

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**$\alpha$ -ARABINOFURANOSIDASE DE *Aspergillus hortai* CRM1919: PRODUÇÃO,  
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE  
HEMICELULOSES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**CÁROL CABRAL TERRONE**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eleonora Cano Carmona

**Rio Claro  
2017**

CÁROL CABRAL TERRONE

**$\alpha$ -ARABINOFURANOSIDASE DE *Aspergillus hortai* CRM 1919: PRODUÇÃO,  
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE  
HEMICELULOSES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleonora Cano Carmona

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro

2017

547.758 Terrone, Cárol Cabral  
T328a a-Arabinofuranosidase de *Aspergillus hortai* CRM1919: produção, purificação, caracterização e aplicação na hidrólise de hemiceluloses de resíduos agroindustriais / Cárol Cabral Terrone. - Rio Claro, 2018  
122 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientadora: Eleonora Cano Carmona

Coorientador: Michel Brienzo

1. Enzimas. 2. Enzimas hemicelulolíticas. 3. Fungo filamentoso. 4. Polpa cítrica. 5. Extração de hemiceluloses. 6. Hidrólise enzimática. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE:  $\alpha$ -ARABINOFURANOSIDASE DE *Aspergillus hortae*: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE HEMICELULOSES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

**AUTORA: CÁROL CABRAL TERRONE**

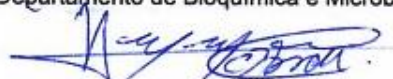
**ORIENTADORA: ELEONORA CANO CARMONA**

**COORIENTADOR: MICHEL BRIENZO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



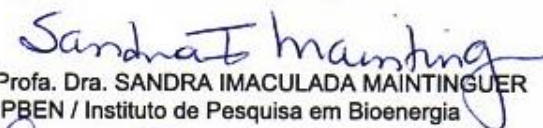
Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



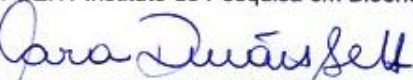
Prof. Dr. HAMILTON CABRAL  
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Universidade de São Paulo



Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI  
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural / Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. SANDRA IMACULADA MAINTINGUER  
IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 14 de novembro de 2017

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho e todos os meus anos de estudo e de trabalho àqueles que dedicaram suas vidas na construção do meu caminho. Eles que são meus pilares, a base da minha estrutura: aos meus pais Alvaro e Lenita, à minha irmã Adriana e, agora, ao meu esposo Richard. Amores da vida inteira.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona, pela orientação durante esses 7 anos de trabalho, por tudo que me ensinou, pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Michel Brienzo pela orientação, pelo conhecimento compartilhado, pela atenção e esclarecimentos.

À Carmen Silvia Casonato de Souza, pelo apoio técnico durante esses 7 anos no laboratório, mas principalmente pela paciência, pela amizade e agradável convivência.

À minha querida amiga Juliana Montesino de Freitas Nascimento pela companhia no laboratório, pela amizade, carinho, cumplicidade, sentimentos compartilhados, e pela diversão nesses anos de convivência.

Aos companheirinhos de laboratório Michel Ricardo Gracioli e Caroline de Freitas, pela amizade, companhia, pelas dúvidas que esclarecem as minhas, pela ajuda nesse trabalho e em todas as atividades no laboratório.

Aos alunos do Prof. Michel que nos ajudaram muitas vezes na caracterização da biomassa, especialmente ao Gabriel Oliveira Azevedo pela paciência e disposição com as análises no HPLC.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues e ao Danilo Polezel pela identificação da linhagem de *Aspergillus hortai* CRM1919.

À Gabriela Alves Licursi Vieira, pela companhia divertidíssima em Florianópolis, pelo apoio na disciplina de Microbiologia para Ciências Biológicas, pelo carinho e pela amizade surgida.

Ao Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida e ao Dr. César Rafael Fanchini Terrasan pelos esclarecimentos, pela ajuda e apoio nos primeiros anos desse trabalho.

A todos que passaram pelo laboratório durante esse período, nos estágios e disciplinas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse trabalho, pelo auxílio e agradável convívio.

A todo corpo docente, técnicos e colegas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e demais setores da UNESP – Rio Claro, que sempre me socorreram em alguma necessidade, sempre dispostos a ajudar, especialmente Roberto José Pedro, Fátima Neves, Adriano Uemura de Faria, Ângela Barbosa Scatolin e Felipe Marchi Guimarães.

Aos meus amados pais, Alvaro e Lenita, pelo amor, paciência, carinho, cuidado, amparo, ajuda, proteção, pela vida, por tudo! Por serem os melhores espelhos. Tudo o que sou e tudo o que sei devo a eles.

À minha irmã Adriana, pelo amor, pela paciência comigo, pela amizade e cumplicidade que temos compartilhado desde sempre.

Ao meu amor Richard Tomasella, por ter “aparecido” em minha vida, pelo apoio, pela paciência, pelo carinho, pelo amor, por ter trazido paz ao meu coração, alegria e leveza aos meus dias. As coisas incríveis da vida acontecem quando você não planeja. “Te amarei de janeiro a janeiro, até o mundo acabar.”

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e me abraçaram, especialmente aos meus avós Maria e Antônio, à Luciana, pelo almoço de cada dia e pela Lorena, alegria da nossa casa, e à tia Cláudia por estar sempre presente.

À minha grande amiga Talita Bonato Almeida por estar sempre comigo. Neoqav!

À família biotec: Augusto, Camila, Cleiton, Dérick, Fabiano, Felipe, Fernanda, Daniel, Gabriela, Luís Guilherme, Marcus, Priscila e Rodolfo. Pela amizade, o carinho e o amor de sempre.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E maiormente a Deus por ter me ajudado a concluir mais essa etapa da minha trajetória, me concedendo paciência para superar cada obstáculo, luz e sabedoria na condução dos experimentos, esperança e fé para os momentos de escuridão. “(...) porque sem mim nada podeis fazer.” (João 15:5).



*“Lança o teu pão sobre as águas,  
porque depois de muitos dias o acharás.”*

*(Eclesiastes 11:1)*

## Resumo

Biomassa lignocelulósica é a principal fonte de carbono renovável no planeta. Seus constituintes majoritários são celulose, hemiceluloses e lignina. Hemiceluloses são polissacarídeos ramificados sendo o principal tipo as xilanas, estruturas com cadeia principal de xilose. Dentre as diversas enzimas hidrolíticas, que atuam sobre a estrutura de xilanas, estão as  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeses, que catalisam a hidrólise de ligações entre  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeos e a cadeia principal do polissacarídeo. Neste trabalho, uma linhagem de *Aspergillus hortai* CRM1919, isolada de solo próximo a lagoas salinas e alcalinas da região da Nhecolândia no Pantanal Matogrossense, foi utilizada para produzir  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeses. Resíduos agroindustriais foram utilizados como substrato para o cultivo do fungo. O objetivo principal foi otimizar a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeses e aumentar a produção a fim de se obter um filtrado enzimático rico nessa atividade, para posteriormente purificá-la e aplicá-la na degradação de biomassa. A linhagem foi cultivada em meio líquido de Vogel suplementado com diferentes substratos, dentre eles alguns subprodutos da agroindústria. As maiores produções de  $\alpha$ -arabinofuranosídeses ocorreram nos cultivos com polpa cítrica e casca de laranja a 1% (m/v) em cultivos estáticos por 4 dias, com pH inicial de 2,5 e temperatura de 30 °C. Após todas as etapas de otimização, o extrato bruto apresentou atividade quinze vezes maior do que nos cultivos iniciais. A enzima foi purificada por uma estratégia de três etapas, sendo uma precipitação com sulfato de amônio, na concentração de 25 a 65%, uma cromatografia de troca iônica e outra de exclusão molecular, apresentando ao final uma recuperação de 10,1% com um fator de purificação de 58,7. As características da  $\alpha$ -L-arabinofuranosídesase purificada foram determinadas, sendo pH ótimo de 4,0 e temperatura ótima de 60 °C, meia vida a 30 e 40 °C de 265 e 230 minutos, respectivamente. A maior estabilidade da enzima ao pH ocorreu em pH 5,0, A atividade enzimática foi reduzida na presença de  $Zn^{+2}$ , PMSF, SDS e etanol a 20%, mas foi ativada na presença de  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$ , EDTA, Tween 20, Tween 80 e Triton X-100. A  $\alpha$ -arabinofuranosídesase apresentou tolerância a presença de 0,5 e 1,0 M de NaCl no meio reacional, e alta estabilidade nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 M de NaCl. Os parâmetros cinéticos para o substrato  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo foram  $K_m$  de 8,73 mM,  $V_{m\acute{a}x}$  de 7,91  $\mu$ mol/min.mg e  $K_{cat}$  de 0,59/min. A enzima purificada apresentou afinidade apenas sobre o substrato  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo. Na caracterização das biomassas in natura, o bagaço de cana-de-açúcar apresentou em sua composição 30% de celulose, 16% de hemiceluloses e 20% de ligninas totais, enquanto bagaço de malte apresentou 20% de celulose, 20% de hemiceluloses e 20% de ligninas totais. Na caracterização da hemicelulose extraída, a

de bagaço de cana-de-açúcar apresentou composição em açúcares redutores de 7,8% de glicose, 23,7% de xilose e 2,6% de arabinose; a hemicelulose de bagaço de malte apresentou em sua composição 20,6% de glicose, 28,3% de xilose e 9,4% de arabinose. A hidrólise das hemiceluloses e de xilanas comerciais foi realizada na presença da  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada e do filtrado bruto de cultivo contendo a  $\alpha$ -arabinofuranosidase, associados com uma xilanase purificada, também produzida por *Aspergillus hortai*. Em ambos os casos foi possível verificar a cooperação entre enzimas do complexo xilanolítico e a atuação sequencial de cada uma na hidrólise das estruturas de xilano.

**Palavras-chave:** enzimas hemicelulolíticas; fungo filamentosos; polpa cítrica; extração de hemiceluloses; hidrólise enzimática.

