas

Prof^a. Dr^a. Janaina Pires Borges
Diretora de Produção - Biomade Soluções Biotecnológicas

São José do Rio Preto

14 de Abril de 2023

*Que não me falte sensibilidade para ver como a natureza,
em seus mínimos detalhes, transforma tudo que toca.*

Autor Desconhecido

Dedicatória

Agradeço a Deus por nunca me deixar desanimar diante das minhas escolhas.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Ronivaldo, por todo o apoio durante essa jornada, por toda as conversas, por todos os cafés, todos os conselhos, e pela amizade que vou levar para o resto da minha vida.

Gostaria de agradecer a minha querida amiga Cíntia Lionela pelo apoio no laboratório, nos dias difíceis e durante nossos desabafos na cozinha, onde tínhamos certeza que tudo daria errado, mas chegar até aqui e ter a oportunidade de ter percorrido essa pequena jornada juntos, percebo que estávamos completamente enganados e que, errados estávamos em duvidar da oportunidade que nos foi dado.

Aos meus pais que, mesmo longe, foram fonte de coragem e determinação para dias que nem eu mesmo acreditava em mim.

Aos amigos que a vida me deu, Japa, Alexandre, Carol e o grande Otávio e passamos por difíceis momentos durante a pandemia.

Aos meus amigos Erike e Anás pelos churrascos no lab, pelas conversas e pelo apoio.

A minha querida amiga Eliete que durante essa jornada se tornou uma irmã e que em momento algum, deixou de me apoiar.

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

RESUMO

As α -L-arabinofuranosidases podem ser produzidas por fungos, bactérias e plantas e são responsáveis pela clivagem de ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,5 envolvendo arabinose. Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado suas aplicações no processamento de sucos, visando diminuir a viscosidade e promoção da clarificação, e hidrólise de biomassa vegetal. Outro interesse por estas enzimas decorre de sua capacidade para melhorar a liberação de compostos aromatizantes presentes em bebidas como vinho, cerveja e sucos. Em vista das diferentes aplicações, o presente trabalho focou na prospecção de α -L-arabinofuranosidases dos fungos filamentosos *Thermothelomyces heterothallica*, *Rasamsonia emersoni* e *Coriolopsis byrsina* SXS16. Em seguida, conforme a capacidade de produção de α -L-arabinofuranosidases, foi purificada uma enzima secretada pelo fungo *C. byrsina* SXS16 e investigada suas propriedades bioquímicas funcionais. A enzima purificada, com massa molecular estimada em 55 kDa, exibiu máxima atividade a pH 3,5-4,0 e 50 °C, e estabilidade em faixa de pH 3-8 a 4 °C por 24 horas, e temperatura de 10 a 60 °C por 1 hora, cujas atividades remanescentes foram superiores a 70%. A enzima também se mostrou estável a etanol 5-10% após 24 horas de incubação a 28 °C, retendo atividade enzimática superior a 75% após incubação com etanol 5%, e para etanol 10%, superior a 60% de atividade. Ao avaliar a atividade enzimática sob a influência de íons metálicos, foi observado uma redução da catálise para para todos os íons, especialmente Fe^{3+} e Hg^{2+} , cujas atividades enzimáticas residuais foram 25% e 33%, respectivamente. Em presença de D e L arabinose, a inibição enzimática foi notada apenas com L-arabinose, exibindo 50% de atividade residual a 0,2 mol L⁻¹ e 30% a 0,9 mol L⁻¹ deste açúcar. A enzima foi ativa sobre *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (*p*NPA) e *p*-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPX), com $6,71 \pm 0,23$ e $0,38 \pm 0,07$ U mg⁻¹, respectivamente, e para cinética enzimática com o substrato *p*NPA, notamos um K_M de $3,45 \pm 0,9$ mmol L⁻¹ e $V_{\max}$ de $198,2 \pm 24$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. A enzima também foi capaz de hidrolisar α -1,5-L-arabinana linear, mas nenhuma atividade foi notada sobre os substratos *p*-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo e *p*-Nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminídeo.

Palavras chaves: α -L-arabinofuranosidases. Agliconas terpénicas. Cultivo em estado sólido. Fungos. Microrganismos.

ABSTRACT

α -L-arabinofuranosidases can be produced by fungi, bacteria and plants and are responsible for the cleavage of α -1,2, α -1,3 and α -1,5 glycosidic bonds involving arabinose. In recent years, many studies have demonstrated its applications in juice processing, aiming to reduce viscosity and promote clarification and hydrolysis of plant biomass. Another interest in these enzymes is related to their ability to improve the release of flavoring compounds present in beverages such as wine, beer and juices. In view of the different applications, the present work focused on the prospection of α -L-arabinofuranosidases from the filamentous fungi *Thermothelomyces heterothallica*, *Rasamsonia emersoni* and *Coriolopsis byrsina* SXS16. Then, according to the production capacity of α -L-arabinofuranosidase, it was purified the enzyme secreted by the fungus *C. byrsina* SXS16 and investigated its functional biochemical properties. The purified enzyme, with an estimated molecular mass of 55 kDa, exhibited maximum activity at pH 3.5-4.0 and 50 °C, and stability in a range of pH 3-8 at 4 °C for 24 hours, and temperature from 10 to 60 °C for 1 hour, whose remaining activities were greater than 70%. The enzyme was also stable for 5-10% ethanol after 24 hours of incubation at 28 °C, retaining enzyme activity greater than 75% after incubation with 5% ethanol, and for 10% ethanol, greater than 60% activity. When evaluating enzymatic activity under the influence of metal ions, a reduction in catalysis was observed for all ions, especially Fe^{3+} and Hg^{2+} , whose residual enzymatic activities were 25% and 33%, respectively. In the presence of D and L arabinose, enzyme inhibition was noted only with L-arabinose, exhibiting 50% residual activity at 0.2 mol L⁻¹ and 30% at 0.9 mol L⁻¹ of this sugar. The enzyme was active on *p*-Nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (*p*NPA) and *p*-Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (*p*NPX), with 6.71 ± 0.23 and 0.38 ± 0.07 U mg⁻¹, respectively, and for enzyme kinetics under *p*NPA substrate, we noted a K_M of 3.45 ± 0.9 mmol L⁻¹ and $V_{\max}$ of 198.2 ± 24 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. The enzyme was also able to hydrolyze linear 1,5 α -L-arabinan, but no activity was noted on the substrates *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside and *p*-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide.

Keywords: α -L-arabinofuranosidases. Terpenic aglicone. Solid state cultivation. Fungi. Microorganisms.

LISTA DE FIGURAS	pg
Figura 1. Estrutura lignocelulósica e seus açúcares constituintes	16
Figura 2. Enzimas envolvidas da hidrólise hemicelulose	17
Figura 3. Estruturas de arabinoxilana, glucuronoarabinoxilana de milho e L-arabinana	20
Figura 4. Ação de enzimas desramificantes de arabinoxilana e arabinoglucuronoxilana/glucuronoarabinoxilana	24
Figura 5. Enzimas secretadas por <i>R. emersoni</i> em FES contendo palha ou sabugo de milho	39
Figura 6. Enzimas secretadas por <i>C. byrsina</i> em FES contendo palha ou sabugo de milho	39
Figura 7. Enzimas secretadas por <i>T. heterothallica</i> em FES contendo palha ou sabugo de milho	34
Figura 8. Cromatografia catiônica em resina Source 15S, coluna Tricorn 4.6/100 acoplada ao cromatógrafo Akta Purifier FPLC (GE Healthcare)	42
Figura 9. Cromatografia aniônica HiTrap Q XL 1 mL acoplada ao cromatógrafo Akta Purifier FPLC (GE Healthcare)	43
Figura 10. Gel SDS-PAGE 12% da enzima pura obtida após etapas cromatográficas	44
Figura 11. Efeito de pH na atividade e estabilidade da enzima secretada pelo fungo <i>C. byrsina</i>	47
Figura 12. Efeito de temperatura na atividade e estabilidade da enzima secretada pelo fungo <i>C. byrsina</i>	48
Figura 13. Efeito de íons metálicos a 5 e 10 mol L ⁻¹ na atividade da enzima secretada pelo fungo <i>C. byrsina</i>	51
Figura 14. Incubação da enzima com etanol (5, 10 e 15%) por 12 e 24 horas a 28 °C	53
Figura 15. Efeito de D e L arabinose (0,01-0,9 mol L ⁻¹) na atividade da enzima secretada pelo fungo <i>C. byrsina</i>	55
Figura 16. Cromatografia de camada delgada do produto da hidrólise de L-arabinana pela enzima α -L-arabinofuranosidase	57
Figura 17. Cinética (Gráfico de Michaelis-Menten) da enzima α -L-arabinofuranosidase variando a concentração do substrato <i>p</i> -Nitrofenil- α -L-arabinofuranosideo	59

LISTA DE TABELAS	pg
Tabela 1. Classificação e modo de ação das α -L-arabinofuranosidases (Cazy, 2021)	22
Tabela 2. Parâmetros para o cultivo em placa de Petri dos fungos utilizados neste trabalho	30
Tabela 3. Proporção utilizada para a concentração do extrato enzimático bruto	32
Tabela 4. Sumário de purificação da α -L-arabinofuranosidase secretada por <i>C. byrsina</i>	45
Tabela 5. Hidrólise de diferentes substratos pela enzima α -L-arabinofuranosidase	56

SUMÁRIO		pg
1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Biomassa lignocelulósica e enzimas	15
2.1.1	Polímeros contendo arabinose e tipos de α -L-arabinofuranosidases	18
2.2	Microrganismos produtores de α-L-arabinofuranosidases	24
2.3	Aplicações de α-L-arabinofuranosidase	27
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Parâmetros de cultivo dos fungos	30
4.2	Produção de enzimas	30
4.3	Atividade enzimática	31
4.4	Purificação da enzima	32
4.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	34
4.6	Quantificação de proteínas totais	34
4.7	Caracterização físico-química da α-L-arabinofuranosidase	34
4.7.1	Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática	34
4.7.2	Efeito de íons metálicos e etanol	35
4.7.3	Teste de inibição por D e L-arabinose	36
4.8	Teste de hidrólise de diferentes substratos	36
4.9	Cinética enzimática	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Produção de α-L-arabinofuranosidase por FES	38
5.2	Purificação da enzima α-L-arabinofuranosidase secretada por <i>C. byrsina</i>	41
5.2.1	Concentração da enzima	41

5.3	Caracterização bioquímica funcional da α-L-arabinofuranosidase	46
5.3.1	Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da enzima	46
5.3.2	Efeito de íons metálicos na atividade enzimática	50
5.3.3	Efeito de etanol na estabilidade da enzima	51
5.3.4	Efeito de D e L-arabinose na atividade enzimática	54
5.4	Hidrólise de diferentes substratos	55
5.5	Cinética enzimática	58
6	CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS		

1. INTRODUÇÃO

Com a tendência mundial por tecnologias de baixo impacto ambiental, enzimas se destacam como atores importantes para a bioeconomia circular no tratamento de biomassas vegetal e animal, que são subprodutos da atividade industrial. Nos últimos anos, com o aumento da demanda por novas fontes de energia, devido a sua composição rica em carboidratos, a biomassa vegetal tem recebido maior atenção para uso como matéria-prima em bioenergia. Na esteira da transição energética, com o propósito de aumentar o uso de combustíveis renováveis em detrimento aos combustíveis fósseis, muitos grupos de pesquisa têm direcionado atenção às enzimas lignocelulolíticas. Dentre estas, destacam-se celulasas, xilanases, β -glicosidases, β -xilosidases e α -L-arabinofuranosidases.

É consenso que o avanço biotecnológico, em especial no campo de tecnologia enzimática, tem feito com que resíduos da agroindústria, antes sem valor econômico relevante, apresentem significativa valorização. A hidrólise enzimática das frações de celulose e hemicelulose tem sido intensivamente investigada nos últimos anos, a fim de disponibilizar açúcares fermentescíveis para obtenção de novos produtos de valor agregado, como etanol, xilitol e ácidos orgânicos.

Dentre as enzimas que vem sendo exploradas nas pesquisas mais recentes, destacam-se as α -L-arabinofuranosidases. Estas enzimas pertencem à família das Glicosil Hidrolases (GH) e são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas envolvendo resíduos de arabinose. Sendo uma enzima auxiliar na hidrólise de hemicelulose, elas podem disponibilizar arabinose livre como mais um açúcar fermentescível. Como resultado do aumento na procura por estas enzimas, uma variedade de outras propostas de aplicação, além do setor de bioenergia, também tem sido sugerida, como uso em indústria de alimentos e bebidas.

A aplicação de enzimas voltada ao melhoramento sensorial de bebidas tem ganhado espaço nos últimos anos, sobretudo na área de produção de cervejas, vinhos e sucos. O interesse no uso de α -L-arabinofuranosidases se sustenta na possibilidade de conferir efeito clarificante, e também para a liberação de terpenos conjugados com arabinose, contribuindo para a melhoria da qualidade sensorial de bebidas.

A base para produção de bebidas fermentadas geralmente são matrizes complexas ricas em amido, sacarose e hemicelulose. A hemicelulose apresenta uma alta complexidade estrutural, contendo açúcares, ácidos e compostos aromáticos que muitas vezes não são aproveitados totalmente na produção de bebidas, mas podem interferir na viscosidade do produto. Em cervejas e vinhos, alguns destes compostos aromáticos, como os terpenos, podem apresentar-se não complexados a uma molécula de açúcar, sendo assim voláteis, ou na forma de agliconas terpênicas, não voláteis. Os terpenos não complexados em açúcar (voláteis) respondem por uma parte das características aromáticas do produto podendo conferir notas floral, frutado, herbáceo, amadeirado, entre outros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica e enzimas

Na natureza, diversos organismos podem expressar genes para a produção de enzimas lignocelulolíticas. Um verdadeiro “arsenal” enzimático, que inclui celulases, hemicelulases e lacases, pode ser produzido por microrganismos para que ocorra a completa desestruturação da biomassa lignocelulósica, e os açúcares sejam utilizados como fonte de carbono e energia (HEUBERGER et al., 2016; HOLT et al., 2019; VAŠTÍK et al., 2020).

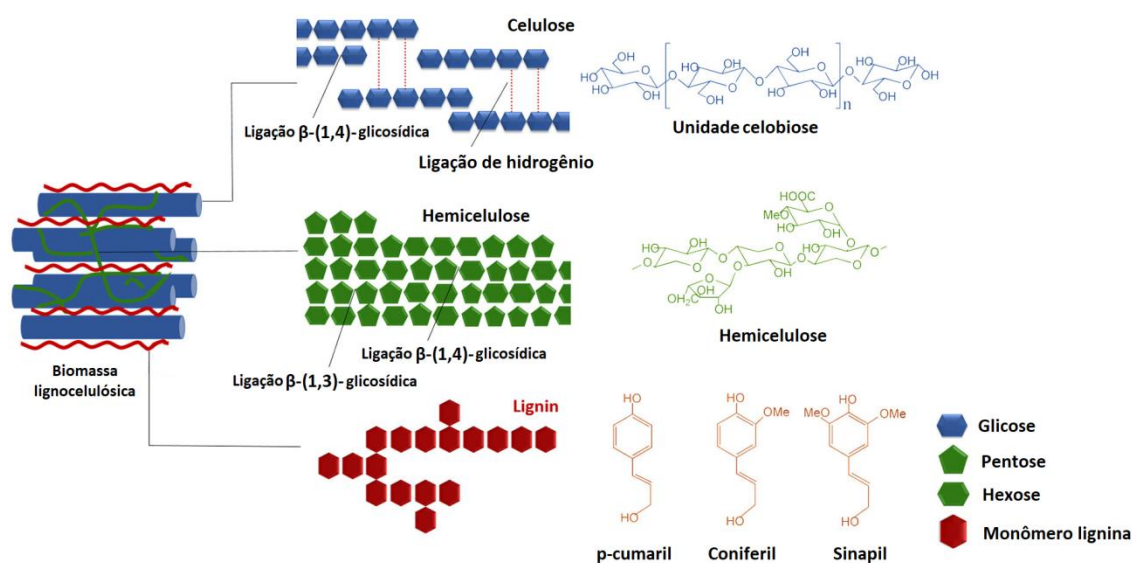
Resíduos agroindustriais têm sido muito utilizados em fermentação microbiana para a produção de enzimas, as quais podem ser aplicadas em diferentes áreas, como têxtil, bioenergia, formulação de detergentes, indústria de alimentos, entre outros. A biomassa vegetal é composta por três estruturas completamente distintas entre si, celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é composta por unidades de glicose interligadas por ligação β -1,4 e apresenta dois tipos de conformação estrutural, sendo: amorfa e cristalina (BHARDWAJ et al. 2021). A celulose amorfa apresenta alta desordem e ausência de ligações de hidrogênio tornando-a solúvel em água e mais suscetível ao ataque de enzimas (CASSIA PEREIRA et al., 2016). Ao contrário da fração amorfa, a celulose cristalina apresenta alta organização em sua forma estrutural, com grande número de ligações de hidrogênio tornando-a pouco acessível à exo-glucanases (EC 3.2.1.91) que são enzimas que atuam na hidrólise do homopolímero de celulose, em regiões não cristalinas (PERRONE et al., 2017).