## Abstract

Lignocellulosic biomass is the main source of renewable carbon on the planet. Its major constituents are cellulose, hemicelluloses and lignin. Hemicelluloses are branched polysaccharides being the main type the xylan, xylose main chain structures. Among the various hydrolytic enzymes that act on the xylan structure there are the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, which catalyze the hydrolysis of linkages between  $\alpha$ -L-arabinofuranosides and the polysaccharide main chain. In this work, a strain of *Aspergillus hortai* CRM1919, isolated from soil near saline and alkaline lagoons of the Nhecolândia region in Pantanal Matogrossense, was used to produce  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases. Agroindustrial wastes were used as substrate for the fungus cultivation. The main objective was to optimize the production of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and increase the yield in order to obtain a rich enzymatic filtrate in this activity, to later purify it and apply it in the hydrolysis of biomass. The strain was cultivated in Vogel liquid medium supplemented with different substrates, among them some by-products of agroindustry. The highest production of  $\alpha$ -arabinofuranosidases occurred in cultures with citrus pulp and orange peel at 1% (w/v) in static cultures for 4 days, with an initial pH of 2.5 and temperature of 30 °C. After all the optimization steps, the crude extract presented activity fifteen times higher than the initial cultures. The enzyme was purified by a three-step strategy, with ammonium sulfate precipitation at 25-65% concentration, ion exchange chromatography and molecular exclusion chromatography, with recovery of 10.1% and purification fold of 58.7. The characteristics of the purified  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase were determined, being optimum pH of 4.0 and optimum temperature of 60 °C, half-life at 30 and 40 °C of 265 and 230 minutes, respectively. The higher stability of the enzyme to pH occurred at pH 5.0. Enzymatic activity was reduced in the presence of  $Zn^{+2}$ , PMSF, SDS and 20% ethanol and was activated in the presence of  $Mg^{+2}$ ,  $Na^{+}$ , EDTA, Tween 20, Tween 80 and Triton X-100. The  $\alpha$ -arabinofuranosidase presented tolerance to the presence of 0.5 and 1.0 M NaCl in the reaction medium, and high stability at the concentrations of 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 M NaCl. The kinetic parameters for the p-nitro phenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside substrate were  $K_m$  of 8.73 mM,  $V_{max}$  of 7.91  $\mu$ mol / min.mg and  $K_{cat}$  of 0.59 / min. The purified enzyme had affinity only on the p-nitro phenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside substrate. In the characterization of in natura biomasses, sugarcane bagasse presented 30% cellulose, 16% hemicelluloses and 20% total lignins, while brewer's spent grain presented 20% cellulose, 20% hemicelluloses and 20% total lignins. In the characterization of extracted hemicellulose, the sugarcane bagasse presented composition in reducing sugars of 7.8% of glucose, 23.7% of xylose and 2.6% of arabinose; the hemicellulose

of brewer's spent grain presented 20.6% glucose, 28.3% xylose and 9.4% arabinose. Hydrolysis of the hemicelluloses and commercial xylans was performed in the presence of the purified  $\alpha$ -arabinofuranosidase and the crude culture filtrate containing  $\alpha$ -arabinofuranosidase, associated with a purified xylanase, also produced by *Aspergillus hortai*. In both cases it was possible to verify the cooperation between xylanolytic complex enzymes and the sequential action of each one in the hydrolysis of the xylan structure.

**Keywords:** citrus pulp; filamentous fungus; hemicellulolytic enzymes; extraction of hemicelluloses; enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
Figura 1. Estrutura típica de lignocelulose .....	20
Figura 2. Representações esquemáticas das estruturas de tipos de hemiceluloses .....	22
Figura 3. Representações esquemáticas das estruturas de tipos de xilanas .....	24
Figura 4. Pontos de hidrólise de enzimas hemicelulolíticas sobre uma molécula de heteroxilana .....	25
Figura 5: Mecanismos de hidrólise de glicosidases .....	28
Figura 6. Estruturas tridimensionais representativas de glicosil hidrolases das famílias GH 2, GH 3, GH 43, GH 51, GH 54 e GH 61.....	32
Figura 7. Características de conidióforos específicas de <i>Aspergillus</i> .....	51
Figura 8. Estruturas sexuais de <i>Aspergillus</i> .....	52
Figura 9. Fotografias e micrografias de estruturas de <i>Aspergillus hortai</i> .....	53
Figura 10. Nhecolândia no Pantanal Mato-grossense .....	62
Figura 11. Produção de $\alpha$ -arabinofuranosidase por <i>Aspergillus hortai</i> em cultivo estático e agitado .....	79
Figura 12. Superfície de contorno e curva de superfície de resposta do efeito do pH e da temperatura sobre a produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase .....	82
Figura 13. Perfis cromatográficos da purificação da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase .....	84
Figura 14: Perfil de SDS-PAGE (8-18%) .....	85
Figura 15: Efeito do pH sobre a atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada .....	86
Figura 16: Efeito da temperatura sobre a atividade da $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada .....	87
Figura 17: Estabilidade da atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase ao pH .....	88
Figura 18: Termoestabilidade da atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada .....	89
Figura 19: Efeito do NaCl sobre a atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase .....	93
Figura 20: Estabilidade ao NaCl da atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase .....	94
Figura 21: Gráfico duplo-recíproco da atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada	95

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1: Composição média da biomassa lignocelulósica de resíduos agrícolas e agroindustriais .....	21
Tabela 2: Características de algumas $\alpha$ -arabinofuranosidases de micro-organismos	34
Tabela 3: Condições experimentais de purificação de algumas $\alpha$ -arabinofuranosidases de micro-organismos .....	41
Tabela 4. Meio de saís de Vogel (1956) .....	64
Tabela 5: Composição da solução tampão de McIlvaine .....	66
Tabela 6: Planejamento composto central .....	68
Tabela 7: Influência de carboidratos puros, subprodutos e resíduos da agroindústria.....	77
Tabela 8: Condições experimentais em valores reais (codificados) e resultados .....	80
Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) do modelo polinomial .....	81
Tabela 10: Purificação da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de <i>Aspergillus hortai</i> .....	83
Tabela 11: Influência de íons e algumas substâncias sobre a atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada de <i>A. hortai</i> .....	91
Tabela 12: Atividades enzimáticas presentes no filtrado bruto e especificidade ao substrato da $\alpha$ -L-arabinofuranosidase purificada .....	96
Tabela 13: Composição química de bagaço de cana-de-açúcar e de malte in natura	97
Tabela 14: Composição em monossacarídeos e lignina de hemiceluloses extraídas de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte .....	99
Tabela 15: Produtos de hidrólise formados após ação de xilanase e $\alpha$ -arabinofuranosidase de <i>A. hortai</i> .....	100
Tabela 16: Produtos de hidrólise formados após ação das enzimas presentes no filtrado bruto e da xilanase de <i>A. hortai</i> .....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

2G – segunda geração  
ABF –  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase  
ANOVA – análise de variância  
CAZy – Carbohydrate-Active Enzymes  
CRM – Central de Recursos Microbianos  
DCCR – delineamento composto central rotacional  
DMSO - dimetilsufóxido  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
 $g$  – força gravitacional  
GH – glicosídeo hidrolases  
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência  
Kcat – número de renovação catalítica  
kDa – kilo Dalton  
Km – constante de Michaeli-Menten  
MM – massa molar ou massa molecular  
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida  
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfônico  
pNPAra – p-nitrofenil  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
V<sub>máx</sub> – velocidade máxima  
XOS – xilo-oligossacarídeos  
Xyl II – endoxilanase

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Biomassa lignocelulósica – Hemiceluloses – Xilana .....	19
2.2 Sistema xilanolítico – $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas .....	24
2.3 Catálise enzimática – Famílias de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas .....	26
2.3.1 Sequenciamento de $\alpha$ -arabinofuranosidasas – composição de aminoácidos	33
2.3.2 Massa molecular e subunidades estruturais de $\alpha$ -arabinofuranosidasas .....	33
2.4 $\alpha$ -Arabinofuranosidasas – distribuição microbiana e propriedades moleculares .....	37
2.4.1 Estabilidade de $\alpha$ -arabinofuranosidasas .....	39
2.4.2 Purificações de $\alpha$ -arabinofuranosidasas .....	40
2.5 Aplicações de $\alpha$ -arabinofuranosidasas – da agricultura à medicina .....	47
2.6 O gênero <i>Aspergillus</i> e a espécie <i>Aspergillus hortai</i> .....	50
2.7 Etanol de 2º geração – pré-tratamento e hidrólise da biomassa .....	54
2.7.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica .....	55
2.7.1.1 Métodos termoquímicos .....	56
2.7.1.2 Métodos químicos .....	56
2.7.1.3 Métodos bioquímicos e biológicos .....	58
2.7.2 Hidrólise da biomassa pré-tratada .....	58
3 OBJETIVOS .....	61
3.1 Objetivos específicos .....	61
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	62
4.1 Micro-organismo e condições de crescimento .....	62

	<b>Página</b>
4.2 Condições de cultivo para produção de enzimas .....	63
4.3 Obtenção das soluções enzimáticas .....	65
4.4 Determinação da atividade $\alpha$ -L-arabinofuranosidase .....	65
4.5 Determinação de proteínas totais .....	66
4.6 Influência da fonte de carbono sobre a produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase	66
4.7 Cultivo do fungo em condição estática e agitada .....	67
4.8 Interação entre o pH e a temperatura sobre a produção de $\alpha$ - arabinofuranosidase .....	67
4.9 Purificação da $\alpha$ -arabinofuranosidase produzida por <i>A. hortai</i> .....	69
4.9.1 Precipitação com sulfato de amônio .....	69
4.9.2 Cromatografia de troca iônica .....	69
4.9.3 Cromatografia de exclusão molecular .....	69
4.9.4 Eletroforese SDS-PAGE .....	70
4.10 Caracterização da $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada .....	70
4.11 Extração de hemiceluloses .....	72
4.12 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e do bagaço de malte in natura	73
4.12.1 Teor de umidade .....	73
4.12.2 Teor de extrativos .....	73
4.12.3 Caracterização química – Hidrólise ácida dos substratos .....	73
4.13 Caracterização da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte .....	74
4.14 Hidrólise enzimática de hemiceluloses .....	74
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
5.1 Influência da fonte de carbono utilizada no cultivo de <i>A. hortai</i> sobre a produção de $\alpha$ -arabinofuranosidase .....	76

	<b>Página</b>
5.2 Influência dos dias de cultivo e da agitação sobre a produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase .....	78
5.3 Metodologia de superfície de resposta para otimização da produção de $\alpha$ -arabinofuranosidase .....	80
5.4 Purificação da $\alpha$ -arabinofuranosidase produzida por <i>Aspergillus hortai</i> .....	83
5.5 Propriedades da $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada .....	86
5.5.1. Temperatura e pH ótimos de reação .....	86
5.5.2. Estabilidade térmica e ao pH .....	88
5.5.3. Influência de íons e substâncias .....	90
5.5.4. Tolerância e estabilidade ao NaCl da $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada ...	93
5.5.5. Parâmetros cinéticos .....	95
5.5.6. Especificidade por substratos .....	96
5.6 Caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte e extração de hemiceluloses .....	97
5.6.1 Caracterização dos materiais in natura .....	97
5.6.2 Extração e caracterização química de hemiceluloses .....	98
5.7 Hidrólise enzimática de xilanas e hemiceluloses .....	100
6 CONCLUSÃO .....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## 1 INTRODUÇÃO

$\alpha$ -L-Arabinofuranosidases são enzimas do complexo xilanolítico, que atuam na hidrólise das ramificações arabinosil de moléculas de xilana, uma hemicelulose. Estas enzimas são essenciais para a completa degradação de hemiceluloses pois, removendo as cadeias laterais, tornam os substratos de endoxilanase e de  $\beta$ -xilosidases mais acessível. Muitos ramos industriais, como a produção de alimentos, fármacos, têxteis, detergentes, ração animal, biocombustíveis, entre outras, tem se utilizado de enzimas, como as  $\alpha$ -arabinofuranosidases, para aumentar a eficiência tanto na produção, quanto na qualidade dos seus produtos. O estudo da produção com maior rendimento e de obtenção mais eficiente de  $\alpha$ -arabinofuranosidases, se justifica pela crescente exigência ambiental e de políticas governamentais, por processos industriais “mais verdes” que utilizem menos produtos químicos, prejudiciais ao meio ambiente. As enzimas atuam de maneira mais eficiente do que os compostos químicos, pois agem diretamente e apenas sobre a reação de interesse.