A hidrólise de celulose a glicose depende da sinergia de três diferentes enzimas, endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) que atuam randomicamente na hidrólise de ligações glicosídicas em porções amorfas da fibra de celulose, liberando oligossacarídeos. Estes oligossacarídeos são clivados por exo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.91) que atuam nas

extremidades redutoras e não redutoras, liberando celobiose, a qual é hidrolisada a glicose pela ação de β -1,4-glicosidases (EC 3.2.1.21) (PEREIRA SCARPA et al., 2019; BHARDWAJ et al. 2021).

A lignina, outro componente da biomassa vegetal, é um heteropolímero fenólico composto basicamente de 3 moléculas, álcool férúlico, álcool cumárico e álcool sinapílico (Figura 1). Diferentemente das glicosidases responsáveis pela hidrólise da hemicelulose e celulose, as enzimas que atuam na despolimerização da lignina são peroxidases de classe II podendo ser, lignina peroxidase (LiP – E.C. 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP – E.C. 1.11.1.13), peroxidases versáteis (VP – E.C. 1.11.1.16) e lacases (E.C. 1.10.3.2) (PEREIRA SCARPA et al., 2019).

Figura 1. Estrutura lignocelulósica e seus açúcares constituintes



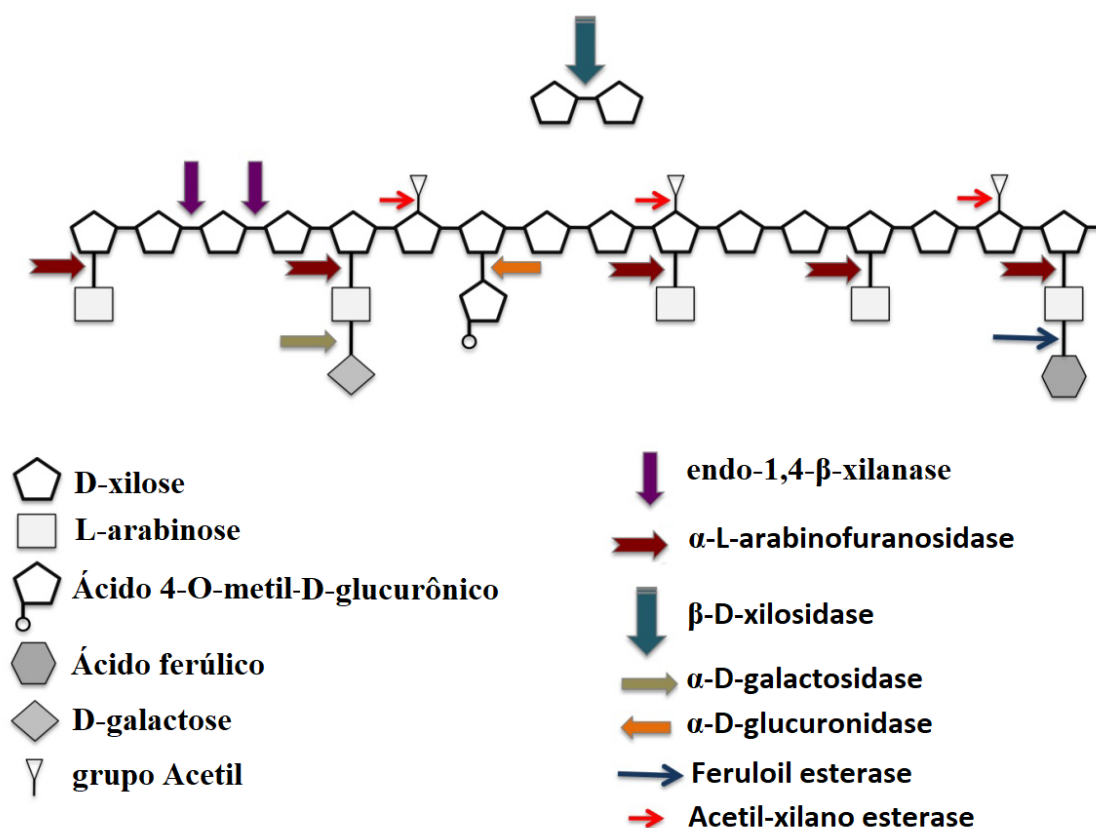
Fonte: Modificado de BARUAH et al. (2018)

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por pentoses e hexoses, sendo a xilana o tipo de hemicelulose mais abundante na natureza. Esta possui uma cadeia principal de xilose interligada por ligação β -(1,4) e diversas ramificações com variados açúcares como, arabinose, manose, galactose, ribose, ramnose, glicose e outras moléculas

como ácido glucurônico, ácido galacturônico, grupos acetil e metil (NASCIMENTO et al., 2022).

Para que haja uma completa desconstrução da hemicelulose é necessário a ação de um conjunto de enzimas, isso ocorre devido à grande diversidade de açúcares e ligações químicas presente na estrutura. Como é abordado da **Figura 2**, enzimas como endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), feruloil esterase (EC 3.1.1.73), acetil-xilano esterase (EC 3.1.1.72), α -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) e α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) são enzimas envolvidas na desconstrução da hemicelulose (SOUZA, 2013; GOLDBECK et al., 2016; RAHMANI et al. 2019; THAKUR et al., 2019).

Figura 2. Enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose



Fonte: Modificado de SOUZA (2013)

Na busca por fontes de energia renovável, nos últimos anos, muitos estudos têm focado atenções em celulasas e xilanases para degradação da biomassa vegetal e aproveitamento de glicose e xilose resultante, além do melhoramento de linhagens de leveduras para fermentar estes açúcares (SILVA et al., 2019). Enzimas desramificantes de hemiceluloses, como α -L-arabinofuranosidase, feruloil esterase, acetil-xilano esterase, α -D-glucoronidase e α -D-galactosidase, apesar de também serem estudadas, tem recebido menor atenção, quando comparadas a celulasas e endo-xilanases.

Além da importância para completa degradação da hemicelulose, estas enzimas desramificantes, como α -L-arabinofuranosidases, possuem uma gama de possibilidade de aplicações, como liberação de terpenos complexados com arabinose para melhoramento de aroma de bebidas, clarificação de sucos de frutas, melhoramento da textura de massas de pão, aumento da digestibilidade de ração animal, entre outras (PORIA et al., 2020).

2.1.1 Polímeros contendo arabinose e tipos de α -L-arabinofuranosidases

Em plantas, a maior quantidade de arabinose é encontrada compondo a cadeia principal e ramificações de arabinanas, e também grupos pendentes e ramificações em hemiceluloses arabinoxilana e glucuronoarabinoxilana (SAHA, 2000).

Principalmente associado a pectinas, a L-arabinana é um homopolissacarídeo formado por unidades de L-arabinose unidas por ligação glicosídicas (α -1,5), podendo apresentar ramificações em Oxigênio2 e Oxigênio3 (ligações α 1,2 e 1,3) (WILKENS et al., 2017). Para as xilanases, suas composições podem variar de acordo com a espécie vegetal e as condições ambientais em que a planta é cultivada (ORDAZ-ORTIZ, 2005). A arabinoxilana e glucuronoarabinoxilana são formadas por uma cadeia principal de β -

1,4-xilopiranosose que se diferenciam pela diversidade de grupos pendentes ou ramificações; enquanto a primeira apresenta grupo acetil, arabinose e ácido ferúlico (ligado a arabinose), a glucuronoarabinoxilana possui além destes três citados, D-galactose, e ácidos glucurônico e 4-O-metil glucurônico em sua estrutura (**Figura 3**). Quanto a arabinose, esta é unida a cadeia principal de xilose por ligação α (1,2 ou 1,3) (PORIA et al., 2020).

As arabinofuranosidases são glicosídeo hidrolases que podem clivar ligações glicosídicas do tipo α (1,2; 1,3 e 1,5) envolvendo resíduos de arabinose. Dentre estas enzimas, há representantes que hidrolisam substratos sintéticos, como *p*-Nitrofenil-arabinofuranosídeo, assim como substratos naturais poliméricos, como arabinoxilana e L-arabinana, ou arabino-oligossacarídeos (PORIA et al., 2020). A seguir, discutimos como as arabinofuranosidases são agrupadas, modo de ação e especificidade ao substrato.

α -1,3 ou α -1,5) e o ponto de clivagem no substrato (endo ou exo), são aspectos que indicam a diferenciação entre estas enzimas (PORIA et al., 2020). A tabela 1 mostra a classificação de α -L-arabinofuranosidases conforme o ponto de clivagem da enzima no substrato (endo ou exo), composição de aminoácidos em seu sítio catalítico, estrutura tridimensional e modo catalítico.

α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) e endo-1,5- α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.99) exibem diferenças na especificidade para clivagem das ligações α . O primeiro grupo apresenta maior versatilidade no modo de ação, incluindo representantes que podem clivar ligações do tipo α (1,2), α (1,3) e α (1,5). Diferentemente, endo-1,5- α -L-arabinofuranosidases exibem maior restrição catalítica, sendo capazes de clivar apenas ligação α (1,5), e por tal motivo são conhecidas como verdadeiras arabinases (THAKUR et al., 2019). Em geral, apesar de poderem degradar mais lentamente L-arabinana ramificada, as arabinases descritas até o momento têm demonstrado preferência pela cadeia linear de L-arabinana (Cazy, 2022: <https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.99>).

Quanto ao mecanismo de ação, as enzimas com atividade α -L-arabinofuranosidase das famílias GH2, GH3, GH51 e GH54 exibem catálise por retenção do carbono anomérico, diferentemente das enzimas incluídas em GH43 e GH62, que realizam catálise pelo modo de inversão da configuração anomérica (SANTOS et al., 2012).

Tabela 1. Classificação e modo de ação das α -L-arabinofuranosidases (Cazy, 2021)

Família	Atividade na família	Mecanismo catalítico	Clã	Estrutura Tridimensional	Catálise Nucleófilo/Base	Próton doador catalítico
2	α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	Retenção	GH-A	(β/α) 8 barrel	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico
3	α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	Retenção	*	(β/α) 8 barrel	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico
43	α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) α -1,2-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.-) exo- α -1,5-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.99) exo- α -1,5-L-arabinanase (EC 3.2.1.99) endo- α -1,5-L-arabinanase (EC 3.2.1.99)	Inversão	GH-F	5-fold β -propeller	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico
51	α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	Retenção	GH-A	(β/α) 8 barrel	Ácido Glutâmico	Ácido Glutâmico
54	α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	Retenção	*	β -jelly roll	Ácido Aspártico	Ácido Glutâmico
62	α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	Inversão	GH-F	5-fold β -propeller	Ácido Glutâmico	Ácido Aspártico

Legenda: (*): Informação desconhecida de acordo com o banco de dados Cazy - *Carbohydrate active enzymes*

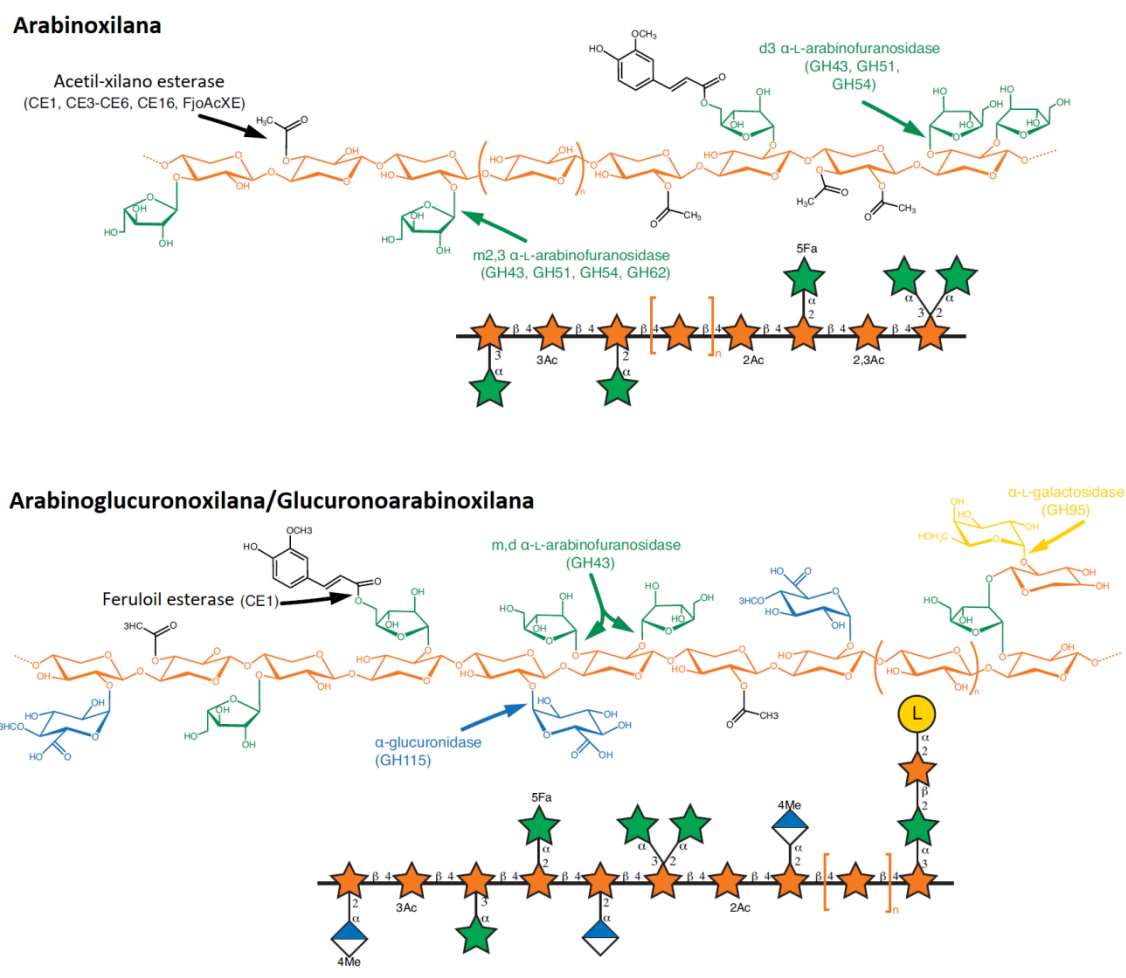
De acordo com a especificidade ao substrato, enzimas atuantes sobre polímeros, grupos pendentes e ramificações contendo arabinose apresentam alta capacidade para serem usadas em processos industriais como: desconstrução da biomassa lignocelulósica para produção de etanol 2G, indústria de bebidas, como sucos, cerveja e vinho, e na indústria farmacêutica como β - bloqueadores (NUMAN; BHOSLE, 2006; TONOZUKA et al., 2017).

As famílias GH43 e GH3 também contemplam algumas β -glicosidases (EC 3.2.1.21), β -D-fucosidases (EC 3.2.1.38) e β -galactosidases (EC 3.2.1.23) capazes de clivar ligações envolvendo α -L-arabinofuranosídeos (https://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.*). Algumas α -L-arabinofuranosidases GH43 também tem sido descritas com atividade β -xilosidase (LI et al., 2020; NUMAN; BHOSLE, 2006).

Quanto a especificidade da enzima para hidrolisar ligações de resíduos arabinofuranosil associados a unidades xilopiranosil mono e di-substituída, pode-se observar uma diferenciação entre as α -L-arabinofuranosidases capazes de agir no

substrato natural arabinoxilana e glucuronoarabinoxilana. Destas, podem se destacar enzimas α -L-arabinofuranosidase-m2,3 que clivam ligações de arabinofuronosil em unidades xilopiranosil mono-substituídos em O-2 e O-3; α -L-arabinofuranosidases-d3 que hidrolisam arabinofuranosil unido a O-3 da xilopiranoose di-substituída, e α -L-arabinofuranosidases-md que são capazes de hidrolisar resíduos de arabinose mono e di-substituídos na xilopiranoose (NUMAN; BHOSLE, 2006; PORIA et al., 2020; VUONG; MASTER 2022). Conforme mostrado na figura 4, representantes destas enzimas estão presentes nas famílias GH 43, 51, 54 e 62 podendo hidrolisar grupos mono-substituídos a O-2 e O-3, outras enzimas presentes na família GH43 são capazes de hidrolisar mono e di-substituições, e há também alguns membros das famílias GH 43, 51 e 54 que podem hidrolisar di-substituições a O-3 (VUONG; MASTER 2022).

Figura 4. Ação de enzimas desramificantes de arabinoxilana e arabinoglucuronoxilana/glucuronoarabinoxilana. Em detalhe (setas verdes), as α -L-arabinofuranosidases AXHm, AXHd3 e AXHmd.



Fonte: Modificado de VUONG; MASTER (2022)

2.2 Microrganismos produtores de α -L-arabinofuranosidases

Para crescer em material lignocelulósico, microrganismos secretam enzimas para hidrólise de celulose, hemicelulose e pectina, a fim de assimilar os açúcares monossacarídeos resultantes. Fungos e bactérias são os principais grupos de microrganismos que são reportados por produzirem e secretarem diversas destas enzimas, entre elas a α -L-arabinofuranosidase. Entretanto, as enzimas conhecidas por serem desramificantes, como β -galactosidase, acetil-xilano esterase, feruloil esterase e α -L-arabinofuranosidase são produzidas em pequena quantidade quando comparada com enzimas como endo- β -1,4-xilanase e endo- β -1,4-glucanase (YANG et al., 2016).

As bactérias são um importante grupo de microrganismos muito explorados para a produção de α -L-arabinofuranosidases, com destaques para os gêneros *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Thermotoga* (PORIA et al., 2020).

Enzimas com diferentes especificidades ao substrato têm sido prospectadas de bactérias, como reportado na investigação de Cartmell et al. (2011) que avaliaram a degradação de uma arabinana por diversas enzimas GH43 produzidas pelas bactérias *Cellvibrio japonicus* e *Bacteroides thetaiotaomicron* e expressas em *Escherichia coli*. Da bactéria *Bacteroides thetaiotaomicron* foram identificados genes para expressão de três tipos de α -L-arabinofuranosidase (Bt0360, Bt0367 e Bt0369), duas destas enzimas (Bt0360 e Bt0367) com atividade endo-arabinases - Bt0360 exibiu preferência por arabinana ramificada e Bt0367 por arabinana linear. Na bactéria *Cellvibrio japonicus* foram identificados genes para expressão de duas α -1,5-exo-arabinanases com atividade em arabinana linear e arabinooligosacarídeos.

Santos et al. (2018) mostraram o modelo de catálise e a capacidade de uma arabinofuranosidase GH51 produzida por *Xanthomonas axonopodis* para hidrolisar arabinoxilanas com mono e di-substituições. Geng (2019) caracterizou uma α -L-arabinofuranosidase GH51 de *Hungateiclostridium clariflavum* expressa em *E. coli*. A enzima exibiu alta termoestabilidade (90% de atividade a 60 °C por 2 dias) e especificidade para remover resíduos arabinofuranosil de unidades xilopiranosil mono e di-substituídas em arabinoxilana. Yang et al. (2015) caracterizaram uma α -L-arabinofuranosidase GH51 produzida por *Alicyclobacillus* sp. A enzima exibiu bifuncionalidade, com atividade exo- α -L-arabinofuranosidase/endo-xilanase.

Além de bactérias, os fungos também têm sido muito investigados como produtores de α -L-arabinofuranosidases, especialmente em cultivos contendo resíduos

agroindustriais. Gêneros como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* se destacam na literatura pela produção de α -L-arabinofuranosidase e outras enzimas envolvidas na degradação de material lignocelulósico. Ao degradar a hemicelulose os fungos podem secretar principalmente α -L-arabinofuranosidase do grupo GH43, GH51, GH54 e GH62 (PORIA et al., 2020).

No cultivo em estado sólido destaca-se o uso de material orgânico sólido como suporte e fonte de nutrientes para o crescimento microbiano, contendo umidade suficiente para permitir o cultivo de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (De CASTRO et al., 2018). Neste contexto, os resíduos agroindustriais têm sido utilizados como substrato para FES. A baixa valorização comercial, a composição rica em proteínas e carboidratos, e alta disponibilidade de resíduos como bagaço-de-cana de açúcar, palha de milho, sabugo de milho, farelo de trigo e outros, fazem com que estes substratos sejam muito explorados para prospecção de enzimas lignocelulolíticas.

Pereira et al. (2018) investigaram a capacidade de fibra de soja para estimular a produção de α -L-arabinofuranosidase por FES. Olajide et al. (2020) também reportaram a produção de α -L-arabinofuranosidase por *Streptomyces lividus* via FES usando resíduo da extração de óleo de palma. Em outro estudo, Singh et al. (2017) avaliaram a produção de α -L-arabinofuranosidase GH54 por *Penicillium janthinellum* em FES utilizando palha de arroz e farelo de trigo como substrato.

No Brasil, com a vocação por culturas agrícolas, um grande montante de resíduos é gerado na agricultura, o que faz da FES uma boa alternativa para a economia circular, utilizando destes resíduos agrícolas como substratos para produção de enzimas. Além do baixo custo do meio de cultivo (resíduos agrícolas), em comparação a fermentação submersa, outros importantes fatores fazem a FES ser considerada vantajosa, tais como maior produtividade e estabilidade dos produtos gerados, baixo risco de contaminação e

menor volume de ocupação do fermentador (De CASTRO et al., 2018; LONDOÑO-HERNANDEZ et al., 2020).

2.3 Aplicações de α -L-arabinofuranosidase

Como mencionado anteriormente, as α -L-arabinofuranosidases podem atuar como enzimas auxiliares na hidrólise de hemicelulose ao clivar ligações envolvendo resíduos de arabinose ligados à cadeia principal deste heteropolissacarídeo. O potencial de aplicação pode abranger diversas áreas como indústria de alimentação animal, cuja aplicação da enzima em sinergismo com outras glicosidases, como xilanases e celulases, favorece a hidrólise da fibra vegetal e o aumento da digestibilidade da ração, e biocombustíveis, onde a enzima contribui para a hidrólise de hemicelulose e liberação de açúcares fermentescíveis que serão utilizados para obtenção de etanol, por exemplo (PORIA et al., 2020).

Em panificação, as α -L-arabinofuranosidases têm sido sugeridas para melhorar a qualidade da textura em pães. Ao hidrolisar resíduos arabinofuranosil de arabinoxilana presentes na farinha de trigo, as α -L-arabinofuranosidases podem facilitar o desprendimento de moléculas de água ligadas a estes resíduos e contribuir para retardar o processo de endurecimento de pão durante armazenagem (PORIA et al., 2020).

Na indústria de bebidas, as α -L-arabinofuranosidases podem ser aplicadas para clarificação de sucos de frutas, diminuição da viscosidade em cervejas e hidrólise de monoterpenos glicosilados (aglicanas complexadas à L-arabinose) favorecendo a melhoria do aroma de cervejas e vinhos (SINGH CHADHA et al., 2017; RAVN et al., 2018).

O uso destas enzimas como possibilidade para o melhoramento de aroma de bebidas alcóolicas tem ganhado destaque. A hidrólise enzimática tem se destacado como uma alternativa para a clivagem de terpenos glicosilados a fim de liberá-los e aproveitar o seu potencial aromatizante, sem interferir nas propriedades da molécula ou da bebida. Os terpenos podem apresentar-se glicosilados com moléculas como glicose, apiose, arabinose, xilose, entre outros. A α -L-arabinofuranosidase, sendo capaz de hidrolisar ligações α -1,2, α -1,3 e α -1,5 em arabinana, grupos pendentos e ramificações contendo arabinose, é uma excelente enzima para aplicar no processo fermentativo para que haja a liberação de terpenos complexados em arabinose (CONTESINI et al., 2017; MRUDULAKUMARI VASUDEVAN, LEE, 2020; THAKUR et al., 2019).

3. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Produzir, purificar e caracterizar uma de α -L-arabinofuranosidase fúngica em fermentação em estado sólido.

Objetivos específicos

- Avaliar a produção de α -L-arabinofuranosidase por três espécies de fungos filamentosos em palha e sabugo de milho.
- Avaliar a condição de maior produção de α -L-arabinofuranosidases e purificá-la.
- Caracterizar de maneira bioquímica funcional: pH e temperatura ótima, efeito de pH e temperatura na estabilidade, efeito de íons, arabinose e etanol na atividade da enzima.
- Avaliar a capacidade de hidrólise de diferentes substratos, *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosideo (*p*NPA), *p*-Nitrofenil- β -D-xilopiranosideo, *p*-Nitrofenil- β -D-glucopiranosideo, *p*-Nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminideo e 1,5 α -L-arabinana linear.
- Avaliar a cinética enzimática sobre *p*NPA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Parâmetros de cultivo dos fungos

Os fungos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram *Thermothelomyces heterothallica*, *Rasamsonia emersoni* e *Coriolopsis byrsina* SXS16, os quais pertencem a coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UNESP - Campus - São José do Rio Preto/SP. O cultivo dos fungos em placa de Petri seguiu os parâmetros descritos na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros para o cultivo dos fungos em placa de Petri

Fungos	Meio de Cultivo	Temperatura	Tempo de Cultivo
<i>T. heterothallica</i>	Ágar Sabouraud	45° C	48 horas
<i>R. emersoni</i>	Ágar Sabouraud	50°C	48 horas
<i>C. byrsina</i> SXS16	PDA	28°C	144 horas

Fonte: Autoria própria

4.2 Produção de enzimas

A produção de enzimas foi avaliada por cultivo em estado sólido, conforme Pereira Scarpa et al. (2019), utilizando sabugo e palha de milho como substratos.

Foram acondicionados 5 gramas de substrato em sacos de polipropileno (PP) com dimensão de 20 cm de altura e 15 cm de largura (termo resistente), seguido por adição de 10 ml de solução salina contendo 0,1% sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio e 0,1% de nitrato de amônio (OLIVEIRA SIMÕES et al., 2019), e posteriormente autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Para o cultivo dos fungos *T. heterothallica* e *R. emersoni* em estado sólido, utilizamos inóculos com 3 discos miceliais de 0,5 cm de diâmetro coletados de um cultivo prévio em placa de Petri nas condições indicadas na tabela 2, enquanto para o fungo *C.*

byrsina SXS16 o inóculo foi ajustado conforme reportado por Duffeck et al., (2020). Para este fungo, foi realizado um cultivo inicial em 30 mL de meio PDA em frascos Erlenmeyer (125 mL) por 144 horas. Em seguida, 25 mL de água deionizada estéril foram adicionados para obter uma suspensão micelial, da qual 1 mL foi retirado e adicionado em cada frasco para cultivo em estado sólido.

O cultivo dos fungos foi acompanhado por 168 horas e a cada 24 horas, um saco plástico de cada cultivo foi retirado para quantificação de enzimas hemicelulolíticas secretadas. Para obtenção do extrato enzimático bruto, a cada saco plástico de CES retirado ao longo da fermentação, 50 mL de água deionizada (5°C) foram adicionados. Os sacos plásticos foram mantidos sob agitação em *shaker* 200 rpm por 1 hora para homogeneização, seguido de filtração em tecido sintético *musseline*. O filtrado foi centrifugado a 8000 x g por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática.

4.3 Atividade enzimática

Inicialmente diversas enzimas do complexo hemicelulolítico foram quantificadas na seguinte composição de mistura de reação: 20 µL de extrato enzimático bruto combinados a 80 µL dos seguintes substratos isoladamente: *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (*p*NPA), *p*-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, *p*-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo, *p*-Nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminídeo, *p*-Nitrofenil- α -D-manopiranosídeo, *p*-Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, *p*-Nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, *p*-Nitrofenil- α -D-Maltosídeo e *p*-Nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, (todos a 4 mM), diluídos em tampão acetato de sódio pH 5,0. As misturas foram incubadas a 45 °C por 10 minutos. Após isso, 100 µL carbonato de sódio (Na₂CO₃) 2 M

foi adicionado e a absorbância foi mensurada por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Uma curva de calibração com *p*-nitrofenol foi utilizada para determinar a unidade de enzima.

4.4 Purificação da enzima

Inicialmente, após avaliar os diferentes fungos e substratos utilizados para o cultivo em estado sólido, o extrato enzimático bruto contendo a enzima α -L-arabinofuranosidase foi concentrado. Para isso, foi avaliado diferentes proporções de enzima e etanol, conforme mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Proporção utilizada para a concentração do extrato enzimático bruto

Proporção (Enzima/Etanol) – (V/V)
1:0,25
1:0,5
1:1
1:2
1:3
1:4
1:5
1:6
1:7

Fonte: Autoria própria

A melhor relação enzima/etanol foi utilizada para concentrar todo o extrato fermentativo. Esta mistura foi mantida por 24 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de centrifugação a $4.000 \times g$ por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, da qual o precipitado foi então ressuspensão em água MilliQ.

Após a concentração do extrato enzimático bruto, a amostra foi dialisada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 e submetidos a cromatografias usando a resina

catiônica Source 15S empacotada em coluna Tricorn 4.6/100 e a coluna aniônica HiTrap Q XL 1 mL acopladas ao cromatógrafo Akta Purifier FPLC (Ge Healthcare) com monitoramento da absorvidade a 280 nm conforme a eluição das proteínas.

Inicialmente, a coluna Source 15S foi equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5 (tampão A) em volume correspondente a 10 vezes o volume de coluna. Então, 1 mL de amostra dialisada foi aplicada seguido de uma etapa de remoção da amostra não ligada a coluna usando tampão A (7 vezes o volume de coluna). A cromatografia foi conduzida usando gradiente linear que prosseguiu por 20 volumes de coluna usando tampão B composto por acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, suplementado com 500 mM NaCl, com fluxo de fase móvel a 1 mL.min⁻¹. Utilizamos a absorvidade a 280 nm para monitoramento da eluição das proteínas e um volume de frações de 2 mL.min⁻¹. As amostras eluídas foram submetidas a reação enzimática usando *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo conforme mencionado no item 4.3. As frações que exibiram atividade enzimática foram analisadas por gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, de acordo com o item 4.5.