De acordo com um artigo publicado pela BCC Research Biotechnology intitulado “Global Markets for Enzymes in Industrial Applications” de janeiro de 2017, o mercado global de enzimas industriais atingiu aproximadamente 4,9 bilhões de dólares em 2015 e a previsão é de que atinja 6,3 bilhões de dólares em 2021, com crescimento anual de 4,7% nesse período. Segundo este estudo, o mercado de enzimas na indústria alimentícia e de ração animal tem uma previsão de crescimento de 400 milhões de dólares entre 2016 e 2021, que passará de 1,5 para 1,9 bilhões de dólares ao final desse período.

A demanda por novas enzimas com propriedades especiais, que se adequem às condições reacionais de diferentes ramos industriais, fortalece a pesquisa e também justifica a exploração de novos organismos produtores. As enzimas utilizadas pela indústria são majoritariamente produzidas por micro-organismos, pois estas fontes enzimáticas são de fácil manipulação. Eles apresentam crescimento rápido, secreção das enzimas ao meio externo e manipulação genética facilitada. Neste trabalho, foi utilizado o fungo *Aspergillus hortai* CRM1919, isolado de solo próximo a lagoas salinas do Pantanal Matogrossense, incubado a 40 °C para a produção de enzimas do complexo xilanolítico, principalmente  $\alpha$ -arabinofuranosidases. Uma vantagem na

utilização desse fungo é que ele apresenta alta produção de enzimas hemicelulolíticas em meios de cultura utilizando resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato.

A biomassa lignocelulósica proveniente das práticas agrícolas e agroindustriais é composta principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina, mas também pode apresentar pectinas, proteínas e outros constituintes em menor quantidade. No Brasil há uma grande disponibilidade desses materiais, provenientes do cultivo de cana-de-açúcar, milho, soja, café, trigo, arroz, algodão, sorgo, mandioca, banana, laranja, entre outros. Esses subprodutos agroindustriais podem ser aplicados tanto no cultivo dos micro-organismos para produção de enzimas, quanto na hidrólise enzimática, na forma de substratos para  $\alpha$ -arabinofuranosidases e outras enzimas do complexo xilanolítico, para a produção de xilo-oligo e/ou monossacarídeos. A principal vantagem dessa aplicação é reutilizar materiais ricos em polissacarídeos que seriam descartados, que causariam a contaminação e prejuízos ao meio ambiente, destinando-os à fins mais nobres com produtos finais de maior valor agregado.

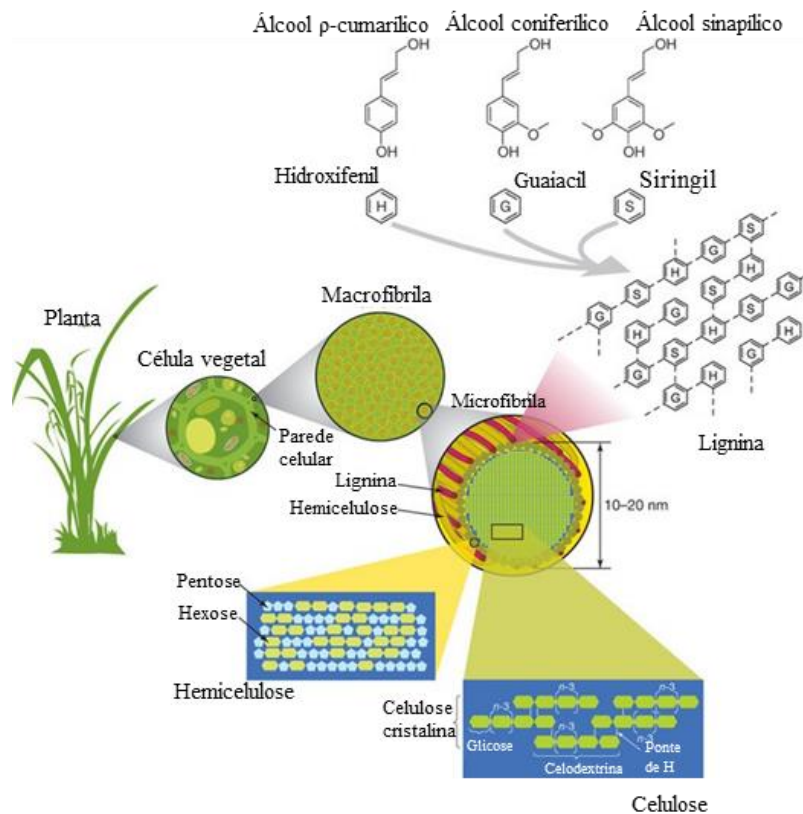
Este trabalho apresenta possibilidades de utilização de subprodutos da agroindústria na produção de  $\alpha$ -arabinofuranosidases e na obtenção de hemiceluloses. Para tanto foi realizado um estudo da otimização da produção, purificação e caracterização de uma  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida pela linhagem de *Aspergillus hortai* CRM 1919 cultivado em polpa cítrica seguida da aplicação desta enzima na hidrólise de hemiceluloses de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biomassa lignocelulósica – Hemiceluloses – Xilana

Todo material vegetal e seus derivados como troncos, folhas, caules, galhos, resíduos agrícolas, municipais e florestais, podem ser denominados biomassa lignocelulósica, que é a única fonte de carbono renovável do planeta (ZHOU et al., 2017). Essa matéria prima é composta majoritariamente por dois polissacarídeos: celulose e hemiceluloses. O terceiro maior componente da biomassa é a lignina, uma estrutura macromolecular, polifenólica e amorfa da biomassa lignocelulósica (AMARASEKARA, 2013). A **Figura 1** ilustra a estrutura típica de materiais lignocelulósicos. A composição da biomassa depende de muitos fatores, como por exemplo, espécie vegetal, idade da planta, localização do material na planta. Em média, materiais vegetais apresentam de 35-50% de celulose, 20-35% de hemiceluloses e de 15-30% de lignina (AMARASEKARA, 2013). Além dos três principais constituintes, a biomassa lignocelulósica apresenta em sua estrutura componentes orgânicos (denominados extrativos) como resinas, fito esteróis, lipídios, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, pigmentos, e componentes inorgânicos que em geral são quantificados na forma de cinzas residuais após calcinação do material vegetal (AMARASEKARA, 2013). A **Tabela 1** relaciona exemplos de composições típicas de alguns materiais vegetais em porcentagem de celulose, hemiceluloses, lignina e outros componentes que aparecem em menor quantidade.

A lignina é um polímero complexo, reticulado, composto principalmente por três monômeros – p-hidroxifenil, guaiacil e siringil – cuja repetição dos monômeros não ocorre de maneira regular. Este componente forma uma estrutura tridimensional na parede celular vegetal, protegendo as microfibrilas de celulose e rede de polissacarídeos (hemiceluloses e pectina), apresentando características hidrofóbicas e aromáticas, quando na natureza (AMARASEKARA, 2013; ZHOU et al., 2017). A lignina forma uma estrutura recalcitrante, e diferente dos polissacarídeos, não pode ser utilizada nos processos de fermentação para produção de etanol, por exemplo.

**Figura 1:** Estrutura típica de lignocelulose.

**Fonte:** Modificado de Rubin (2008).

A celulose é um polissacarídeo homogêneo e linear com alto grau de polimerização, de estrutura bem definida, formado unicamente por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, cuja unidade básica é a celobiose, um dímero de glicose. O processo de hidrólise da celulose, também conhecido como sacarificação, tem como produto final a glicose (AMARASEKARA, 2013; ZHOU et al., 2017).

As hemiceluloses por sua vez, consistem de diferentes tipos de polissacarídeos heterogêneos que apresentam estruturas com menor grau de polimerização que a celulose. São formados por uma cadeia linear de açúcares contendo cinco carbonos, como xilose e arabinose, ou seis carbonos, como galactose, glicose e manose, e diversas ramificações. Cada tipo de hemicelulose pode apresentar uma composição e estrutura diferente, e a variação de sua composição ocorre de acordo com a espécie vegetal, localização na planta, entre outros fatores. Sua natureza amorfa permite que a hemicelulose seja mais facilmente hidrolisada em relação à celulose, sendo que o produto obtido em maior concentração na hidrólise de hemiceluloses de gramíneas é a xilose (AMARASEKARA, 2013; ZHOU et al., 2017).

**Tabela 1:** Composição média da biomassa lignocelulósica proveniente de resíduos agrícolas e agroindustriais em teor de celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes.