Conforme a visualização em gel SDS-PAGE, as frações com perfis proteico similares e que não se ligaram a coluna Source 15S foram reunidas e aplicadas a coluna HiTrap Q XL 1 mL. Esta cromatografia foi conduzida utilizando os mesmos parâmetros e tampões A e B da cromatografia anterior. As frações que exibiram atividade de hidrólise do substrato *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo foram analisadas por gel SDS-PAGE 12%, selecionadas conforme a pureza e utilizadas para ensaios de caracterização bioquímica funcional.

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As análises de eletroforese das frações oriundas das cromatografias foram realizadas conforme proposto por Laemmli (1970) utilizando SDS-PAGE com gel separador de 12% e gel concentrador de 5% de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata (SEE, JACKOWSKI, 1989).

A preparação das amostras foi realizada com uma diluição em tampão de amostra (Biorad) na proporção 1:1. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos em banho de ebulição e aplicadas (20 μ L) no gel de poliacrilamida. A corrida para separação das proteínas foi realizada a 150 V e um marcador padrão de massa molecular de proteínas foi utilizado para estimar a massa molecular da enzima (Broad Range, Catalog Number 161-0317, BioRad).

4.6 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) utilizando curva padrão com soro albumina bovina (BSA).

4.7 Caracterização físico-química da α -L-arabinofuranosidase

4.7.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática

Para avaliar o efeito de pH na atividade enzimática, foi usado soluções tamponantes 0,1 mol L⁻¹ na faixa de pH de 1,5 a 8,0, sendo eles: glicina (pH 1,5, 2,0 e 2,5), citrato de sódio (pH 3,0 e 3,5), acetato (pH 4,0 a 5,5), MES (pH 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0 e 7,5) e Bicine (pH 8,0). A reação enzimática com o substrato *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (*p*NPA) diluído nos diferentes tampões foi conduzida por 10 minutos

a 40 °C. Para avaliar o efeito de temperatura na atividade da enzima, foi utilizado o pH de maior atividade enzimática identificado no experimento anterior. Assim, avaliamos o efeito de temperatura na faixa de 10 a 70 °C. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo que, para cada experimento, consideramos a condição na qual foi obtida maior atividade enzimática como 100%.

A estabilidade da α -L-arabinofuranosidase sob efeito de pH e temperatura também foi avaliada. Para isso, a enzima, na ausência de substrato, foi pré-incubada nos diferentes valores de pH 1,5-8,0, por 24 horas a 4 °C, enquanto para estabilidade térmica, a enzima foi incubada por 1 h a temperaturas de 10-70 °C. Em ambos os casos, após a etapa de pré-incubação, a reação enzimática foi conduzida nas melhores condições de pH e temperatura pré-determinados. Os resultados foram expressos em atividade relativa, onde consideramos como 100%, (i) o pH de incubação onde a enzima exibiu maior atividade enzimática, para o ensaio de estabilidade de pH; e (ii) para o ensaio de estabilidade térmica, a reação enzimática da amostra não incubada em nenhuma das temperaturas.

4.7.2 Efeito de íons metálicos e etanol

Foi avaliado o efeito de íons na atividade da enzima ao incubá-la individualmente com AlCl₃, CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, LiCl₂, BaCl₂, FeCl₃, HgCl₂, MnCl₂, MgCl₂, NiCl₂ e ZnCl₂, concentração final de 5 mmol L⁻¹ e 10 mmol L⁻¹. A enzima foi pré-incubada com os diferentes sais por 5 min a temperatura de reação. Em seguida, a reação foi conduzida nas condições ótimas de atividade enzimática pré-determinadas e foi utilizado como substrato o *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (*p*NPA).

Também avaliamos a estabilidade da enzima em presença de etanol a 5, 10 e 15%. A enzima foi incubada com etanol por 12 e 24 horas a 28 °C, em seguida a reação

enzimática foi conduzida nas condições de pH e temperatura ideais previamente determinados.

Em ambos os casos, os resultados foram expressos em atividade relativa considerando o experimento controle, sem adição de nenhum composto, como 100%.

4.7.3 Teste de inibição por D e L-arabinose

A enzima foi previamente incubada por 5 min a temperatura de reação, em presença de D-arabinose e L-arabinose em diferentes concentrações de 0 a 0,9 mol L⁻¹. Em seguida, a reação foi conduzida nas condições ideais de pH e temperatura pré-determinados. O resultado foi expresso em atividade relativa sendo 100% o controle positivo representa a atividade máxima da catálise, quando exposta a concentrações variadas de D e L-arabinose.

4.8 Teste de hidrólise de diferentes substratos

Avaliamos a capacidade da enzima em hidrolisar outros substratos como *p*-Nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo, *p*-Nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo e *p*-Nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminídeo, todos a 4 mmol L⁻¹, com método similar ao descrito para o substrato *p*NPA. Todas as reações com os diferentes substratos foram realizadas tomando como referência as condições ótimas pré-determinadas de pH e temperatura para atividade de hidrólise de *p*NPA.

A capacidade da enzima em hidrolisar 1,5 α-L-arabinana linear de beterraba (Megazyme) foi avaliada por análise qualitativa do produto da reação em cromatografia de camada delgada. Para isso, primeiramente a reação enzimática foi realizada com

adição de 100 uL de enzima (atividade específica com *p*NPA: 8,3 U mg⁻¹) à 100 uL do substrato 1,5 α -L-arabinana 1% diluído em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 3,5, e incubado por 24 horas a 50 °C. Em seguida, em posições diferentes na placa de sílica, foram aplicados 5 uL das seguintes amostras: volume de reação (após incubação por 24 horas a 50 °C), e as amostras controles L-arabinose 1%, solução enzima:tampão de reação (1:1) e substrato 1,5 α -L-arabinana:tampão de reação (1:1). A placa de sílica contendo as amostras foi então alocada em um béquer para início da cromatografia com fase móvel composta por n-butanol, metanol, solução de amônia (25%) e água na proporção 5:4:2:1 (v/v/v/v), respectivamente. Após 40 minutos, a placa foi seca em estufa a 80 °C e a solução de revelação contendo metanol, ácido sulfúrico e α -naftol na proporção de 95:5:5 (v/v/m), respectivamente, foi pulverizada sobre a placa. A revelação das bandas correspondentes aos açúcares aconteceu quando a placa de TLC foi deixada sob uma superfície aquecida a 100 °C (KUMAR et al., 2017).

4.9 Cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos da enzima α -L-arabinofuranosidase frente ao substrato *p*NPA foram determinados utilizando as concentrações finais de 0,5 a 9 mmol L⁻¹ de substrato e 3,82 μ g/mL de enzima. As reações enzimáticas foram conduzidas nas melhores condições pré-determinadas de pH e temperatura para atividade da enzima. Os valores da Constante de Michaelis K_M e da velocidade máxima de reação V_{max} foram obtidos a partir de ajuste não linear dos dados seguindo a equação de Michaelis-Menten ($V_o = (V_{max} \times [S]) / (K_M + [S])$) no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

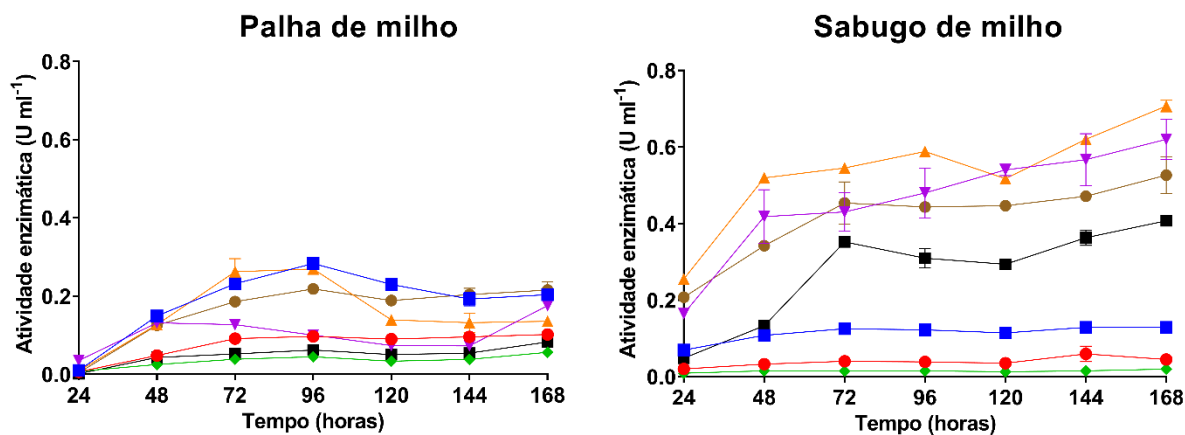
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de α -L-arabinofuranosidase por cultivo em estado sólido

A produção de enzimas foi distinta quanto a quantidade e diversidade, substratos utilizados no cultivo em estado sólido e microrganismo. Os três fungos inicialmente utilizados neste estudo foram capazes de crescer e secretar diferentes enzimas do complexo hemicelulolítico durante cultivo em estado sólido com os resíduos agroindustriais, palha e sabugo de milho.

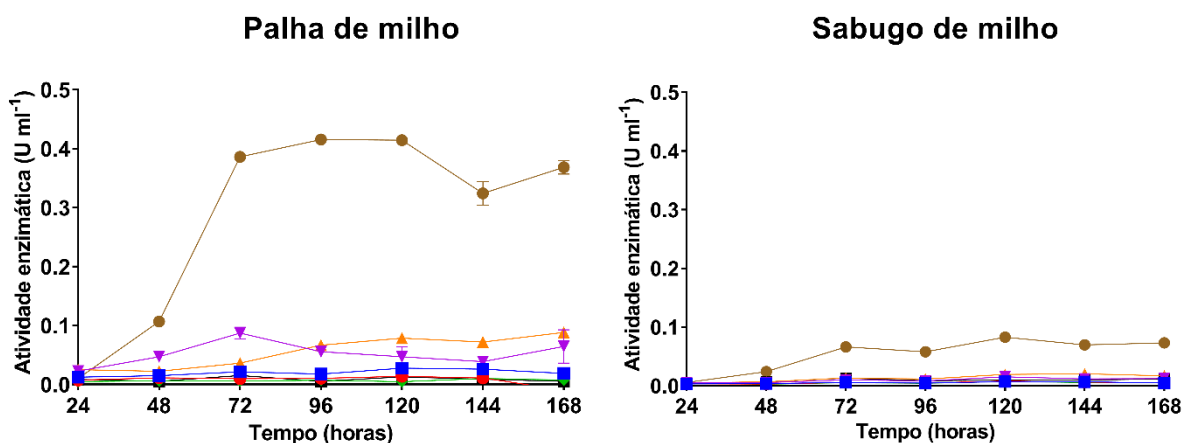
O fungo *R. emersoni*, quando cultivado em palha de milho (**Figura 5**), foi capaz de produzir enzimas com diferentes atividades como α -galactase, β -manosidase, endo- β -1,4-D-glicosidase, N-acetil- β -D-glicosaminidase, endo- β -1,4-xilosidase e β -1,2-galatosidase. Em 96 horas de cultivo, observamos atividade enzimática máxima para α -galactase, β -1,4-glicosidase e α -L-arabinofuranosidase, sendo $0,283 \text{ U ml}^{-1}$, $0,269 \text{ U ml}^{-1}$ e $0,218 \text{ U ml}^{-1}$, respectivamente. No cultivo em sabugo de milho, observamos maiores valores de unidade de enzimas quando comparado ao cultivo em palha de milho, com atividade enzimática máxima a 168 horas. A maior atividade enzimática foi de β -1,4-glicosidase com $0,707 \text{ U ml}^{-1}$, seguido por N-acetil- β -D-glicosaminidase e α -L-arabinofuranosidase, com $0,620 \text{ U ml}^{-1}$ e $0,526 \text{ U ml}^{-1}$, respectivamente.

Figura 5. Enzimas secretadas por *R. emersoni* em FES contendo palha ou sabugo de milho. (▼) N-Acetil- β -D-glicosaminidase, (■) β -1,4-D-xilosidase, (■) α -galactase, (◆) β -manosidase, (●) β -1,2-D-galatosidase, (▲) Endo- β -1,4-D-glicosidase, (●) α -L-arabinofuranosidase.



Fonte: Autoria própria

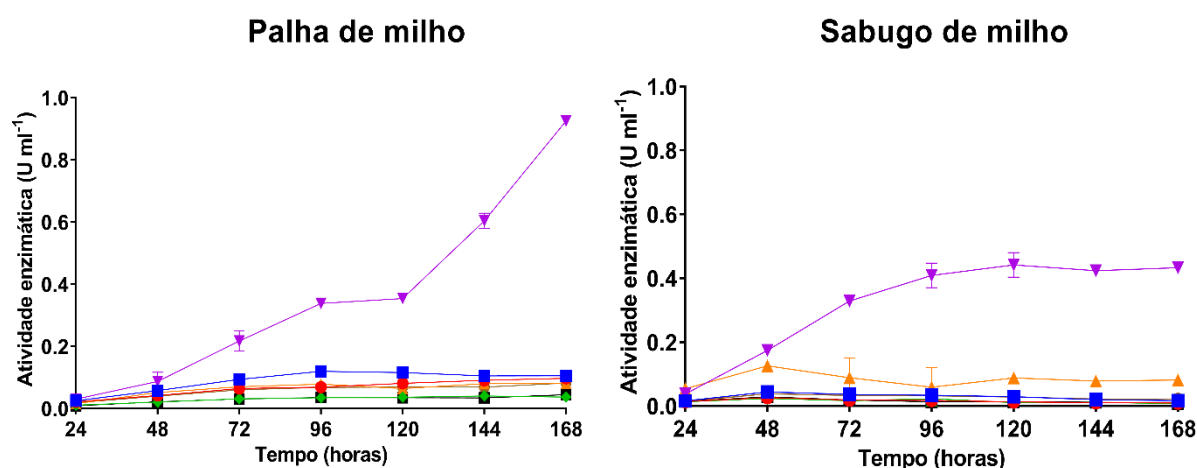
Figura 6. Enzimas secretadas por *C. byrsina* em FES contendo palha ou sabugo de milho. (▼) N-Acetil- β -D-glicosaminidase, (■) β -1,4-D-xilosidase, (■) α -galactase, (◆) β -manosidase, (●) β -1,2-D-galatosidase, (▲) Endo- β -1,4-D-glicosidase, (●) α -L-arabinofuranosidase.



Fonte: Autoria própria

O fungo *C. byrsina* exibiu perfil de produção de enzimas diferente dos demais fungos estudados aqui (**Figura 6**). Quando cultivado em palha e sabugo de milho, nitidamente a atividade de α -L-arabinofuranosidase foi superior as outras atividades enzimáticas, 0,414 U ml⁻¹ em palha de milho a 96 horas de cultivo e 0,082 U ml⁻¹ em sabugo de milho a 120 horas de cultivo. Os picos de atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase e β -1,4-glicosidase foram detectados com 0,088 U ml⁻¹ para ambas, em 72 e 168 horas de cultivo em palha de milho, respectivamente.

Figura 7. Enzimas secretadas por *T. heterothallica* em FES contendo palha ou sabugo de milho. (▼) N-Acetil- β -D-glicosaminidase, (■) β -1,4-D-xilosidase, (■) α -galactase, (◆) β -manosidase, (●) β -1,2-D-galatosidase, (▲) Endo- β -1,4-D-glicosidase, (●) α -L-arabinofuranosidase.



Fonte: Autoria própria

Após o cultivo do fungo *T. heterothallica* em palha e sabugo de milho, não foi detectado a secreção de α -L-arabinofuranosidase (**Figura 7**), entretanto o fungo foi capaz de produzir N-acetil- β -D-glicosaminidase em maior quantidade quando comparado com as outras enzimas abordadas no presente estudo.

Como alvo de nosso estudo, atividades de α -L-arabinofuranosidases foram detectadas especialmente nos cultivos com *C. byrsina* e *R. emersoni*. Apesar da maior produção destas enzimas por *R. emersoni*, para continuidade dos estudos foi selecionado o extrato fermentativo derivado do cultivo do fungo *C. byrsina* em palha de milho, devido a menor abundância de proteínas adicionais, além da enzima alvo, de forma a facilitar a purificação de uma α -L-arabinofuranosidase.

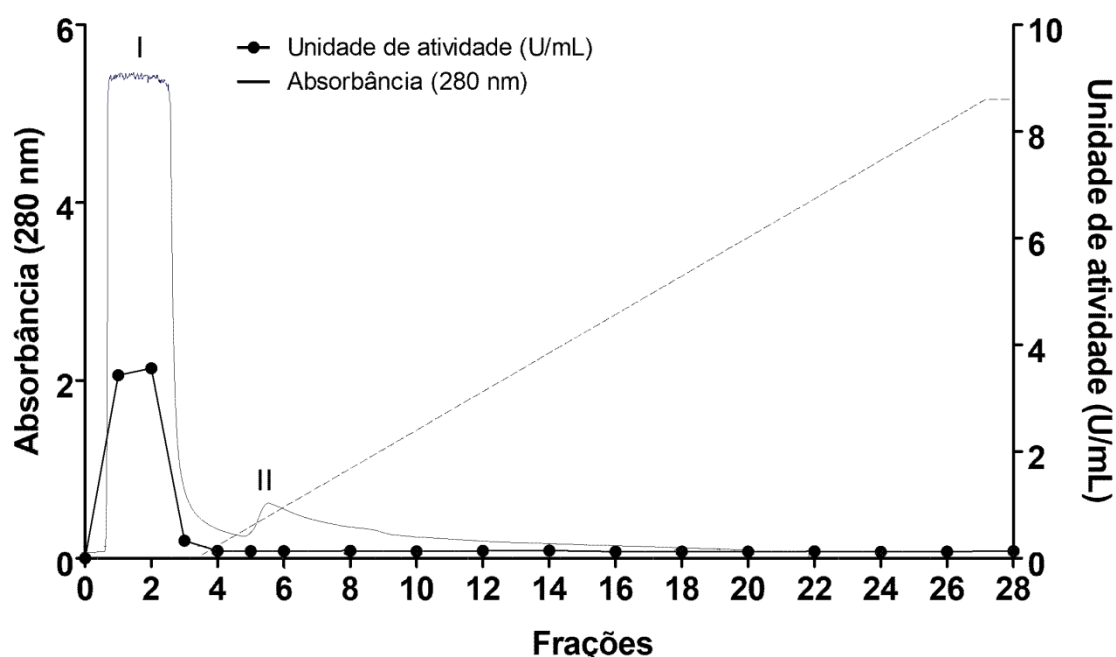
5.2 Purificação da enzima α -L-arabinofuranosidase secretada por *C. byrsina*

5.2.1 Concentração da enzima

Conforme testes preliminares para avaliar a proporção de etanol para precipitar a enzima presente no extrato fermentativo, foi utilizado um volume de etanol correspondente a 6 vezes o volume de extrato fermentativo, 1:6 (extrato:etanol, V/V)

A primeira cromatografia foi realizada usando a resina catiônica Source 15S empacotada em coluna Tricorn 4.6/100 **Figura 8**, conforme descrito no item 4.4. Nesta cromatografia, observamos dois picos de absorvidade a 280 nm, pico I que representa as proteínas não ligadas à resina, onde detectamos atividade de α -L-arabinofuranosidase, e pico II com menor absorvidade a 280 nm e sem atividade enzimática. Nas demais frações obtidas na cromatografia não detectamos a presença de α -L-arabinofuranosidase.

Figura 8. Cromatografia catiônica em resina Source 15S, coluna Tricorn 4.6/100 acoplada ao cromatógrafo Akta Purifier FPLC (GE Healthcare). Fase móvel composta por acetato de sódio 50 mM, pH 4.5 (tampão A) e acetato de sódio 50 mM, pH 4.5, suplementado com 500 mM NaCl (tampão B), fluxo de fase móvel a 1 mL.min⁻¹ e volume de coleta de 2 mL. As linhas cinza, contínua e tracejada, representam a absorvância a 280 nm e gradiente NaCl, respectivamente, e a linha preta com símbolo de círculo representa a atividade enzimática detectada nas frações.

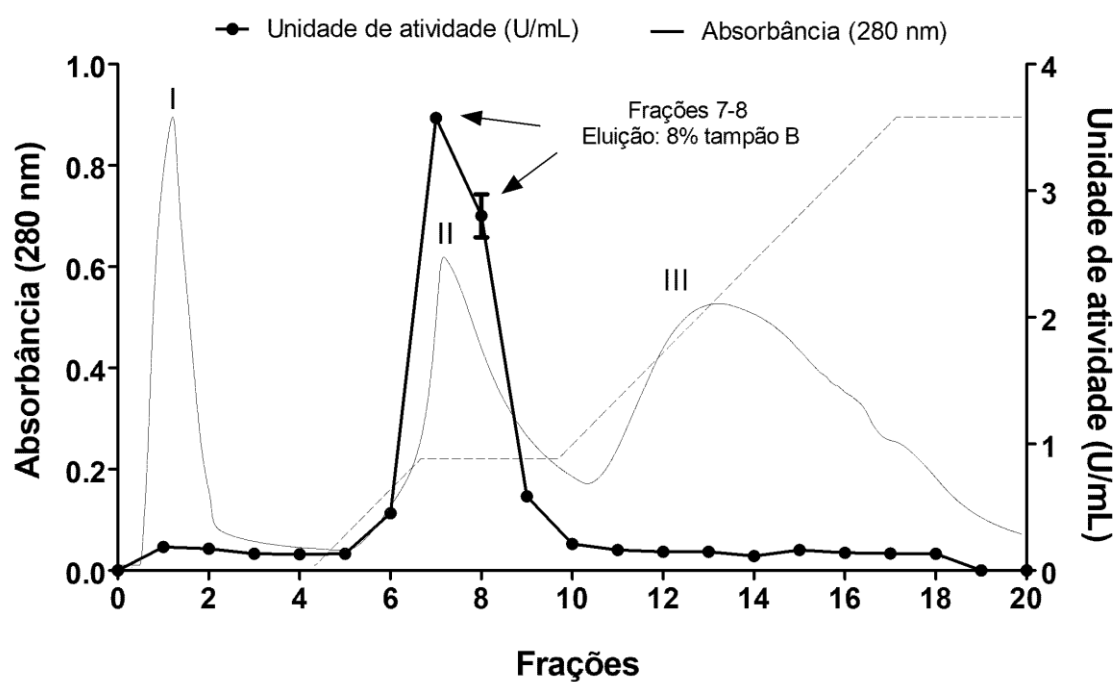


Fonte: Autoria própria

As frações do pico I foram agrupadas e reaplicadas na coluna aniônica HiTrap Q XL 1 mL, mantendo os mesmos parâmetros da cromatografia anterior. Conforme mostrado na figura 9, observamos três picos de absorvidade a 280 nm, tendo sido detectada atividade enzimática apenas no pico II. Nas frações 7 e 8 a enzima foi obtida pura, eluição a 8% de tampão B (acetato de sódio 50 mM, pH 4.5, suplementado com 500 mM NaCl). A enzima pura pode ser observada em gel SDS-PAGE 12% com massa molecular estimada em 55 kDa (**Figura 10**). Outras α -L-arabinofuranosidases com massas moleculares similares foram secretadas por bactérias como *Geobacillus vulcani* GS90: 60 kDa (ÍLGU et al., 2018), *Paenibacillus polymyxa*: 56,8 kDa (GAO et al., 2018), *Hungateiclostridium clariflavum* DSM 19732: 56 kDa (GENG et al., 2019), a bifuncional

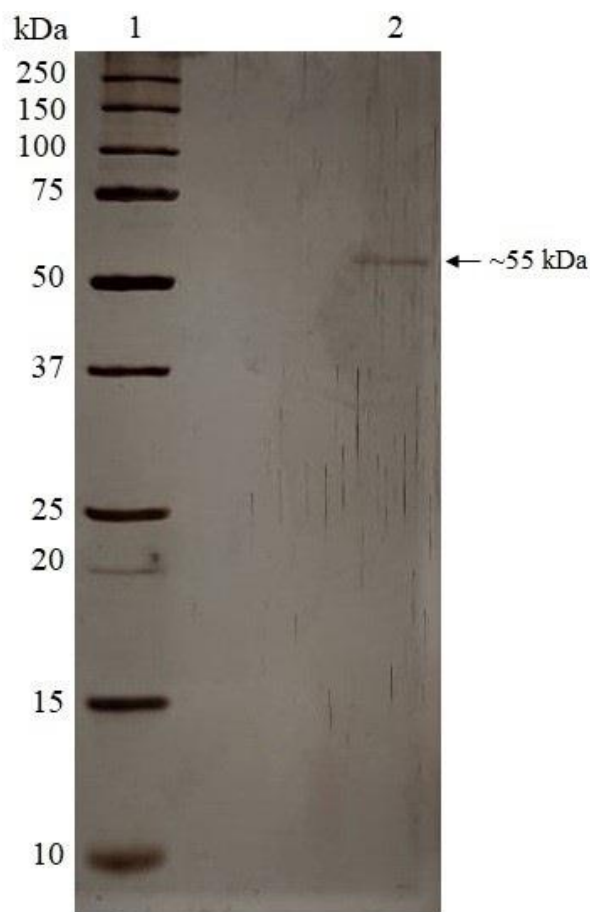
exo- α -L-arabinofuranosidase/endo-xilanase de *Alicyclobacillus* sp. A4: 57 kDa (YANG et al., 2015), e fungos, como *Penicillium purpurogenum*: 58 kDa (IOANNES et al., 2000), *Trichoderma harzianum*: 53,44 kDa (MOTTA et al., 2021), enzima PfAbf62c de *Penicillium funiculosum*: 55 kDa (De LA MARE et al., 2013).

Figura 9. Cromatografia aniônica HiTrap Q XL 1 mL acoplada ao cromatógrafo Akta Purifier FPLC (GE Healthcare). Fase móvel composta por acetato de sódio 50 mM, pH 4.5 (tampão A) e acetato de sódio 50 mM, pH 4.5, suplementado com 500 mM NaCl (tampão B), fluxo de fase móvel a 1 mL.min⁻¹ e volume de coleta de 2 mL. As linhas cinza, contínua e tracejada, representam a absorbância a 280 nm e gradiente NaCl, respectivamente, e a linha preta com símbolo de círculo representa a atividade enzimática detectada nas frações.



Fonte: Autoria própria

Figura 10. Gel SDS-PAGE 12% da enzima pura obtida após etapas cromatográficas sequenciais de resina catiônica Source 15S e aniônica HiTrap Q XL. **1-** Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ standards, Biorad) e **2-** Enzima pura.



Fonte: Autoria própria

A metodologia empregada para concentração do extrato enzimático com etanol e obtenção da enzima pura resultou em um rendimento de 87,05% na etapa de concentração e um rendimento final de 31,9% e purificação de 6,4 vezes após cromatografia em coluna Hitrap Q XL (**Tabela 4**).

Tabela 4. Sumário de purificação da α -L-arabinofuranosidase secretada por *C. byrsina*

Etapas purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato fermentativo (FES)	429,72	3409,76	0,13	100,00	1,00
Extrato concentrado	374,06	1776,61	0,21	87,05	1,61
Source 15S	94,25	448,50	0,21	21,93	1,61
Hitrap Q XL	137,07	164,42	0,83	31,90	6,40

Fonte: Autoria própria

O rendimento final obtido para purificação da α -L-arabinofuranosidase secretada por *C. byrsina* é superior ao reportado para purificação de outras α -L-arabinofuranosidase nativas de bactérias e fungos, como a α -L-arabinofuranosidase secretada pela bactéria *Paenibacillus polymyxa* que foi parcialmente purificada usando as resinas DEAE Sepharose Fast Flow e coluna contendo resina de hidroxapatita, da qual se obteve um rendimento final de 5,2% (GAO et al., 2018). A purificação da enzima secretada por *Aspergillus hortai* CRM1919 usando resinas CM Sephadex® C-50 e Sephadex G-100 alcançou um rendimento final de 10,1% (TERRONE et al., 2020). Com uso de resinas DEAE-Toyopearl, Mono Q e Resource PHE, Shinozaki et al. (2014) descreveram uma recuperação de 0,2% na purificação da enzima secretada por *Penicillium chrysogenum* 31B. Ioannes et al. (2000) reportaram uma recuperação de 6% de uma α -L-arabinofuranosidase de *P. purpurogenum* em metodologia de purificação usando BioGel P-100 (primeira etapa), CM Sephadex C-50, Phenyl agarose e BioGel P-100 (segunda etapa). Carvalho et al. (2018) também descreveram a recuperação de 24,2% após três etapas cromatográficas (CM-Cellulose, DMAE-Fractogel e Sephacryl S-200) para purificação da enzima bifuncional com atividade β -xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *Colletotrichum graminicola*.

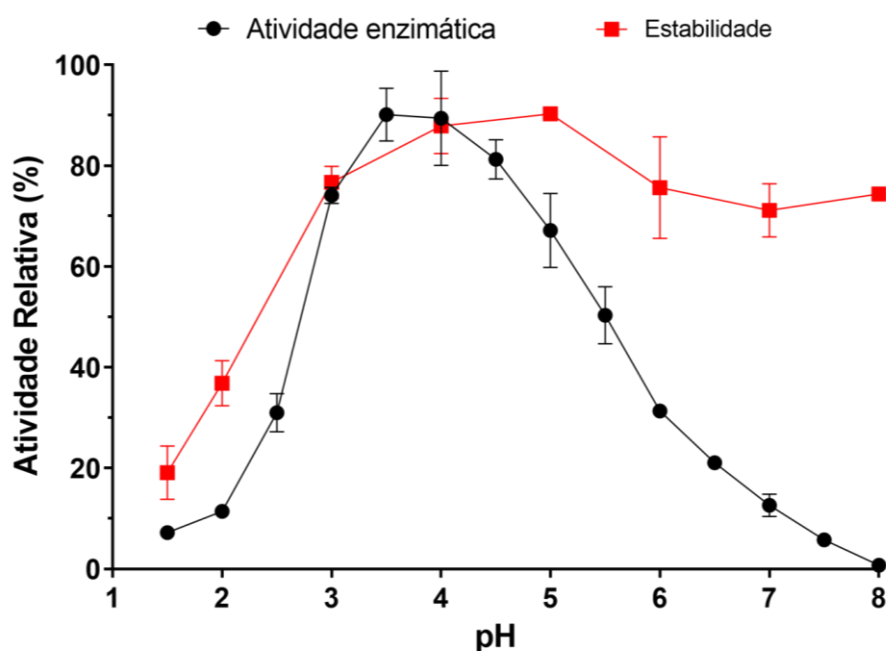
5.3 Caracterização bioquímica funcional da α -L-arabinofuranosidase

5.3.1 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da enzima

Investigar o efeito de pH e temperatura na atuação e estabilidade de uma enzima é imprescindível para sua aplicação em diferentes segmentos industriais. A enzima α -L-arabinofuranosidase produzida pelo fungo *C. byrsina* atingiu a máxima performance à pH 3,5-4,0. No presente trabalho, foi utilizado como controle o ponto onde houve a maior atividade da enzima.

A enzima apresentou estabilidade em ampla faixa pH 3,0 a 8,0, cuja atividade foi mantida acima de 75% em relação ao controle (**Figura 11**). Após incubação por 1 hora em pH 1,5 e 2,0 (na ausência de substrato), seu desempenho catalítico foi severamente comprometido, do qual detectamos apenas 19% e 36% de sua atividade inicial, respectivamente.