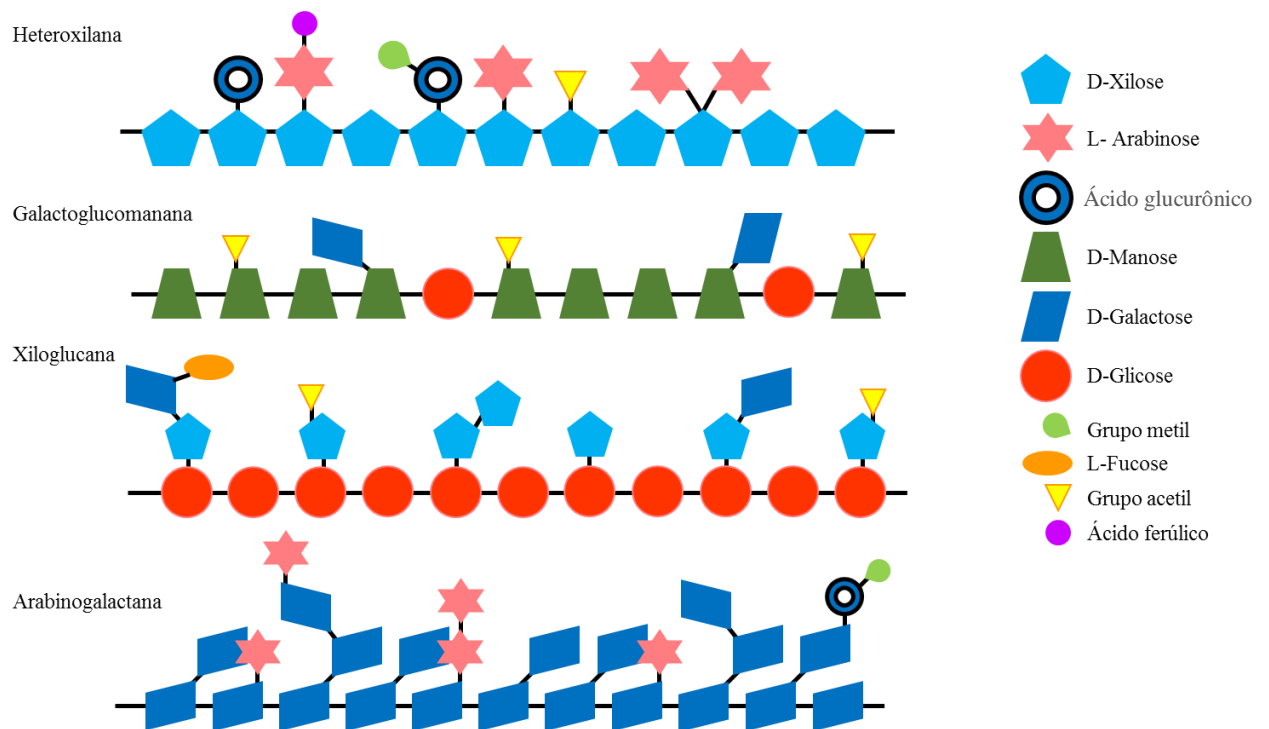
Resíduos agroindustriais	Composição (massa seca em %)					Referência
	<i>Celulose</i>	<i>Hemicelulose</i>	<i>Lignina</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Extrativos</i>	
Bagaço de cana	40-45	21-28	18-25	1-2	1-3	[a], [b], [c]
Bagaço de malte*	12-33	19-42	4-28	1-6	5-10	[d], [e]
Casca de arroz	38-40	23-26	13-15	13-18	-	[f] [g]
Casca de laranja**	11-13	6-12	1-2	1-4	-	[h] [i]
Farelo de aveia	40	20	18	8	-	[j]
Farelo de trigo	31-39	20-23	18-22	0,5-5	10	[k] [l]
Sabugo de milho	35-38	26-29	18-23	5	5-7	[k] [m]

**Fonte:** Elaborado pelo autor. [a] CHANG, et al., 2012. [b] CARDONA et al., 2010. [c] QIU et al., 2012. [d] MUTHUSAMY, 2014. [e] LYNCH, 2016. [f] CHEN et al., 2011. [g] RANJAN & MOHOLKAR, 2013. [h] VERVERIS et al., 2007. [i] RIVAS et al., 2008. [j] PRONYK & MAZZA, 2012. [k] HUANG et al., 2009. [l] CANTERO et al., 2015. [m] ZHANG et al., 2015. \*Segundo Muthusamy (2014) o bagaço de malte pode conter de 20 a 30% de proteína bruta. \*\* Segundo Rivas et al. (2008) cascas de laranjas podem apresentar, em sua composição, em média 50% de pectina.

As hemiceluloses podem ser divididas de acordo com suas características estruturais nos grupos: xilanas, mananas, xiloglucanas,  $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,4-glucanas,  $\beta$ -1,4-galactanas e arabinogalactanas. Os monômeros que compõem esses materiais e que são responsáveis pela variedade de estruturas presentes na natureza são D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-ramnose, L-fucose, ácidos urônicos (glucurônico, galacturônico e metil-galacturônico); em alguns casos, uma das hidroxilas livres dos monossacarídeos pode ser substituída por um grupo acetila (WOODWARD, 1984; EBRINGEROVA et al., 2005; DEUTSCHMAN & DEKKER, 2012; ZHOU et al., 2017). Na **Figura 2** estão representados alguns tipos estruturais de hemiceluloses, e nela é possível observar quais monossacarídeos compõem a cadeia principal e suas ramificações.

As hemiceluloses também podem ser divididas de acordo com o tipo de planta em que ela se encontra. Alguns artigos como Gírio et al. (2010), Deutschmann & Decker (2012), Farhat et al. (2017), Zhou et al. (2017), detalham extensivamente as características desses materiais exibindo suas estruturas, composições e ocorrências na natureza.

**Figura 2:** Representações esquemáticas das estruturas de tipos de hemiceluloses: heteroxilanas, galactoglucomananas (GGM), xiloglucanas e arabinoglactanas, com seus possíveis grupos laterais.



**Fonte:** Elaborado pelo autor baseado em Farhat et al. (2017) e Zhou et al. (2017).

O mais frequente tipo de hemicelulose, presente em plantas de madeira dura e gramíneas, é a xilana, que apresenta uma cadeia principal formada por monômeros de xilose. As xilanas podem ser divididas em homoxilanas (aquelas que não apresentam cadeias laterais/ramificações) e heteroxilanas (aquelas que apresentam ramificações). De acordo com o grupo funcional, substituído na cadeia lateral de heteroxilanas, elas podem ser divididas em glucuronoxilanas, arabinoxilanas, arabinoglucuronoxilanas ou glucuronoarabinoxilanas, cuja diferença entre os dois últimos grupos se dá pela estrutura e quantidade dos grupos funcionais presentes na cadeia lateral (BURLACU et al., 2016; ZHOU et al., 2017). Heteroxilanas *in natura* também apresentam grupos acetila substituídos nos resíduos de xilose, nas posições 2 e/ou 3 (ZHOU et al., 2017).

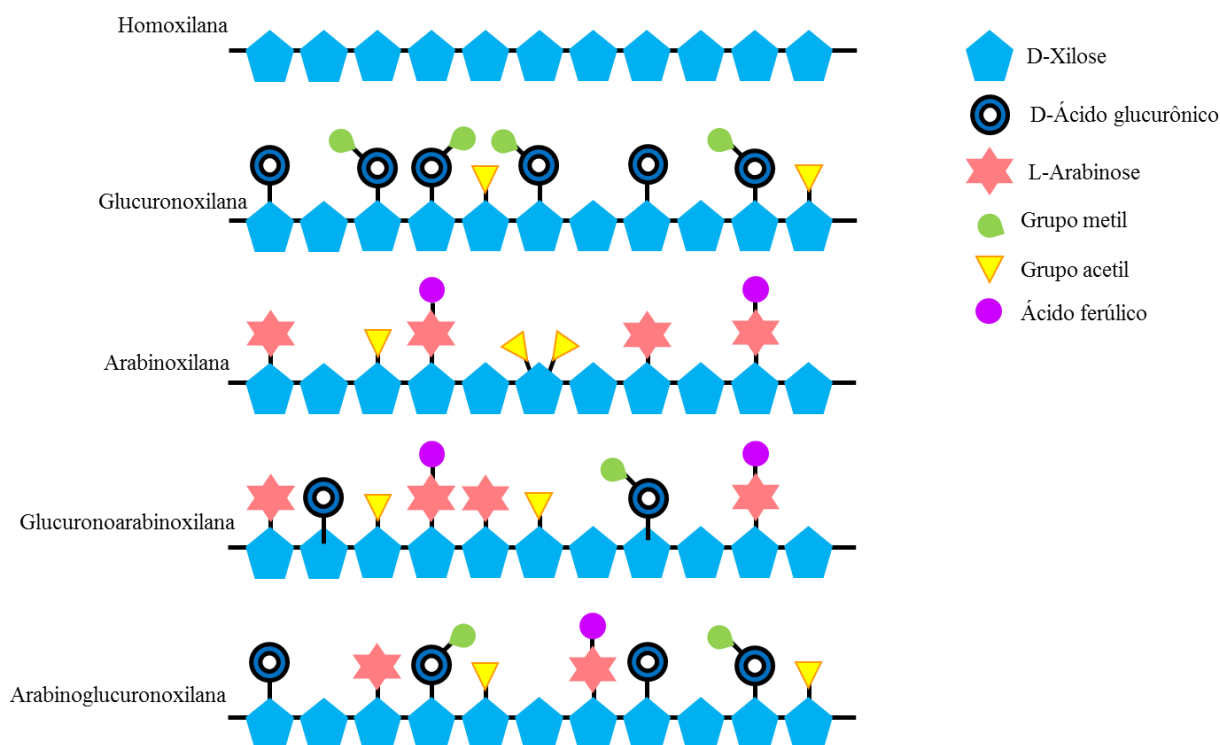
Homoxilanas são polissacarídeos com baixa ocorrência na natureza, podendo ser encontrados em algas marinhas e na casca de alguns tipos de sementes de plantas (EBRINGEROVA & HEINZE, 2000; HEINZE, 2012). Elas são formadas por resíduos de xilose unidos por ligações  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 ou por ambas.

Heteroxilanas são mais frequentes na natureza e representam mais de 90% da composição de xilanas. As glucuronoxilanas são formadas por uma cadeia principal de xilose unidas por

ligações  $\beta$ -1,4, com ramificações no carbono 2 de uma molécula de ácido glucurônico que, muitas vezes, pode ser metilado na posição 4. Cerca de 70% dos resíduos de xilose das glucuronoxilanas são acetiladas nos carbonos 2 e/ou 3. Essa hemicelulose pode se ligar à lignina através de ligações éster com grupos de ácido urônico. Glucuronoxilana é o principal componente da hemicelulose de dicotiledôneas, madeiras duras, estando presente principalmente na parede secundária desse tipo de planta (HEINZE, 2012; FARHAT et al., 2017; ZHOU et al., 2017.). As arabinoxilanas consistem de uma cadeia principal de monômeros de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 que apresentam substituições de arabinoses nas posições  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 nas unidades de xilose. Grupos acetila também podem estar presentes nessa hemicelulose (EBRINGEROVA & HEINZE, 2000; FARHAT et al., 2017).

É bastante frequente a presença de grupos de ácido ferúlico ligados ao carbono 5 dos resíduos de arabinose, os quais promovem a ligação entre a hemicelulose e a lignina (EBRINGEROVA & HEINZE, 2000; FARHAT et al., 2017; ZHOU et al., 2017). No entanto, o ácido ferúlico é um composto fenólico, podendo ser considerado componente das ligninas e não das hemiceluloses (ZHOU et al., 2017). Essa hemicelulose é predominante na casca e nas sementes de alguns cereais como trigo, aveia, arroz, milho, sorgo, cevada e centeio, em alguns tipos de plantas como em *switchgrass* (uma gramínea nativa de países da América do Norte, cujo nome científico é *Panicum virgatum*) e outras herbáceas (EBRINGEROVA & HEINZE, 2000; FARHAT et al., 2017; ZHOU et al., 2017). Arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas apresentam estruturas muito parecidas, constituindo-se de cadeias lineares de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4, e nas ramificações apresentam resíduos de arabinose e ácidos glucurônicos. Entretanto, glucuronoarabinoxilanas apresentam dez vezes mais arabinose do que ácido glucurônico em suas cadeias laterais, enquanto que arabinoglucuronoxilanas são glucuronoxilanas com pequenas concentrações de arabinose (EBRINGEROVA et al., 2005). Esse tipo de hemicelulose é encontrado em coníferas, mas não é o componente hemicelulósico dominante dessa espécie de planta. Também estão presentes na parede celular de tecidos lignificados de gramíneas e cereais (BOCHICCHIO & REICHER, 2003). Na **Figura 3** podem ser visualizadas as possíveis estruturas de xilanas presentes na natureza.