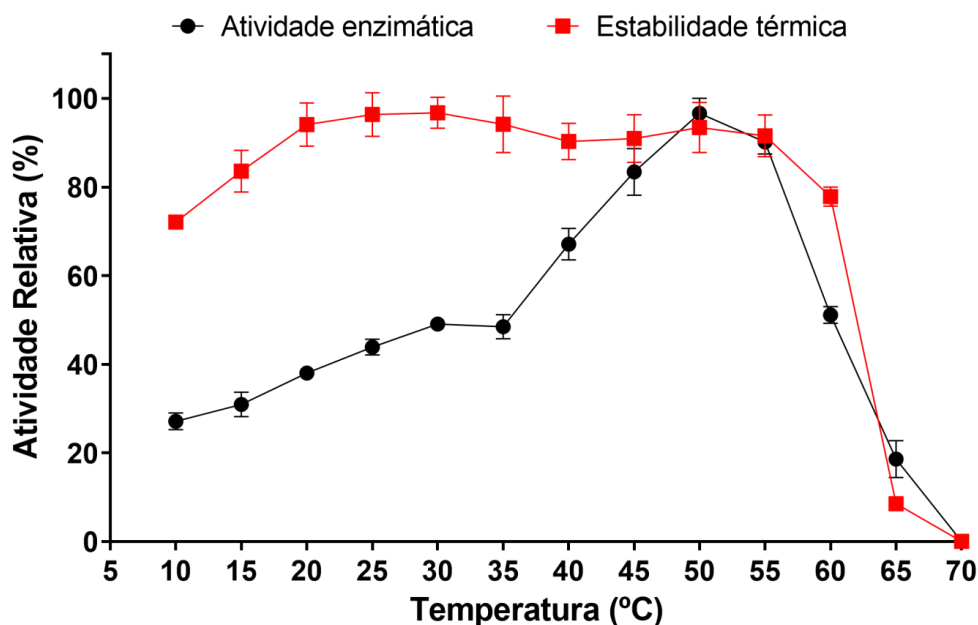
Figura 11. Efeito de pH na atividade e estabilidade da enzima secretada pelo fungo *C. byrsina*. A reação enzimática foi conduzida usando diferentes soluções tamponantes a 0,1 mol L⁻¹, faixa de pH 1,5-8,0, a 40 °C, com *p*-Nitrofenil- α -L-arabinopiranosídeo (4 mmol L⁻¹) como substrato.



Fonte: Autoria própria

Quanto à temperatura, a α -L-arabinofuranosidase apresentou atividade acima de 80% entre 45 °C e 55 °C, com máxima performance a 50 °C, e termoestabilidade na faixa de 10° a 60°C, onde verificamos ao menos 70% de atividade remanescente. A enzima ainda exibiu 8,5% de atividade residual após 1 hora de incubação a 65 °C, e nenhuma atividade a 70 °C (**Figura 12**).

Figura 12. Efeito de temperatura na atividade e estabilidade da enzima secretada pelo fungo *C. byrsina*. Para efeito de temperatura (i) na atividade: a reação foi conduzida em diferentes temperaturas entre 10-70 °C, (ii) termoestabilidade: a enzima, na ausência de substrato, foi incubada por 1 h entre 10-70 °C, seguido de reação enzimática a 50 °C. A reação enzimática foi conduzida usando tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 3,5 e *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (4 mmol L⁻¹) como substrato.



Fonte: Autoria própria

Usando *p*NPA como substrato, há poucos relatos de caracterização bioquímica funcional de α -L-arabinofuranosídeses de basidiomicetos, como Sinha e Sengupta (1995) que ao estudar a enzima de *Termitomyces clypeatus* descreveram ótima atividade a pH 5,5 e 50 °C, com estabilidade na faixa de pH 2-5 e a 50 °C por 30 minutos. Amore et al. (2012) reportaram que enzima de *Pleurotus ostreatus*, expressa em *P. pastoris*, exibiu máxima atividade a pH 5.0 e 40 °C; e Huy et al. (2013) descreveram máxima atividade sobre *p*NPA a pH 5,5 e 50 °C para uma enzima bifuncional xilosidase/arabinofuranosidase de *Phanerochaete chrysosporium* expressa em *P. pastoris*.

A versatilidade para atuação em diferentes pH e temperaturas é uma importante característica para aplicação de enzimas, podendo atender diferentes demandas em

processos industriais, como glicosidases ativas em condições ácidas, que quando também tolerantes a etanol e capazes de hidrolisar substratos naturais como arabinoxilana, e L-arabinose complexada a monoterpenos, são atrativas para testes de aplicação em bebidas como vinho e cervejas.

Muitas α -L-arabinofuranosidases de outros grupos de fungos têm sido descritas com diferentes pH e temperatura ótimos de atuação, algumas das quais se despontam com potencial para aplicação em bebidas. Ao reportar uma α -L-arabinofuranosidase de *Aspergillus niger* com ótima atividade para a hidrólise de pNPA em pH 5,5 e 50 °C, e a capacidade de hidrolisar arabinoxilana, Li e colaboradores (2020) sugerem o uso desta enzima para melhorar a filtração de cerveja. Ravanal e Eyzaguirre (2015) também relataram uma α -L-arabinofuranosidase com características similares a descritas por Li et al. (2020). A enzima recombinante (ABF4), cujo gene foi extraído de *Penicillium purpurogenum* ATCC cepa MYA-38 e expresso em *Pichia pastoris*, exibiu pH e temperatura ótimos de 4,6 e 50 °C, respectivamente, sobre o substrato pNPA, e também foi ativa sobre arabinoxilana de trigo e L-arabinana de beterraba.

Geng et al. (2019) descreveram uma α -L-arabinofuranosidase da família GH51 originalmente presente na bactéria *H. clariflavum* e que foi expressa em *Escherichia coli*. A enzima exibiu máxima atividade a pH 6,5 e 60 °C sobre pNPA, e foi capaz de agir sobre arabinoxilana. Em adição, Santos et al. (2018) também reportaram uma α -L-arabinofuranosidase recombinante, cujo gene extraído da bactéria *Xanthomonas axonopodis* foi expresso em *E. coli*. Ao determinar a atividade ótima sobre o substrato pNPA em pH 5,5 e 55-60 °C, e capacidade de hidrólise de arabinoxilana, os autores sugerem o potencial uso desta enzima como aditivo a um coquetel enzimático para degradar polímeros ricos em arabinoxilana, como bagaço de cana-de-açúcar e palha-de-milho.

5.3.2 Efeito de íons metálicos na atividade enzimática

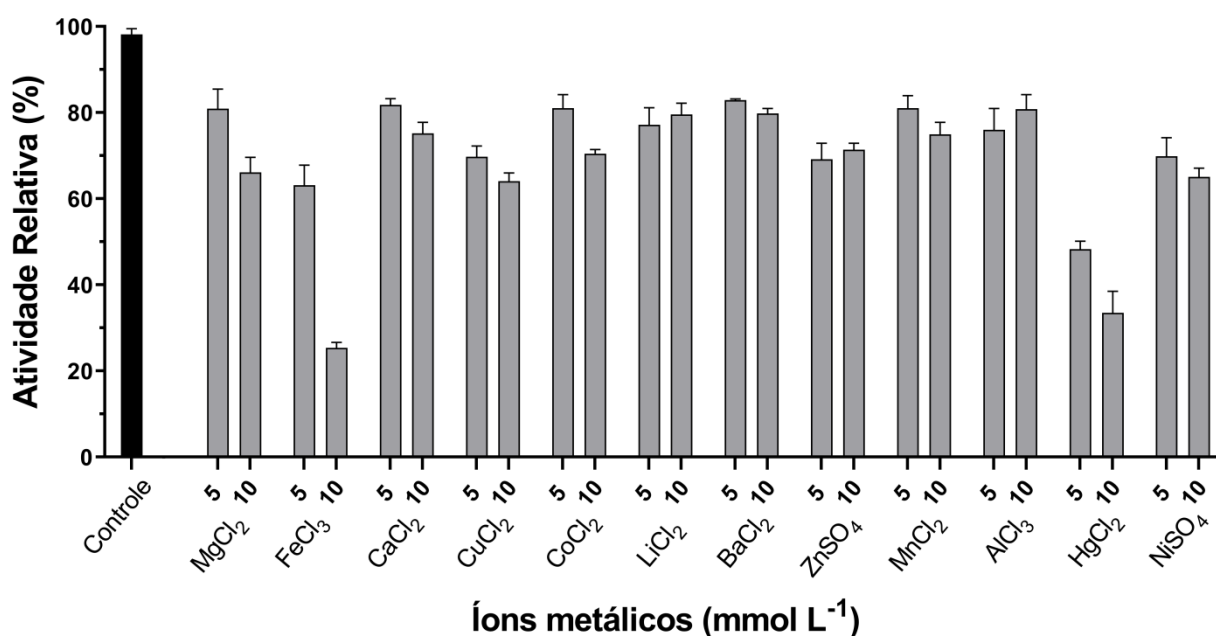
Dentre os íons avaliados na atividade da enzima, nenhum modulou positivamente a atividade da α -L-arabinofuranosidase, pelo contrário, todos provocaram redução na catálise (**Figura 13**). Maior prejuízo a reação enzimática foi notado na presença de Fe^{3+} , cuja atividade residual foi de 63% (5 mmol L⁻¹) e 25% (10 mmol L⁻¹) e Hg^{2+} com atividade residual de 48% (5 mmol L⁻¹) e 33% (10 mmol L⁻¹), seguido por Cu^{2+} e Ni^{2+} com atividades de 70% (5 mmol L⁻¹) e 64% (10 mmol L⁻¹) para ambos.

A atividade da α -L-arabinofuranosidase produzida por *A. niger* foi severamente reduzida na presença de 1 mmol L⁻¹ de Cu^{2+} e Zn^{2+} (LI et al., 2020) exibindo menos de 20% de sua atividade inicial, contudo Fe^{3+} promoveu um aumento em torno de 30% na atividade enzimática. A enzima bifuncional β -xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *C. graminicola* também teve sua atividade β -xilosidase intensamente comprometida na presença de Fe^{3+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} a 5 mmol L⁻¹, com atividade residual de 12,2%, 5,4% e 0%, respectivamente (CARVALHO et al., 2018). Em outros casos, como para a α -L-arabinofuranosidase produzida por *Alicyclobacillus* sp. não se notou alteração na atividade da enzima quando incubada com 5 mmol L⁻¹ de Fe^{3+} e Cu^{2+} (YANG et al., 2015). Para a enzima produzida por *G. vulcani* GS90, na presença de 1 mmol L⁻¹ de Cu^{2+} notou-se um aumento de 17% na atividade da enzima (İLGU et al., 2018).

Cátions podem interagir com aminoácidos em diferentes porções da proteína, de modo a provocar redução ou aumento da atividade enzimática. Nos casos mencionados acima, Fe^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} podem interagir por ligação covalente com grupos tiol, amina e carboxílico de aminoácidos. Em geral, Fe^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} podem também estar envolvidos na oxidação do grupo tiol de cisteínas, presentes no sítio ativo ou em outras porções da enzima, comprometendo assim a catálise (SHRIVER, ATKIN, 2017, VAZ et al, 2021).

Pelo exposto em nossos resultados, na possibilidade de aplicação da α -L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *C. byrsina*, nenhum dos íons avaliados seria necessário para a melhora de sua atividade, contudo, a depender da mistura reacional aonde a enzima será empregada, a presença, especialmente de Fe^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} pode prejudicar o resultado da reação enzimática.

Figura 13. Efeito de íons metálicos a 5 e 10 mol L⁻¹ na atividade da enzima secretada pelo fungo *C. byrsina*. A reação enzimática foi conduzida usando tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 3,5, a 50 °C, com *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (4 mmol L⁻¹) como substrato.



Fonte: Autoria própria

5.3.3 Efeito de etanol na estabilidade da enzima

A enzima, quando incubada por 12 e 24 horas em três diferentes concentrações de etanol, 5%, 10% e 15%, não exibiu diferença significativa entre os tempos de incubação, mas demonstrou redução da estabilidade conforme aumento da concentração de etanol (**Figura 14**). No experimento controle, observamos atividade de 99% e 87% após 12 e 24

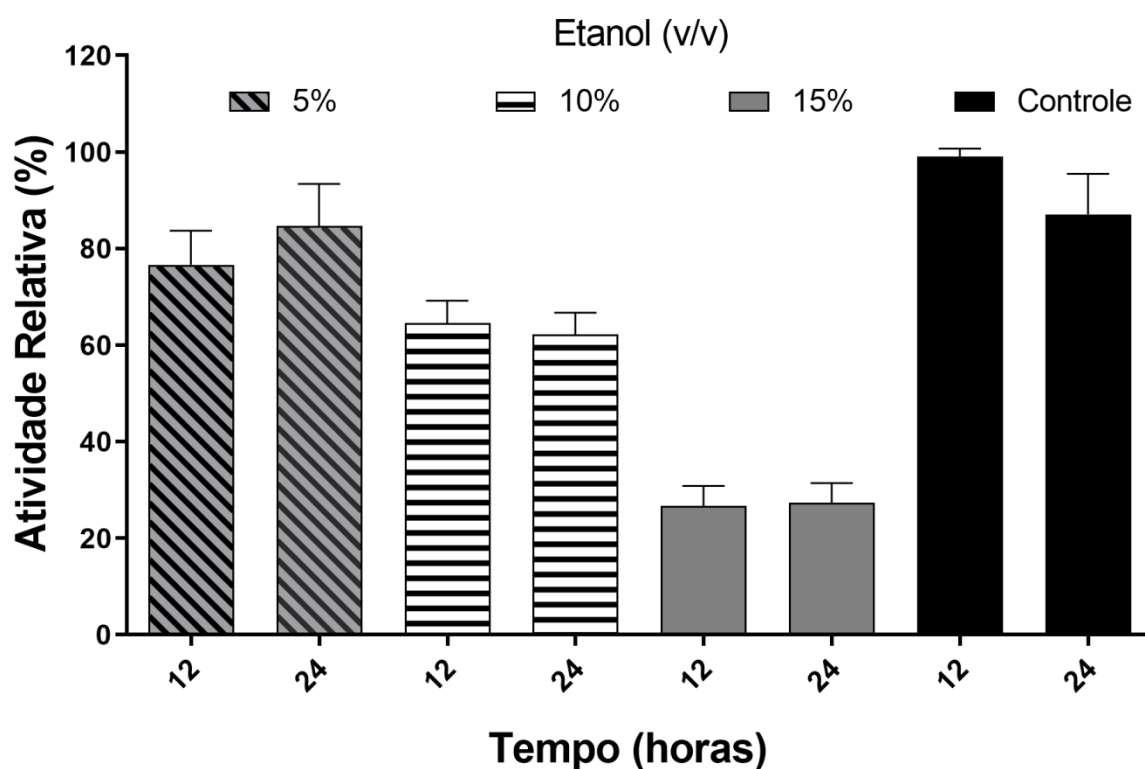
horas de incubação, enquanto que, na presença deste solvente orgânico, as atividades foram de 76-84% para 5% de etanol, 62-64% para 10% etanol e 26-27% para 15% de etanol.

Esta característica de tolerância a concentrações de 5% e 10% de etanol sugere a possibilidade de realizar testes de aplicação desta enzima para melhoramento do aroma de cervejas e vinhos, a fim de verificar a capacidade de hidrólise da ligação glicosídica entre terpenos e arabinose. Para além disso, também nos oferece oportunidade para avaliar seu uso como um aditivo a coquetéis enzimáticos para melhoramento da degradação da fibra vegetal, especialmente em casos em que se pretende realizar sacarificação e fermentação simultânea, uma vez que a enzima se mostrou moderadamente estável a baixas concentrações de etanol por longo tempo de incubação. Comparado ao experimento apenas com a celulase comercial Celluclast® 1.5 (Novozymes), Zhang et al. (2018) demonstrou que o coquetel enzimático formado pela α -L-arabinofuranosidase de *Aspergillus niger* ND-1 expressa em *Pichia pastoris* combinadas a uma xilanase e a Celluclast® 1.5 melhorou em 15,9% a degradação da palha de milho pré-tratada em uma reação a pH 5 e 50 °C por 72 horas.

Comparativamente a outras enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico, a enzima apresentada aqui mostrou-se mais tolerante a etanol do que o reportado por Carvalho et al. (2018), a enzima bifuncional com atividade β -xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase secretada pelo fungo *C. graminicola* reteve 58% de sua atividade inicial após incubação com etanol 5%. Poucas são as investigações que reportam a estabilidade de glicosidases por longo tempo de incubação com etanol. Entre estes, em contraste ao exibido pela α -L-arabinofuranosidase secretada por *C. byrsina*, uma β -glicosidase secretada pela levedura *Pichia guilliermondii* G1.2 manteve entre 90-100% atividade em incubação com etanol 10% em pH 3,5 por 72 horas a 20 °C, 25 °C e 30 °C

(SILVA et al., 2019). β -glicosidases das leveduras *Pichia ofunaensis* e *Trichosporon multisporum* mantiverem atividades acima de 85% e 45%, respectivamente, após incubação com etanol 15% em pH 3,5 por 120 horas a 25 °C (VAZ et al., 2021).

Figura 14. Incubação da enzima com etanol (5, 10 e 15%) por 12 e 24 horas a 28 °C, seguido de avaliação da atividade enzimática remanescente. A reação enzimática foi conduzida usando tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 3,5, a 50 °C, com *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (4 mmol L⁻¹) como substrato.



Fonte: Autoria própria

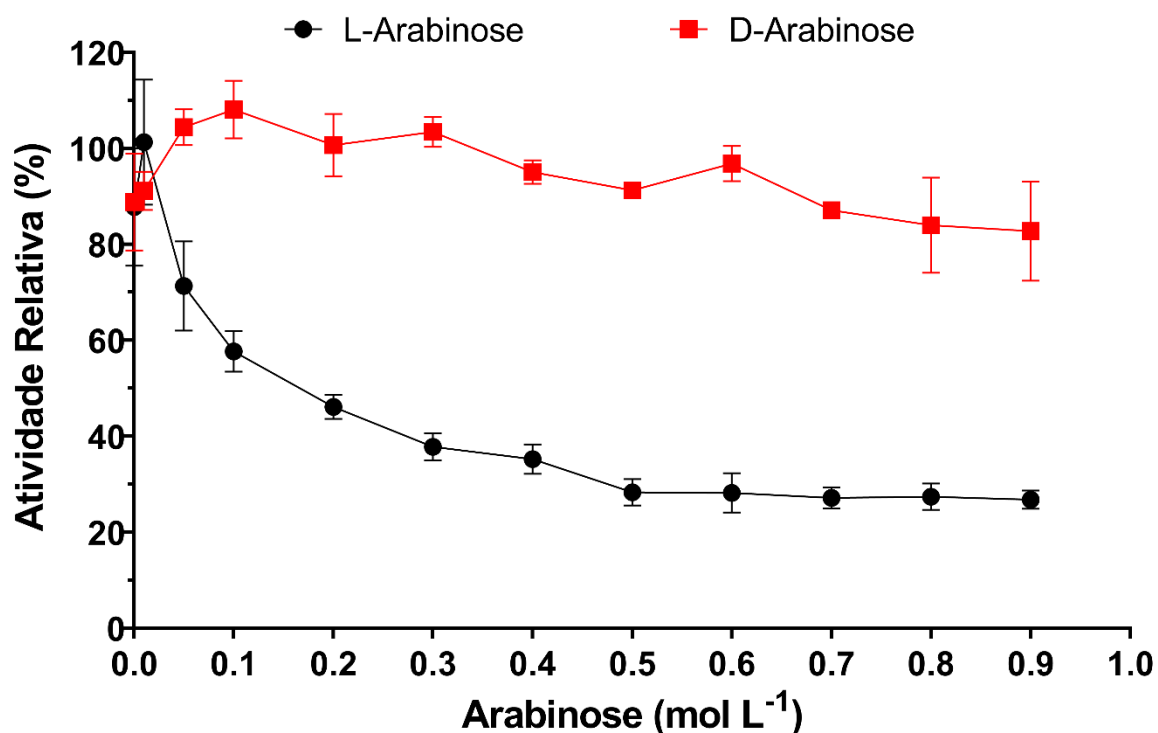
5.3.4 Efeito de D e L-arabinose na atividade enzimática

Na presença de D e L-arabinose a enzima apresentou comportamento distinto (**Figura 15**), com atividade residual de aproximadamente 70%, 50% e 30% a 0,05, 0,2 e 0,9 mol L⁻¹ de L-arabinose, respectivamente, enquanto que na presença de D-arabinose a atividade mínima registrada foi de 90% a 0,9 mol L⁻¹.

Esta enzima apresentou inibição pelo produto da reação, L-arabinose, e neste experimento pudemos verificar sua enantioseletividade, sendo capaz de discernir entre os enantiômeros de arabinose. A α -L-arabinofuranosidase de *Thermotoga thermarum* DSM5069 também exibiu sensibilidade ao produto da reação; aproximadamente 50% de atividade remanescente foi observado na presença de 500 mmol L⁻¹ de L-arabinose (XIE et al., 2016). Similar ao resultado exposto aqui, na presença de 200 mmol L⁻¹ de L-arabinose, Geng et al (2019) também reportaram 50% de inibição na atividade da α -L-arabinofuranosidase de *H. clariflavum* expressa em *E. coli*.

Apesar da inibição pelo produto da reação, a enzima ainda conservou quase 50% de atividade na presença de 0,2 mol L⁻¹ de L-arabinose, o que somado as demais características da enzima, como estabilidade na presença de etanol 5-10% e atividade a pH ácido, fortalece a possibilidade de aplicação desta enzima para melhoramento do aroma de vinho e cerveja.

Figura 15. Efeito de D e L arabinose (0,01-0,9 mol L⁻¹) na atividade da enzima secretada pelo fungo *C. byrsina*. A reação enzimática foi conduzida usando tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 3,5, a 50 °C, com *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (4 mmol L⁻¹) como substrato.



Fonte: Autoria própria

5.4 Hidrólise de diferentes substratos

Quando foi avaliada a capacidade de hidrolisar diferentes substratos, observamos atividade enzimática sobre *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo e *p*-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, com $6,71 \pm 0,23$ e $0,38 \pm 0,07$ U mg⁻¹, respectivamente, e nenhuma atividade sobre *p*-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo e *p*-Nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminídeo (tabela 5). Apesar de hidrolisar o substrato com xilose, a enzima exibiu preferência ao substrato contendo arabinose, sendo que a atividade sobre pNPA foi 17,65 vezes superior ao pNPX. Além disso, a enzima também foi capaz de hidrolisar 1,5 α -L-arabinana linear, liberando arabinose (**figura 16**).

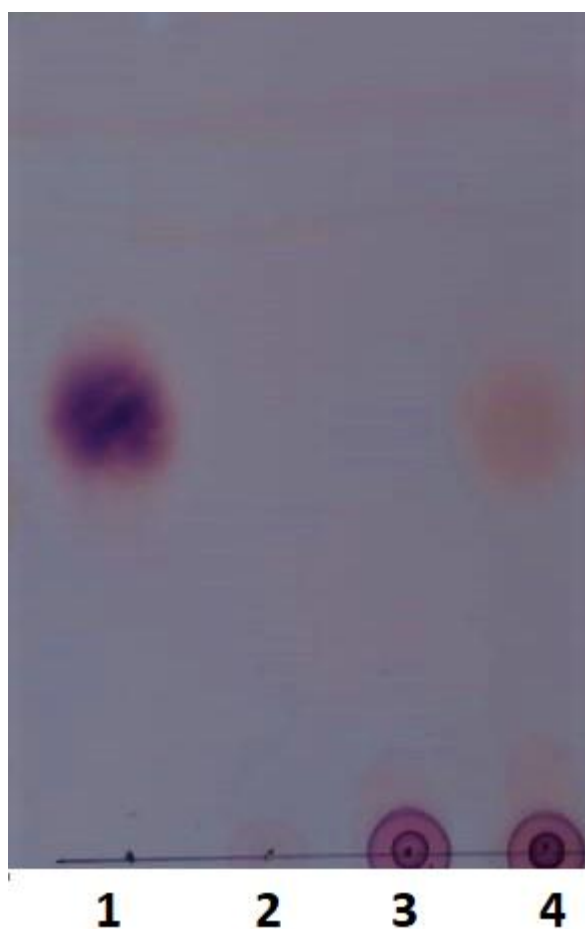
Em relação a α -L-arabinofuranosidases de basidiomicetos, Huy et al. (2013) reportaram uma enzima bifuncional xilosidase/arabinosidase de *P. chrysosporium* expressa em *P. pastoris*, entretanto, neste caso a enzima apresentou preferência por substrato *p*NPX, com 1797 U mg⁻¹ e para *p*NPA 197 U mg⁻¹, além de baixa atividade sobre L-arabinana, <0,08 U mg⁻¹ (*sugar beet arabinan*). Amore et al. (2012) também demonstraram que a α -L-arabinofuranosidase de *P. ostreatus*, expressa em *P. pastoris*, teve preferência pelos substratos contendo arabinose, *p*NPA CM-linear arabinana, arabinotriose e arabinohexaose, mas também reconheceu o substrato contendo glicose, *p*-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo.

Tabela 5. Capacidade da enzima α -L-arabinofuranosidase em hidrolisar diferentes substratos

Substratos	Atividade específica (U mg ⁻¹)
<i>p</i> -Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo	6,71 $\pm$ 0,23
<i>p</i> -Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo	0,38 $\pm$ 0,07
<i>p</i> -Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo	0
<i>p</i> -Nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminídeo	0

Fonte: Autoria própria

Figura 16. Análise qualitativa do produto da hidrólise de 1,5 α -L-arabinana linear pela enzima α -L-arabinofuranosidase em cromatografia de camada delgada. L-arabinose 1% dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 3,5; 1:1 v/v (1), Enzima + tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 3,5; 1:1 v/v (2), Substrato 1,5 α -L-arabinana 1% + tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 3,5; 1:1 v/v (3), Enzima + substrato 1,5 α -L-arabinana 1% (1:1 v/v) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 3,5 (4). As amostras foram incubadas por 24 horas a 50 °C, em seguida 5 μ L de cada amostra foram aplicados na placa de sílica e submetida a cromatografia usando fase móvel composta por n-butanol, metanol, solução de amônia (25%) e água na proporção 5:4:2:1 (v/v/v/v), respectivamente.

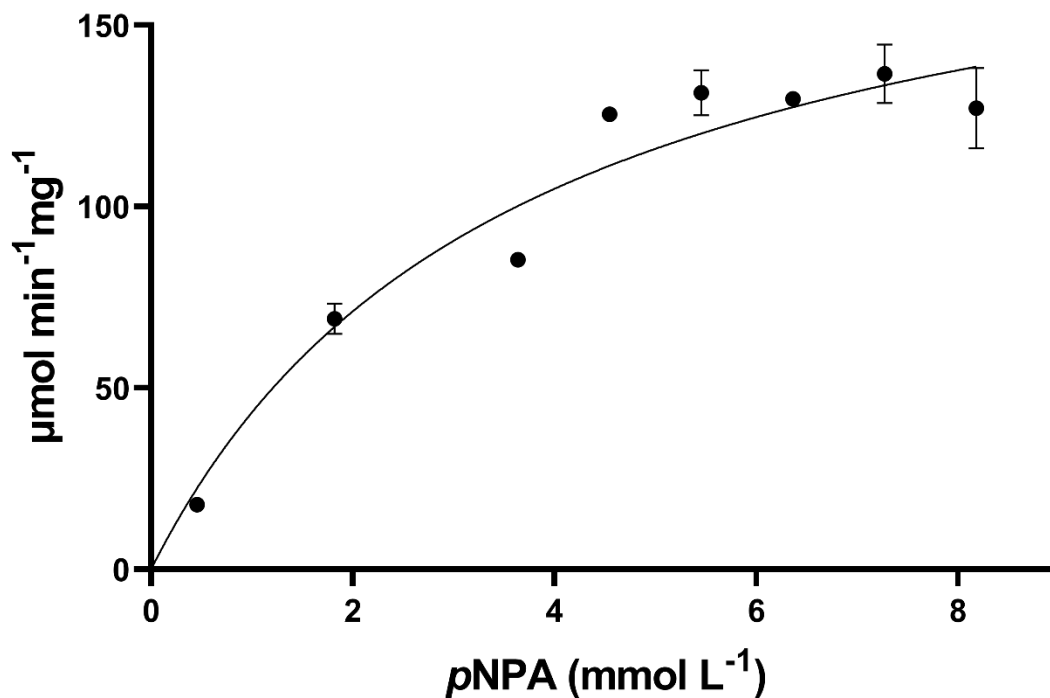


Fonte: Autoria própria

5.5 Cinética enzimática

Na cinética enzimática com o substrato *p*NPA o K_M observado de acordo com a equação de Michaelis-Menten foi de $3,45 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e $V_{\max}$ $198,2 \pm 24 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (**Figura 17**). Para α -L-arabinofuranosidases de basidiomicetos há poucos registros de cinética enzimática com o substrato *p*NPA, alguns destes, na comparação com nossos resultados, demonstraram maior afinidade pelo substrato, como o reportado por Amore et al. (2012), cuja enzima secretada por *Pleurotus ostreatus* apresentou um K_M de $0,64 \pm 0,11 \text{ mmol L}^{-1}$, e a α -L-arabinofuranosidase de *Dichomitus squalens* com K_M de $1,64 \text{ mmol L}^{-1}$ (BRILLOUET & MOULIN, 1985). No entanto, outras pesquisas com α -L-arabinofuranosidases de basidiomicetos relataram maiores valores de K_M para *p*NPA, como a enzima de *Ustilago maydis*, cujo K_M e $V_{\max}$ foram $7,5 \pm 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,06 \pm 0,0 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente (SIGUIER et al., 2014), enquanto que para a enzima bifuncional xilosidase/arabinofuranosidase de *P. chrysosporium* expressa em *P. pastoris*, os valores de K_M e $V_{\max}$ para a cinética com *p*NPA foram $12,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e $492 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente (HUY et al. (2013).

Figura 17. Cinética (Gráfico de Michaelis-Menten) da enzima α -L-arabinofuranosidase do fungo *C. byrsina*, variando a concentração do substrato *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosideo de 0,5 a 9 mmol L⁻¹. As reações enzimáticas foram conduzidas usando o tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 3,5, a 50 °C.



Fonte: Autoria própria

6. CONCLUSÕES

No desenvolvimento deste projeto de pesquisa, foram prospectadas α -L-arabinofuranosidases e outras glicosidases dos fungos *T. heterothallica*, *R. emersoni* e *C. byrsina* por fermentação em estado sólido usando palha e sabugo de milho como substratos. Dentre as enzimas e fungos inicialmente avaliados, purificamos uma α -L-arabinofuranosidase do fungo *C. byrsina*, cuja massa molecular foi estimada em 55 kDa, ótima atividade a pH 3,5-4,0 e 50 °C, e estabilidade em ampla faixa de pH (3-8) e temperatura (10-60 °C). A enzima também se mostrou estável a etanol 5-10% e sensível a presença de diversos íons, especialmente Fe^{3+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} , e L-arabinose.

Em reação com diferentes substratos, a enzima foi ativa sobre *p*-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (*p*NPA) e *p*-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NPX), cujo K_M e $V_{\max}$ sobre *p*NPA, em reação a pH 3,5 e 50 °C, foram $3,45 \pm 0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e $198,2 \pm 24 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente. Além disso, também observamos a capacidade de hidrólise de 1,5 α -L-arabinana linear, mas nenhuma atividade foi notada sobre os substratos *p*-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo e *p*-Nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminídeo.