**Figura 3:** Representações esquemáticas das estruturas dos principais tipos de xilanas presente na biomassa lignocelulósica de diferentes espécies e partes de plantas.



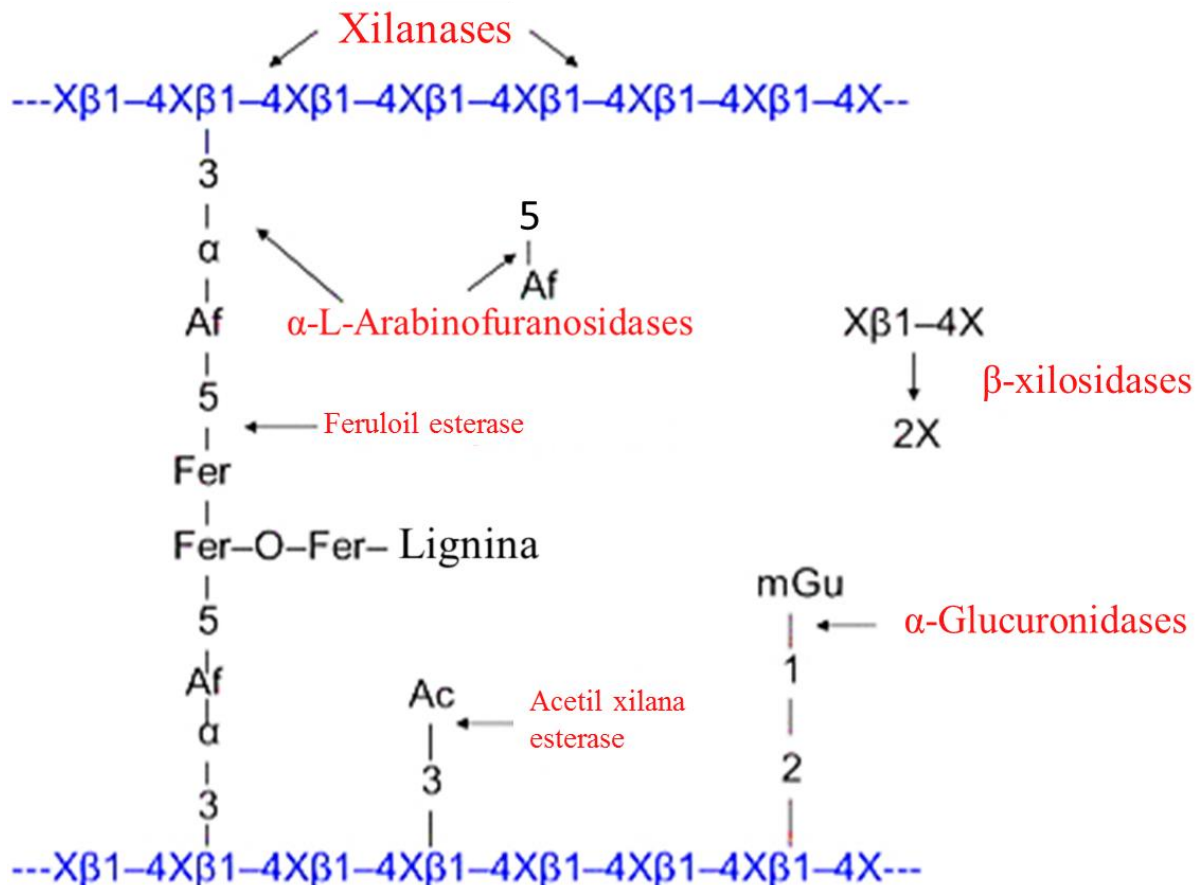
**Fonte:** Elaborado pelo autor baseado em Farhat et al. (2017) e Zhou et al. (2017).

## 2.2 Sistema xilanolítico – $\alpha$ -L-arabinofuranosidases

Heteroxilanas são polissacarídeos com estruturas bastante distintas e ramificadas, como visto anteriormente. Devido à sua complexidade, é necessária a ação de diversas enzimas para a completa degradação dessa macromolécula, pois cada enzima apresenta uma função específica sobre as ligações entre os monômeros que compõem a xilana.

O sistema xilanolítico completo age sobre a molécula de xilana de forma não-aleatória, sendo que as enzimas necessitam do substrato em uma composição estrutural específica para que possam agir (POLIZELI et al., 2005; GÍRIO et al., 2010; BURLACU et al., 2016). Assim, cada enzima atua em um momento, hidrolisando a ligação e liberando um grupo da cadeia principal, facilitando a atividade da próxima enzima (KORMELINK & VORAGEN, 1993; BIELY & PUCHART, 2006; PATEL et al., 2015). A **Figura 4** representa os locais de atuação das enzimas do complexo xilanolítico em uma molécula de heteroxilana.

**Figura 4:** Pontos de hidrólise de enzimas hemicelulolíticas sobre uma molécula de heteroxilana. As enzimas (em vermelho) atuam nas diversas cadeias laterais (em preto) da cadeia principal de xilana (em azul). Assim que as cadeias laterais são desligadas, a cadeia principal de xilana é exposta e se torna mais acessível para clivagem pela xilanase.  $\beta$ -xilosidases clivam xilobiose em monômeros de xilose, e também podem atuar na extremidade da xilana ou de xilo-oligossacarídeos.



**Fonte:** Adaptado de U.S. DOE. (2006)

Esse sistema consiste de:  $\beta$ -1,4-endoxilanases (EC 3.2.1.8) que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal do xilana, liberando xilooligossacarídeos (BIELY, 1985; HOWARD et al., 2003; POLIZELI et al., 2005; COLLINS et al., 2005; GÍRIO et al., 2010); acetila xilana esterases (EC 3.1.1.72), que atuam sobre as ligações dos grupos acetila; feruloil esterases (EC 3.1.1.73) que aceleram a hidrólise das ligações ésteres entre as ramificações de ácidos ferúlicos ligados à arabinoses, nas cadeias laterais da xilana; em seguida atuam as  $\alpha$ -glucuronidases (EC 3.2.1.139) que hidrolisam as ligações do ácido glucurônico com os resíduos de xilose, e as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) que removem os resíduos de L-arabinose substituídos na cadeia principal da xilana (BIELY & PUCHART, 2006; GÍRIO et al., 2010; MATSUZAWA et al., 2015); com isso restam apenas xilo-oligossacarídeos curtos,

não-ramificados, que podem ser hidrolisados pelas  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37) liberando o monossacarídeo xilose como produto final (PRADE, 1995; COLLINS et al., 2005; DODD & CANN, 2010; GÍRIO et al., 2010; BURLACU et al., 2016).

As  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (ABFs) – também denominadas hidrolases de  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeos – são um grupo de enzimas acessórias que apresentam atividade exo e catalisam a hidrólise dos resíduos de arabinose nos terminais não redutores de oligo e polissacarídeos. Elas atuam sobre ligações  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-, e  $\alpha$ -1,5- existentes entre os  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeos e a cadeia principal de polímeros que as contém, como  $\alpha$ -L-arabinanas, arabinoxilana e arabinogalactanas (SAHA, 2000; MATSUMURA et al., 2004; RAVANAL et al., 2010; PÉREZ & EYZAGUIRRE, 2016; CAZY, 2017). Algumas ABFs podem apresentar atividade hidrolítica sobre outros substratos, como reportado por Yang et al. (2015) uma ABF com atividade exo-arabinofuranosidase e endoxilanase.

Outras enzimas também são capazes de liberar arabinoses a partir de polissacarídeos, como por exemplo as endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanases (EC 3.2.1.99) que hidrolisam arabinanas liberando arabino-oligossacarídeos; as exo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanases (EC 3.2.1.-), que liberam as arabinose terminais, a partir de arabinanas ou arabino-oligossacarídeos, mas são inativas contra o substrato sintético  $\rho$ -nitrofenil  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNPAr) (PÉREZ & EYZAGUIRRE, 2016).

### 2.3 Mecanismo de ação – Famílias de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas

A classificação de enzimas em famílias específicas, que catalisam reações envolvendo carboidratos, é descrita em um banco de dados online denominado *Carbohydrate-Active Enzymes* – CAZy, que foi projetado por pesquisadores do *Centre National de la Recherche Scientifique* – CNRS, Bernard Henrissat e colaboradores, na França. Esta plataforma está ativa desde 1998 e nela são apresentadas diversas características genômicas, bioquímicas e estruturais de enzimas que hidrolisam, modificam ou criam ligações glicosídicas. Elas são agrupadas de acordo com similaridades estruturais, catalíticas e de domínios funcionais como o módulo de ligação aos carboidratos (CAZy: <http://www.cazy.org/>). Neste banco de dados as enzimas são divididas em grupos e subgrupos: as famílias são nomeadas com uma sigla de acordo com a classe ou categoria a que pertencem. Existem 6 famílias dentro dessa divisão que são as glicosídeo-hidrolases (GH), glicosil-transferases (GT), polissacarídeo-liases (PL), carboidrato-esterases (CE), as que contém módulo de ligação a carboidrato (CBM) e as que

apresentam atividades auxiliares (AA). Esse código é seguido de um número que reflete a ordem da criação da família dentro do mesmo grupo. Cada família é dividida em subfamílias, nas quais são agrupadas enzimas que apresentam mais similaridade e maior uniformidade na função molecular (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT & BAIROCHI, 1993; HENRISSAT & BAIROCHI, 1996).