As características desta enzima suportam a continuidade destes estudos para avaliar sua aplicação no melhoramento do aroma de bebidas, como vinho e cerveja, e uso como um aditivo a coquetel de enzimas hemicelulolíticas para intensificar a degradação da biomassa vegetal e liberação de monossacarídeos para a produção de biocombustível. Em futuros estudos, podemos considerar a expressão heteróloga desta enzima para aumentar sua produção e facilitar a purificação, de modo a viabilizar sua aplicação nos segmentos mencionados anteriormente.

REFERÊNCIAS

AMORE, A.; AMORESANO, A.; BIROLO, L.; HENRISSAT, B.; LEO, G.; PALMESE, A.; FARACO, V. A family GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*: identification, recombinant expression and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 995–1006, 2012.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, 95, 2021.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRILLOUET, J-M.; MOULIN, J-C. Production, purification, and properties of an α -L-arabinofuranosidase from *Dichomitus squafens*. **Carbohydrate Research**, v. 144, p. 113-126, 1985.

CARTMELL, A.; MCKEE, L. S.; PEÑA, M. J.; LARSBRINK, J.; BRUMER, H.; KANEKO, S.; ICHINOSE, H.; LEWIS, R. J.; VIKSØ-NIELSEN, A.; GILBERT, H. J.; MARLES-WRIGHT, J. The structure and function of an arabinan-specific α -1, 2-arabinofuranosidase identified from screening the activities of bacterial GH43 glycoside hydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 17, p. 15483-15495, 2011.

CARVALHO, D. R.; CARLI, S.; MELEIRO, L. P.; ROSA, J. C.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. A halotolerant bifunctional β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase from *Colletotrichum graminicola*: Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 741–750, 2018.

CASSIA PEREIRA, J.; TRAVAINI, T.; MARQUES, N. P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122-129, 2016.

CONTESINI, F. J.; LIBERATO, M. V.; RUBIO, M. V.; CALZADO, F.; ZUBIETA, M. P.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; SQUINA, F. M.; MUNIR, F. B.; SKAF, M. S.; DAMASIO, A. R. Structural and functional characterization of a highly secreted α -L-arabinofuranosidase (GH62) from *Aspergillus nidulans* grown on sugarcane bagasse. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 12, p. 1758–1769, 2017.

De CASTRO, A. M.; SANTOS, A. F.; KACHRIMANIDOU, V.; KOUTINAS, A. A.; FREIRE, D. M. G. Solid-State Fermentation for the Production of Proteases and Amylases and Their Application in Nutrient Medium Production. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Current Advances in Solid-State Fermentation. PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R (Eds). Elsevier, p. 185-210, 2018.

DE LA MARE, M., GUAIS, O., BONNINE, E., WEBER, J., FRANCOIS, J.M. Molecular and biochemical characterization of three GH62 -L-arabinofuranosidases from the soil deuteromycete *Penicillium funiculosum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, p. 351–358, 2013.

DOS SANTOS, C. R., DE GIUSEPPE, P. O., DE SOUZA, F. H. M., ZANPHORLIN, L. M., DOMINGUES, M. N., PIROLLA, R. A. S., MURAKAMI, M. T. The mechanism by which a distinguishing arabinofuranosidase can cope with internal di-substitutions in arabinoxylans. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2018.

DUFFECK, C. E.; DE MENEZES, C. L. A.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; SILVA, R. R. Keratinases from *Corioloropsis byrsina* as an alternative for feather

degradation: applications for cloth cleaning based on commercial detergent compatibility and for the production of collagen hydrolysate. **Biotechnology Letters**, v. 42, p. 2403-2412, 2020.

FAURE, R.; FAULDS, C. B.; FINCHER, E. G. B.; FORT, F. S.; FRY, G. S. C.; HALILA, S.; KABEL, G. M. A.; POUVREAU, K. L.; QUEMENER, I. B.; RIVET, A.; SAULNIER, G. L.; SCHOLS, J. H. A.; DRIGUEZ, I. H. A brief and informationally rich naming system for oligosaccharide motifs of heteroxylans found in plant cell walls. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, 533–540, 2009. <http://dx.doi.org/10.1071/CH08458>.

GAO, J.; ZHAO, Y.; ZHANG, G.; LI, Y.; LI, Q. Production optimization, purification, expression, and characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus polymyxa*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 36, p. 24–33, 2018.

GENG, A.; WU, J.; XIE, R.; WANG, H.; WU, Y.; LI, X.; CHANG, F.; SUN, J. Highly thermostable GH51 α -arabinofuranosidase from *Hungateiclostridium clariflavum* DSM 19732. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 9, p. 3783-3793, 2019.

GOLDBECK, R.; GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; BRENELLI, L. B.; DOUGLAS, WOLF, L. D.; PAIXÃO, D. A. A.; ROCHA, G. J. M.; SQUINA, F. M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 36–46, 2016.

HEUBERGER, A. L.; BROECKLING, C. D.; SEDIN, D.; HOLBROOK, C.; BARR, L.; KIRKPATRICK, K.; PRENNI, J. E. Evaluation of non-volatile metabolites in beer stored at high temperature and utility as an accelerated method to predict flavour stability. **Food Chemistry**, v. 200, p. 301-307, 2016.

HOLT, S.; MIKS, M. H.; DE CARVALHO, B. Y.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other

alcoholic beverages. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, p. 193-222, 2019.

HUY, N. D.; THAYUMANAVAN, P.; KWON, T-H.; PARK, S-M. Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 152-159, 2013.

IOANNES, P.; PEIRANO, A.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. An α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 253–258, 2000.

İLGU, H.; SURMELI, Y.; ŞANLI-MOHAMED, G. A thermophilic α -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus vulcani* GS90: heterologous expression, biochemical characterization, and its synergistic action in fruit juice enrichment. **European Food Research and Technology**, v. 244, p. 1627–1636, 2018.

KUMAR, M; BRAR, A; VIVEKANAND, V; PAREEK, N. Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chitooligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1641-1647, 2017.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LI, X.; XIE, X.; LIU, J.; WU, D.; CAI, G.; LU, J. Characterization of a putative glycoside hydrolase family 43 arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* and its potential use in beer production. **Food Chemistry**, v. 305, 125382, 2020.

LONDOÑO-HERNANDEZ, L.; RUIZ, H. A.; RAMÍREZ TORO, C.; ASCACIO VALDES, A.; RODRIGUEZ HERRERA, R.; AGUILERA CARBO, A.; TUBIO, G.; PICÓ, G. A.; PRADO BARRAGAN, A.; GUTIERREZ SANCHEZ, G.; AGUILAR, C. N. Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes. In: *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. ARORA, N. K.; MISHRA, J.; MISHRA, V. (Eds). Springer Nature Singapore, p. 87-113, 2020.

MOTTA, M. L. L.; FILHO, J. A. F.; MELO, R. R.; ZANPHORLIN, L. M.; SANTOS, C. A.; SOUZA, A. P. A novel fungal metal-dependent α -l-arabinofuranosidase of family 54 glycoside hydrolase shows expanded substrate specificity. **Scientific Reports**, v. 11:10961, 2021.

MRUDULAKUMARI VASUDEVAN, U.; LEE, E. Y. Flavonoids, terpenoids, and polyketide antibiotics: Role of glycosylation and biocatalytic tactics in engineering glycosylation. **Biotechnology Advances**, 2020.

NASCIMENTO, C. E. O.; OLIVEIRA SIMÕES, L. C.; DE CASSIA PEREIRA, J.; SILVA, R. R.; DE LIMA, E. A.; DE ALMEIDA, G. C.; PENNA, A. L. B.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Application of a recombinant GH10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* for xylooligosaccharide production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth. **Journal of Biotechnology**, v. 347, p. 1-8, 2022.

NUMAN, M TH; BHOSLE, N. B. α -L-arabinofuranosidases: The potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247–260, 2006.

OLAJIDE, A.; ADESINA, F. C.; ONILUDE, A. A. A Thermostable and Alkalitolerant Arabinofuranosidase by *Streptomyces lividus*. **Biotechnology Journal International**, v. 24, n. 2, p. 35-47, 2020.

OLIVEIRA SIMÕES, L. C.; SILVA, R. R.; OLIVEIRA NASCIMENTO, C. E.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. Purification and Physicochemical Characterization of a Novel Thermostable Xylanase Secreted by the Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, p. 991-1008, 2019.

ORDAZ-ORTIZ, J. J.; SAULNIER, L. Structural variability of arabinoxylans from wheat

flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. **Journal of Cereal Science**, v. 42, p. 119-125, 2005.

PEREIRA, G. F.; BASTIANI, D.; GABARDO, S.; SQUINA, F.; AYUB, M. A. Z. Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 78–85, 2018.

PEREIRA SCARPA, J. C.; MARQUES, N. P.; MONTEIRO, D. A.; MARTINS, G. M.; DE PAULA, A. V.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI, D. A. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141, 111795, 2019.

PERRONE, O. M.; ROSSI, J. S.; MORETTI, M. M. S.; NUNES, C. C. C.; BORDIGNON, S. E.; GOMES, E. SILVA, R.; BOSCOLO, M. Influence of ozonolysis time during sugarcane pretreatment: Effects on the fiber and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 733-737, 2017.

PORIA, V.; SAINI, J. K.; SINGH, S.; NAIN, L.; KUHAD, R. C. Arabinofuranosidases: Characteristics, microbial production, and potential in waste valorization and industrial applications. **Bioresource Technology**, v. 304, 123019, 2020.

RAHMANI, N.; KAHAR, P.; LISDIYANTI, P.; LEE, J.; YOPI.; PRASETYA, B.; OGINO, C.; KONDO, A. GH-10 and GH-11 Endo-1,4-B-xylanase enzymes from *Kitasatospora* sp. produce xylose and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse with no xylose inhibition. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 315–325, 2019.

RAVANAL, M. C.; EYZAGUIRRE, J. Heterologous expression and characterization of α -L-arabinofuranosidase 4 from *Penicillium purpurogenum* and comparison with the other isoenzymes produced by the fungus. **Fungal Biology**, v. 119, n. 7, p. 641–647, 2015.

RAVN, J. L.; GLITSØ, V.; PETTERSSON, D.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F.; PEDERSEN, N. R. Combined endo- β -1, 4-xylanase and α -l-arabinofuranosidase increases butyrate concentration during broiler cecal fermentation of maize glucurono-arabinoxylan. **Animal Feed Science and Technology**, v. 236, p. 159-169, 2018.

SAHA, B. C. α -L-Arabinofuranosidases: Biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 403–423, 2000.

SAITO K, VIBORG, A. H.; SAKAMOTO, S.; ARAKAWA, T.; YAMADA, C.; FUJITA, K.; FUSHINOBU, S. Crystal structure of β -L-arabinobiosidase belonging to glycoside hydrolase family 121. **PLoS ONE**, v. 15(6), e0231513, 2020.

SANTOS, C. R.; PAIVA, J. H.; MEZA, A. N.; COTA, J.; ALVAREZ, T. M.; RULLER, R.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M.; MURAKAMI, M. T. **Journal of Structural Biology**, v. 177, p. 469-476, 2012.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGTON, T. E. (Ed). Protein structure a practical approach. New York: Oxford University; 1-19, 1989.

SHINOZAKI, A.; KAWAKAMI, T.; HOSOKAWA, S.; SAKAMOTO, T. A novel GH43 α -L-arabinofuranosidase of *Penicillium chrysogenum* that preferentially degrades single-substituted arabinosyl side chains in arabinan. **Enzyme and Microbial Technology** 58–59, p. 80–86, 2014.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. Química Inorgânica, 6. Edição. Editora Bookman, Porto Alegre, 2017

SIGUIER, B.; HAON, M.; NAHOUM, V.; MARCELLIN, M.; BURLET-SCHILTZ, O.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; MOUREY, L.; O'DONOHUE, M. J.; BERRIN, J-G.; TRANIER, S.; DUMON, C. First Structural Insights into -L-Arabinofuranosidases from the Two GH62 Glycoside Hydrolase Subfamilies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 5261–5273, 2014.

SILVA, R. R.; CONCEIÇÃO, P. J. P.; MENEZES, C. L. A.; OLIVEIRA NASCIMENTO, C. E.; MACHADO BERTELLI, M.; PESSOA JÚNIOR, A.; SOUZA, G. M.; SILVA, R.; GOMES, E. Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1.2. **Journal of Biotechnology**, v. 294, p. 73-80, 2019.

SINGH CHADHA, B.; MONGA, A.; OBEROI, H. S. α -L-Arabinofuranosidase from an efficient hemicellulolytic fungus *Penicillium janthinellum* capable of hydrolyzing wheat and rye arabinoxylan to arabinose. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**, v. 6, p. 1132-1139, 2017.

SINHA, N.; SENGUPTA, S. Short Communication: Simultaneous production of α -arabinofuranosidase and xylanase by *Termitomyces clypeatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 359-360, 1995

SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S (Ed). Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. [s.l: s.n.]. .

TERRONE, C. C.; NASCIMENTO, J. M. F.; TERRASAN, C. R. F.; BRIENZO, M.; CARMONA, E. C. Salt-tolerant α -arabinofuranosidase from a new specie *Aspergillus hortai* CRM1919: Production in acid conditions, purification, characterization and application on xylan hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, 101460, 2020.

THAKUR, A.; SHARMA, K.; GOYAL, A. α -L-Arabinofuranosidase: A Potential Enzyme for the Food Industry. In: PARAMESWARAN, B.; VARJANI, S.; RAVEENDRAN, S. (Eds) Green Bio-processes. Energy, Environment, and Sustainability. Springer, Singapore, p. 229-244, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_12

TONOZUKA, T.; TANAKA, Y.; OKUYAMA, S.; MIYAZAKI, T.; NISHIKAWA, A.; YOSHIDA, M. Structure of the Catalytic Domain of α -L-arabinofuranosidase from *Coprinopsis cinerea*, CcAbf62A, Provides Insights into Structure–Function Relationships in Glycoside Hydrolase Family 62. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 181, p. 511-525, 2017.

VAŠTÍK, P.; ŠMOGROVIČOVÁ, D.; KAFKOVÁ, V.; SULO, P.; FURDÍKOVÁ, K.; ŠPÁNIK, I. Production and characterisation of non-alcoholic beer using special yeast. **KVASNY PRUMYSL**, v. 66, p. 336–344, 2020.

VAZ, J. E.; RABELO, L.; ZAITER, M. A.; PEREIRA, W. E. S.; METZKER, G.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; SILVA, R. R. Functional properties and potential application of ethanol tolerant β -glucosidases from *Pichia ofunaensis* and *Trichosporon multisporum* yeasts. **3 Biotech**, v. 11, p 467, 2021.

VUONG, T. V.; MASTER, E. R. Enzymatic upgrading of heteroxylans for added-value chemicals and polymers. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 73, p. 51–60, 2022.

XIE, J.; ZHAO, D.; ZHAO, L.; PEI, J.; XIAO, W.; DING, G.; WANG, Z.; XU, J. Characterization of a novel arabinose-tolerant α -L-arabinofuranosidase with high ginsenoside Rc to ginsenoside Rd bioconversion productivity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 647--660, 2016.

YANG, W.; BAI, Y.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; MENG, K.; SHI, P.; WANG, Y.; YAO, B. A novel bifunctional GH51 exo- α -l-arabinofuranosidase/endo-xylanase

from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. **Biotechnol Biofuels**, v. 8, p. 197, 2015.

YANG, Y.; SUN, J.; WU, J.; ZHANG, L.; DU, L.; MATSUKAWA, S.; XIE, J.; WEI, D. Characterization of a Novel α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 7 and Rational Design for Its Thermostability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 40, p. 7546–7554, 2016.

WILKENS, C.; ANDERSEN, S.; DUMON, C.; BERRIN, J-G.; SVENSSON, B. GH62 arabinofuranosidases: Structure, function and applications. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 792-804, 2017.