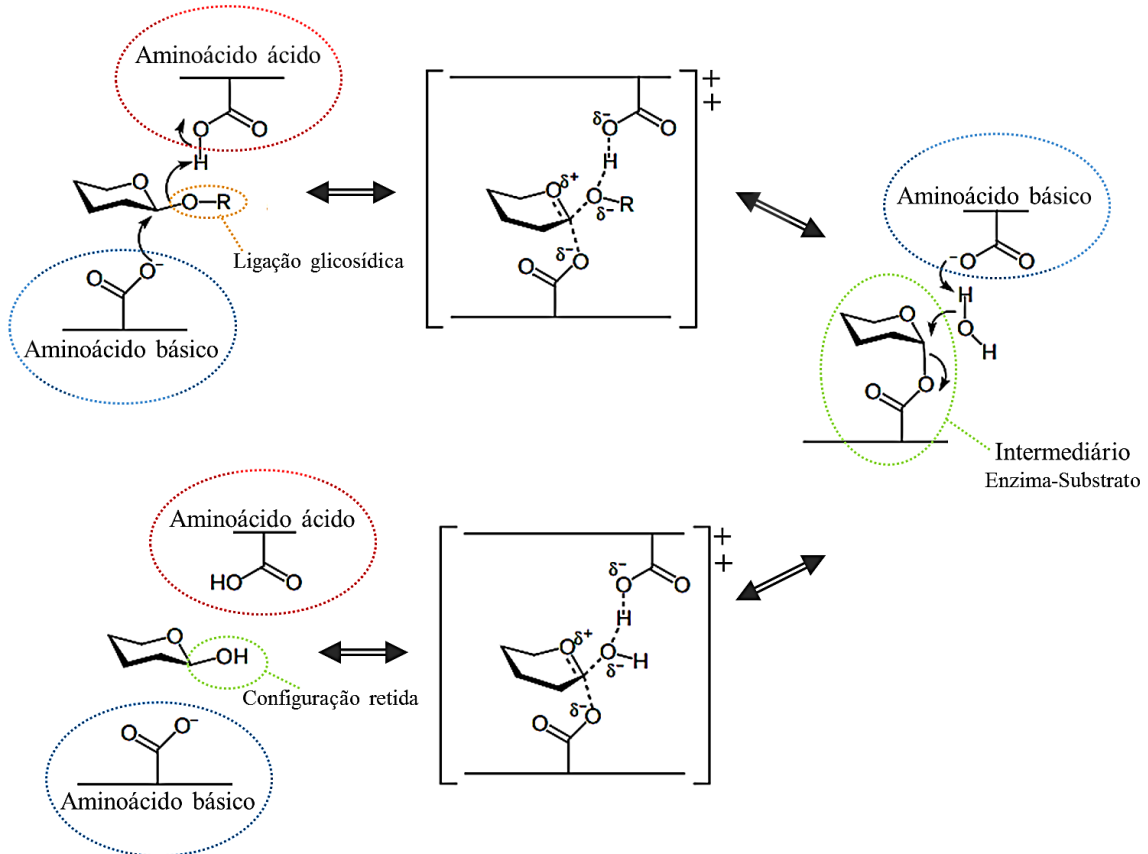
No banco de dados CAZy, as enzimas são ainda organizadas em outro agrupamento – os clãs. Estes são grupos de famílias de proteínas que apresentam associações de estruturas secundárias, característica conservada entre descendentes, e a mesma maquinaria catalítica, semelhanças entre membros de diferentes famílias. Até o momento foram descritos clãs apenas para as glicosídeo-hidrolases e sua nomenclatura se dá com a adição de uma letra à frente da terminação GH, sendo que a letra representa a ordem de definição do clã: ex. GH-A. (CAZy: <http://www.cazy.org/>).

A família das glicosídeo-hidrolases (EC 3.2.1.-), também denominada glicosil-hidrolases, constitui um grupo de enzimas bastante conhecido, as quais hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou a ligação entre um carboidrato e uma parte não carboidrato, levando à formação de um hemiacetal ou hemicetal do açúcar e de sua aglicona correspondente. Elas podem catalisar a hidrólise de ligações entre oxigênios, nitrogênios ou enxofres, e os glicosídeos. A hidrólise da ligação glicosídica ocorre pela catálise geral ácido-base, aplicando dois mecanismos principais de hidrólise: mecanismo de retenção ou de inversão da configuração anomérica. Nos dois mecanismos, ilustrado na **Figura 5**, geralmente a hidrólise requer dois ácidos carboxílicos, que são conservados dentre os membros das famílias de glicosil-hidrolases, e passam por um estado de transição (NUMAN & BOSLE, 2006).

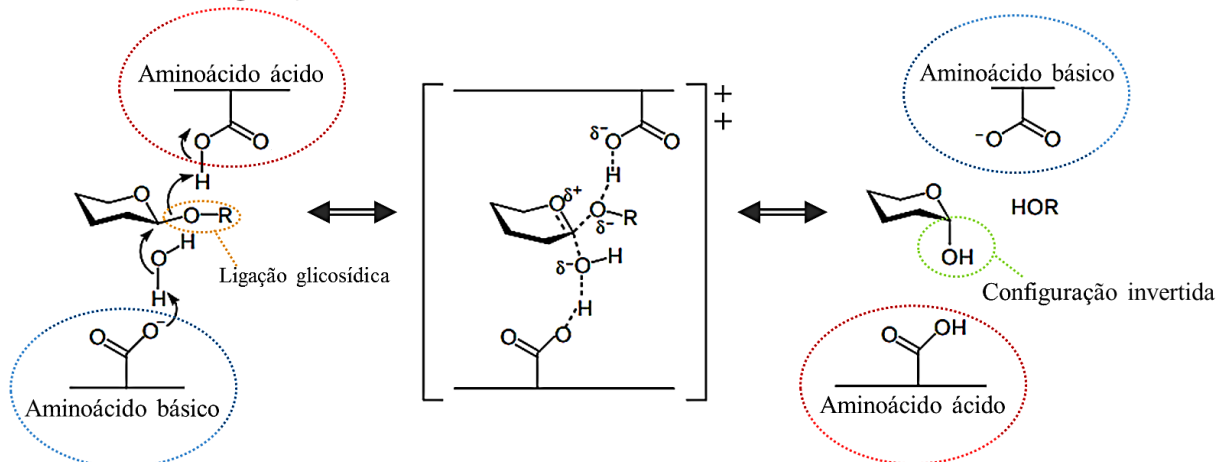
A hidrólise com retenção de configuração, como demonstrado na **Figura 5**, ocorre por deslocamento duplo em dois passos, onde participa o intermediário enzima-substrato: no primeiro passo de reação – a glicosilação – um resíduo nucleófilo ataca o centro anomérico para deslocar a aglicona, formando o intermediário glicosil-enzima, que apresenta configuração anomérica oposta à do substrato. Ao mesmo tempo, o resíduo ácido protona o oxigênio glicosídico fazendo com que a ligação seja clivada. No segundo passo – a deglicosilação – o resíduo ácido-base atua agora como um catalisador básico, desprotonando uma molécula de água, que ataca o centro anomérico do intermediário glicosil-enzima (hidrólise), liberando o açúcar livre e a enzima em sua configuração inicial (KOSHLAND, 1953; RYE & WHITERS, 2000; NUMAN & BOSLE, 2006; DOMINIC, 2013).

**Figura 5:** Mecanismos de hidrólise de glicosidasas.

## Retenção da configuração anomérica



## Inversão da configuração anomérica



**Fonte:** Adaptado de Rye & Whitters (2000).

Na hidrólise de um glicosídeo com inversão da configuração anomérica (**Figura 5**), ocorre um deslocamento único na presença de uma molécula de água e de dois grupos carboxílicos, em que um atua como catalisador básico e o outro ácido. O grupo carboxílico

básico desprotona uma molécula de água, e o OH<sup>-</sup> entra na ligação glicosídica, separando a aglicona que, por sua vez, receberá um H<sup>+</sup> do aminoácido ácido. Assim o glicosídeo sofre uma mudança em sua conformação anomérica (KOSHLAND, 1953; MCCARTER & WITHERS, 1994; RYE & WITHERS, 2000; NUMAN & BOSLE, 2006; DOMINIC, 2013).

A nomenclatura internacional de enzimas criada pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), o *Enzyme Commission number* - EC number - especifica a reação catalisada por uma enzima, ou seja, agrupa enzimas que apresentam a mesma especificidade de substrato e, em alguns casos, o mesmo mecanismo molecular. Já a classificação em famílias as divide de acordo com as características estruturais dessas enzimas (IUBMB: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>; CAZY: <http://www.cazy.org/>).

Assim, com base em similaridades nas sequências de seus aminoácidos, na estrutura primária, no mecanismo de ação e em seus grupos hidrofóbicos, enzimas com atividade ABF podem ser encontradas em seis famílias de glicosídeo-hidrolases: GH 2, GH 3, GH43, GH51, GH54 e GH62 (SHINOZAKI et al., 2015; PÉREZ & EYZAGUIRRE, 2016; CAZY: <http://www.cazy.org/>).

A família GH 2 compreende β-galactosidases (EC 3.2.1.23) de bactérias como as de *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Streptococcus thermophilus*, e da levedura *Kluyveromyces lactis*. Também β-glucuronidase (EC 3.2.1.31) de *Escherichia coli* e de mamíferos, além de endo-β-manosidase de plantas. Recentemente, uma enzima com atividade ABF foi identificada como pertencente à família GH 2 pelos autores Shi et al. (2014) devido ao alinhamento de sua sequência de aminoácidos apresentar alta homologia com uma β-galactosidase/β-glucuronidase pertencente à essa família. Enzimas dessa família atuam pelo mecanismo clássico de retenção de configuração do carbono anomérico, com a formação de um intermediário. Algumas enzimas GH 2 requerem o íon Mg<sup>+2</sup> para sua atividade, sugerindo que este íon, ligado ao sítio ativo da enzima facilite o deslocamento do resíduo ácido/base. Enzimas desse grupo apresentam dois glutamatos como catalisadores ácido base (CAZY: <http://www.cazy.org/>). A estrutura tridimensional revela que essas enzimas apresentam domínio catalítico com uma estrutura do tipo barril-TIM ou barril-α/β<sub>8</sub> (estrutura tridimensional composta por oito hélices do tipo α do lado exterior e oito folhas β paralelas no interior). O sítio ativo das enzimas GH 2 localiza-se no centro do barril, com os dois ácidos glutâmicos separados por aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos em sequência (SHI et al., 2014).

A família GH 3 inclui principalmente β-glicosidases (EC 3.2.1.21) de uma infinidade de fungos e bactérias, e grande variedade de outras atividades como β-xilosidases, 1,3/1,4-β-

glicosidase, exo-1,3/1,4-glucanase, entre outros, que ocorrem em menor proporção, provenientes de micro-organismos e plantas. Diversas enzimas com atividade ABF nessa família, apresentam atividade bifuncional  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\beta$ -D-xilosidase, como relatado por Lee et al. (2003), que purificaram essa enzima a partir de mudas de cevada, e Tateishi et al. (2013), que também isolaram uma ABF bifuncional a partir de tomates, entre outros autores. A comparação da sequência de aminoácidos com a sequência de proteínas do banco de dados indica que essas enzimas são membros da família GH 3. As enzimas dessa família também atuam pelo processo de retenção da configuração anomérica, descrito por Koshland, através da formação de um intermediário enzima-substrato. O sítio ativo consiste de dois subsítios de ligação ao glicosídeo, com um resíduo nucleofílico e outro ácido/base nas extremidades desses subsítios. O catalisador nucleofílico é um resíduo de aspartato, que é uma região bem conservada entre as enzimas dessa família. A localização e o tipo de resíduo ácido/base não são conservados entre os indivíduos. Entre suas características estruturais, enzimas da família GH 3 apresentam grande variedade em arquitetura e arranjos dos domínios, tornando difícil a identificação de uma região conservada no sítio catalítico entre membros dessa família (TATEISHI et al., 2013; CAZY: <http://www.cazy.org/>).

A família GH 43 basicamente é composta por enzimas bifuncionais que apresentam atividade  $\beta$ -xilosidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; outras enzimas que aparecem nesse grupo são as endo- $\alpha$ -L-arabinanases. Essas enzimas são produzidas por diversos organismos como fungos, bactérias e plantas. As ABF pertencentes à esse grupo apresentam atividade sobre diferentes tipos de ligações glicosídicas: algumas separam as arabinoses ligadas à cadeia de xilano por ligações  $\alpha$ -1,2 ou  $\alpha$ -1,3; outras removem a arabinose com ligações tanto  $\alpha$ -1,2 quanto  $\alpha$ -1,3; outras ainda apresentam atividade exo- $\alpha$ -1,5-L-arabinanases (MATSUO et al., 2000; VAN DEN BROEK et al., 2005; BOURGOIS et al., 2007; CAZY: <http://www.cazy.org/>). Enzimas dessa família atuam pelo mecanismo de inversão da configuração anomérica, e apresentam como aminoácido catalítico básico/nucleófilo um aspartato, e ácido/doador de próton, um glutamato. Além desses dois aminoácidos há mais um aspartato que atua no equilíbrio do pKa do aminoácido ácido. Enzimas da família GH 43 são compostas, estruturalmente, por uma  $\beta$  hélice de 5 lâminas. As  $\beta$  hélices apresentam em sua estrutura somente folhas  $\beta$ , e as proteínas desta família apresentam 5 folhas  $\beta$  em forma de lâmina dispostas ao redor de um eixo central. O sítio ativo da enzima se localiza no centro da hélice, em uma depressão profunda por onde passa o substrato. A orientação do substrato varia bastante entre as enzimas dessa família, o que faz com que apresentem especificidades de hidrólise, o

que dá a diversidade desse grupo de enzimas (MATSUO et al., 2000; VAN DEN BROEK et al., 2005; BOURGOIS et al., 2007; CAZY: <http://www.cazy.org/>).

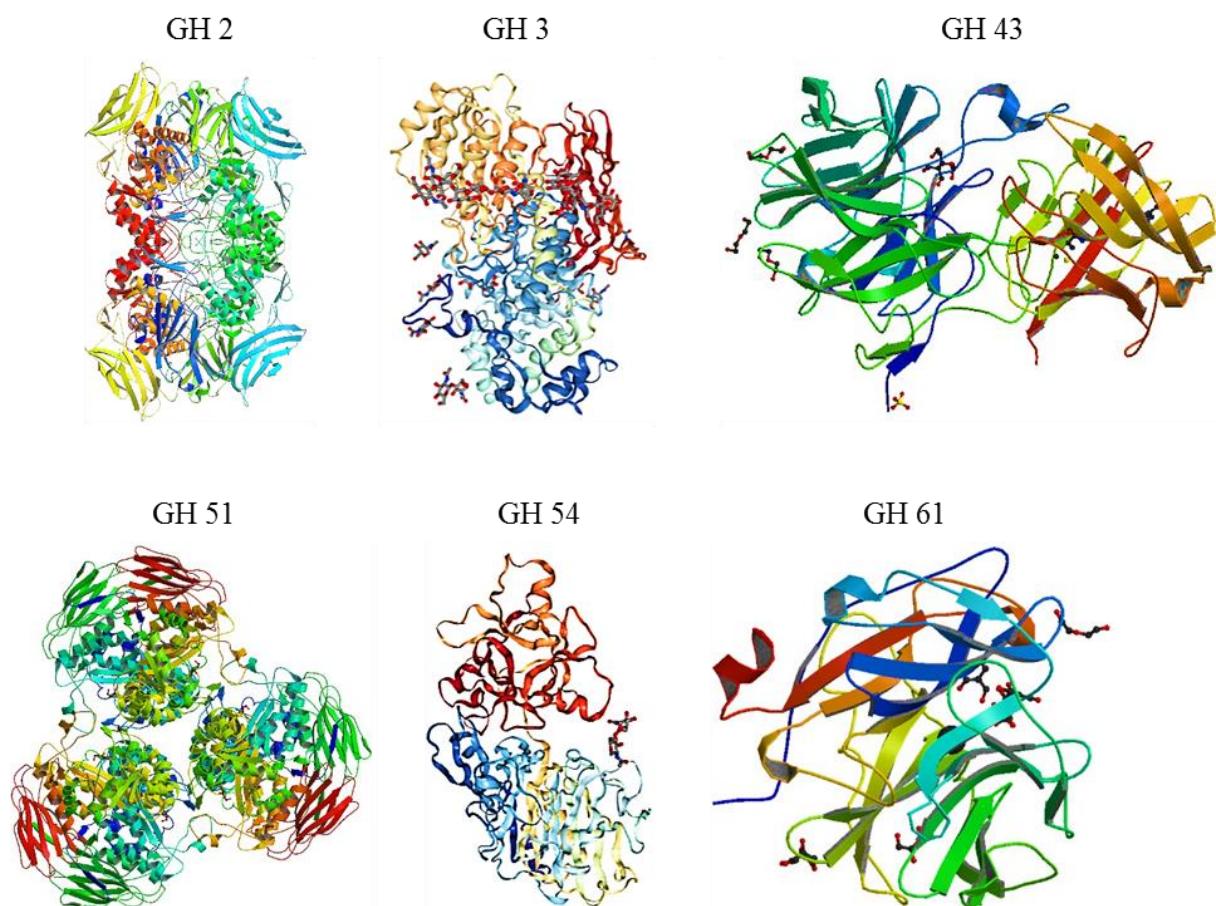
A família 51 é composta principalmente por ABFs, mas também apresenta endoglucanases, xilanases e  $\beta$ -xilosidases. As ABFs dessa família catalisam a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 entre L-arabinofuranosídeos das cadeias laterais de hemiceluloses como arabinoxilanas, arabinogalactanas e L-arabinanas provenientes de bactérias e fungos. Elas atuam pelo mecanismo clássico de Koshland, retendo a configuração anomérica do composto. Os resíduos catalíticos ácido/base são dois glutamatos (SHALLOM et al., 2002; QUISTGAARD & THIRUP, 2009; CAZY: <http://www.cazy.org/>). Poucas enzimas dessa família tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas, porém um trabalho de 2006 descreve a ABF de *Clostridium thermocellum* como um hexâmetro, um trímero de dímeros, em que cada monômero apresenta um domínio catalítico  $(\beta/\alpha)_8$  e um “sanduíche”  $\beta$  de duas folhas  $\beta$  antiparalelas dispostas em oposição uma em relação a outra, de 12 cadeias (TAYLOR et al., 2006).

Os membros da família GH 54 são principalmente ABFs, mas também algumas  $\beta$ -xilosidases, sendo que a maioria é proveniente de fungos. As ABFs desse grupo também catalisam a remoção de ligações  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3, que ocorrem entre arabinoses e arabinanas ou xilanas (YANG, W. et al., 2015). Essas enzimas também atuam pelo método de retenção da configuração anomérica (CAZY: <http://www.cazy.org/>). Apesar de ainda não ser confirmado, dois trabalhos relatam os resíduos catalíticos das ABFs dessa família como sendo um aspartato para o resíduo catalítico ácido e um glutamato como resíduo nucleófilo (MIYANAGA et al., 2004; WAN et al., 2007). Miyanaga et al. (2004) também revelaram a estrutura de uma ABF da família 54 e verificaram que ela apresenta uma estrutura super secundária composta por oito cadeias  $\beta$  dispostas em duas folhas de quatro cadeias antiparalelas.

A família GH 62 é composta exclusivamente por ABFs que apresentam especificidade por ligações  $\alpha$ -1,2 ou  $\alpha$ -1,3 entre L-arabinoses das cadeias de arabinoxilanos, sendo que elas não atuam sobre cadeias de xilano que apresentam ligações  $\alpha$ -1,2 e  $\alpha$ -1,3 com os resíduos de arabinose (YANG, W. et al., 2015; CAZY: <http://www.cazy.org/>). Elas também não atuam sobre substratos inespecíficos, por exemplo, o substrato sintético  $p$ -nitrofenil-arabinofuranosídeo (pNP-Ara). Este é o grupo de ABF que foi menos estudado até o momento, e as enzimas deste grupo foram encontradas tanto em bactéria quanto em fungos (YANG, W. et al., 2015; CAZY: <http://www.cazy.org/>). O mecanismo de ação destas enzimas não é bem conhecido, mas supõe-se que elas atuem pelo mecanismo de inversão da configuração anomérica do substrato, sem formação de intermediário, devido à homologia da sequência

destas enzimas com as da família GH 43. Ambos os grupos estão classificados no Clã F, que são agrupamentos de enzimas que apresentam o mesmo mecanismo catalítico e a mesma estrutura catalítica (CAZY: <http://www.cazy.org/>). Além disso, as ABFs da família 62 apresentam em sua estrutura proteica uma estrutura super secundária com 5 folhas  $\beta$  antiparalelas, muito similares às pertencentes à família GH 43, confirmando a classificação de ambas no clã GH-F (PÉREZ & EYZAGUIRRE, 2016; WILKENS et al., 2016; CAZY: <http://www.cazy.org/>). Supõe-se que o resíduo catalítico ácido dessa família seja um aspartato, enquanto o básico é um glutamato (MAEHARA et al., 2014; WANG et al., 2014). A **Figura 6** ilustra alguns exemplos de enzimas de todas as famílias de ABFs.

**Figura 6:** Estruturas tridimensionais representativas de glicosil hidrolases das famílias GH 2, GH 3, GH 43, GH 51, GH 54 e GH 61.



**Fonte:** Protein data bank <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>

Assim, de acordo com as características estruturais e catalíticas que as enzimas das diferentes famílias apresentam, as ABFs tem sido agrupadas no Clã A – famílias GH 2, GH 3,

e GH 51, no Clã B – família GH 54, e no Clã F – famílias GH 43 e GH 62 (CAZY: <http://www.cazy.org/>).

Além disso, ABFs tem sido classificadas em três tipos de acordo com sua especificidade à substratos: ABFs do tipo A catalisam a hidrólise preferencialmente de arabinooligossacarídeos e não são ativas sobre polímeros; as do tipo B são ativas em ambos, arabinooligossacarídeos e polímeros ramificados; o terceiro tipo, denominado arabinofuranohidrolases de arabinoxilanas (AXH) são especificamente ativas sobre as ligações arabinosídicas em arabinoxilanas (SAHA, 2000; SHINOZAKI et al., 2015). Apenas as ABFs do tipo A e B atuam sobre o substrato sintético pNP-Ara (SHINOZAKI et al., 2015)

### 2.3.1 Sequenciamento de $\alpha$ -arabinofuranosidases – composição de aminoácidos

Centenas de análises completas de sequências de aminoácidos de ABFs têm sido descritas no banco de dados de sequências de proteínas e informações funcionais - o UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Na **Tabela 2** estão relacionados alguns micro-organismos que tiveram suas ABFs sequenciadas. As ABFs de fungos e bactérias geralmente apresentam entre 300 e 700 aminoácidos, porém ABFs muito menores e muito maiores já foram descritas, como é o caso das ABFs de *Enterobacter cloacae* com 97 aminoácidos, *Paenibacillus* sp. com 74 aminoácidos, *Streptomyces scabiei* com 67 aminoácidos, *Bifidobacterium adolescentes* com 1.269 aminoácidos, *Dorea longicatena* com 1.550 aminoácidos e *Streptomyces acidiscabies* com 1.698 aminoácidos (SAHA, 2000; UniProt: <http://www.uniprot.org/>). As sequências e os tipos de aminoácidos de cada uma dessas ABFs também são descritas nessa plataforma.

### 2.3.2 Massa molecular e subunidades estruturais de $\alpha$ -arabinofuranosidases

A massa molecular de ABFs é bastante variável. Dentre os micro-organismos relacionados na **Tabela 2**, há ABFs com massa molecular pequenas como a de *Aspergillus awamori* e de *Penicillium chrysogenum* com 32 kDa (PANAGIOTOU et al., 2003; ZIETSMAN et al., 2011) e muito grandes como as isoformas I e II isoladas de *Fusarium oxysporum* com 180 e 200 kDa, respectivamente (SHINOZAKI et al., 2014). No geral, a maioria das ABFs apresentam massa molecular entre 35 e 90 kDa; a menor ABF descrita foi isolada de *Ruminiclostridium thermocellum* apresentando massa molecular de 14,74 kDa (AHMED et al., 2013) e a maior ABF foi isolada de *Streptomyces purpurascens* com massa molecular de 495 kDa (KOMAE et al., 1982).

**Tabela 2:** Características de algumas  $\alpha$ -arabinofuranosidasas de micro-organismos.

Micro-organismo	Família GH	Bifuncionalidade	Atividade	Produtos	Inibidor	M.M. (kDa)	K <sub>m</sub> * (mM)	pI	Atividade ótima		Ref.
									pH	T (°C)	
<b><i>Bactérias</i></b>											
<i>Bacillus</i> sp.	GH 43	—	Exo	Arabinose	—	55,0	10,6 mg/mL	7,4	—	—	[1]
<i>Bacillus subtilis</i>	GH 51	—	Endo e Exo	Arabinoheptaose	—	59,5 (x6)	—	—	—	35	[2]
<i>Bifidobacterium longum</i>	GH 51	—	Endo	Arabinopiranosse Arabinofuranose	—	64,0 (x4)	0,29	—	6,0	45	[3]
<i>Clostridium stercorarium</i>	GH 43	—	Exo	Arabinose	—	52,0 (x4)	—	—	5,0	70	[4]
<i>Geobacillus caldoxylolyticus</i>	—	$\beta$ -D-xilosidase	Exo	Arabinose	—	59,0 (x4)	0,17	—	6,0	75	[5]
<i>Paenibacillus</i> sp.	GH 51	Endoxilanase $\beta$ -D-xilosidase	Endo e Exo	Arabinose Xilose XOS <sup>1</sup>	—	—	0,31	—	6,5	60	[6]
<i>Pseudomonas cellulosa</i>	GH 51	—	Endo e Exo	Arabinose AOS <sup>2</sup>	—	57,0	0,18	—	5,5	—	[7]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	GH 62	—	Exo	Arabinose	—	—	1,90	—	5,5	30	[8]
<i>Streptomyces</i> sp.	GH 51	—	Exo	Arabinose	—	45,3	—	—	6,0	50	[9]
<i>Thermobacillus xylanilyticus</i>	GH 51	—	Exo	Arabinose	—	56,0	0,50	—	5,6	75	[10]
<i>Thermotoga marítima</i>	GH 51	—	Exo	Arabinose	—	55,3 (x6)	—	—	6,0	90	[11]

Tabela 2: continuação.

Micro-organismo	Família GH	Bifuncionalidade	Atividade	Produtos	Inibidor	M.M. (kDa)	K <sub>m</sub> * (mM)	pI	Atividade ótima		Ref.
									pH	T (°C)	
<b><i>Arqueas</i></b>											
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	—	β-D-xilosidase	Exo	Arabinose	Glicose e arabinose	82,0 (4x)	—	—	6,5	80	[12]
<b><i>Fungos</i></b>											
<i>Kuraishia capsulata</i>	—	—	Exo	Arabinose	—	72,0 (x4)	—	—	6,0	50	[13]
<i>Aspergillus awamori</i>	GH 54	—	Exo	Arabinose	Glicose	32,0	—	—	3,5	55	[14]
<i>Aspergillus niger</i>	GH 51	—	Exo	Arabinose	—	65,3	0,93	—	4,0	50	[15]
<i>Aspergillus terreus</i>											
Isoenzima I	—	—	Exo	Arabinose	Glicose	90,0	0,35	—	5,0	60	[16]
Isoenzima II						82,0	0,47	—	5,0	50	
Isoenzima III						78,5	0,31	—	5,5	65	
<i>Fusarium oxysporum</i>											
Isoenzima I	—	—	Exo	Arabinose	—	180,0	0,39	6,0	6,0	55	[17]
Isoenzima II						200,0	0,28	7,1	6,0	50	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	GH 43	—	Exo	Arabinose	—	32,0	—	—	5,0	50	[18]
<i>Penicillium purpurogenum</i>	GH 51	Galactosidase	Exo	Arabinose Galactose	—	70,0	0,098	5,3	5,0	60	[19]
<i>Penicillium purpurogenum</i>	GH 43	Xilobiohidrolase	Exo	Arabinose Xilose	—	47,5	0,65	—	5,0	50	[20]

Tabela 2: continuação.

Micro-organismo	Família GH	Bifuncionalidade	Atividade	Produtos	Inibidor	M.M. (kDa)	K <sub>m</sub> * (mM)	pI	Atividade ótima		Ref.
									pH	T (°C)	
<i>Talaromyces funiculosus</i>	GH 62	—	Exo	Arabinose	—	37,1	—	4,6	2,6	40	[21]
Isoenzima I									4,5	40	
Isoenzima II									2,8	50	
<i>Talaromyces thermophilus</i>	—	β-xilosidase	Exo	Arabinose Xilose	—	35,0	0,77	—	6,0	55	[22]
<i>Trichoderma koningii</i>	GH 54		Exo	Arabinose	—	50,0	0,31	—	3,0	30	[23]
<i>Trichoderma reesei</i>	—	—	Exo	Arabinose	—	53,0	0,90	—	4,0	60	[24]
<i>Ustilago maydis</i>	GH 62	—	Exo	Arabinose	—	67,8	7,5	—	5,0	37	[25]

**Fonte:** Elaborado pelo autor. \*Valor de K<sub>m</sub> verificado utilizando-se o substrato p-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo. [1] VALLS et al., 2016; [2] HOFFMAM et al., 2013; [3] MARGOLLES & DE LOS REYES-GAVILÁN, 2003; [4] SCHWARZ et al., 1995; [5] CANAKCI et al., 2007; [6] BOURAOUI et al., 2016; [7] BEYLOT et al., 2001; [8] MAEHARA et al., 2014; [9] KURAKAKE et al., 2014; [10] DEBECHE et al., 2000; [11] MIYAZAKI, 2005; [12] MORANA et al., 2007; [13] YANAI & SATO, 2000; [14] ZIETSMAN et al., 2011; [15] ALIAS et al., 2011; [16] LE CLINCHE et al., 1997; [17] PANAGIOTOU et al., 2003; [18] HINOZAKI et al., 2014; [19] FRITZ et al., 2008; [20] RAVANAL et al., 2010; [21] DE LA MARE et al., 2013; [22] GUERFALI et al., 2011; [23] WAN et al., 2007; [24] NOGAWA et al., 1999; [25] SIGUIER et al., 2014.

As ABFs com massas moleculares elevadas geralmente apresentam mais de uma subunidade proteica em sua estrutura quaternária. A maior parte das ABFs descritas são monoméricas e apresentam massas moleculares menores que 90 kDa, mas elas podem se apresentar na forma de dímeros (2), trímeros (3), tetrâmeros (4), hexâmeros (6) e octâmeros (8) (SCHWARZ et al., 1995; YANAI & SATO, 2000; MARGOLLES & DE LOS REYES-GAVILÁN, 2003; MIYAZAKI, 2005; CANAKCI et al., 2007; MORANA et al., 2007; HOFFMAM et al., 2013). As subunidades de uma ABF podem ser diferentes entre si – o que define um heterodímero – ou podem ser idênticas – homodímero. Grande parte das ABFs multi-subunitárias apresentam subunidades idênticas entre si (SCHWARZ et al., 1995; YANAI & SATO, 2000; MIYAZAKI, 2005; HOFFMAM et al., 2013).

#### 2.4 $\alpha$ -Arabinofuranosidases – distribuição microbiana e propriedades moleculares

Na literatura há relatos de ABFs produzidas por plantas, fungos, bactérias e arqueas, dentre eles, alguns micro-organismos termófilos, no entanto, a grande maioria das ABFs isoladas até o momento são provenientes principalmente de bactérias e fungos filamentosos (**Tabela 2**). Os micro-organismos são os recursos preferidos para a produção de enzimas em geral, por apresentarem maior facilidade de manipulação e obtenção dessas enzimas. Isso se dá, pois, a maioria das ABFs isoladas são secretadas pelo micro-organismo para o meio extracelular, e em menor quantidade, isoladas a partir da membrana celular, da parede celular, do citoplasma (intracelular) e outras membranas (SAHA, 2000). Dentre os fungos filamentosos, o maior número de ABFs descritas é proveniente de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (SAHA, 2000).

Para as células, as ABFs possuem função metabólica e fisiológica, sendo uma das enzimas acessórias mais importantes para a degradação das cadeias laterais de hemiceluloses, participando sinergicamente com outras hemicelulases da degradação desses polissacarídeos. Essa degradação permite que as células utilizem os oligo/monossacarídeos formados para sua nutrição (LEE & LEE, 2014). A maioria das ABFs são enzimas indutivas, ou seja, sua produção depende da presença de um substrato específico no meio de cultura, diferentemente das enzimas constitutivas (SAHA, 2000). Segundo alguns estudos revisados por Vries & Visser (2001) o principal indutor da produção de ABFs é o L-arabitol, álcool formado pela redução de uma molécula de arabinose. Assim o micro-organismo produz ABF para quebra de hemiceluloses para sua nutrição (SAHA, 2000; SHINOZAKI et al., 2014).

Algumas ABFs são bifuncionais, com atividade catalítica na hidrólise de outras ligações diferentes das  $\alpha$ -L-arabinoses como, por exemplo, atividade  $\beta$ -xilosidase, atuando nas extremidades de cadeias de xilanas ou sobre as ligações de xilo-oligossacarídeos, liberando monômeros de xilose nesse processo (SAHA, 2000; LEE et al., 2003; CANAKCI et al., 2007; MORANA et al., 2007; RAVANAL et al., 2010; BOURAOUI et al., 2016). Outras atuam como endoxilanase hidrolisando as ligações internas de polímeros de xilana, produzindo xilo-oligossacarídeos (BOURAOUI et al., 2016). ABFs também podem apresentar atividade  $\beta$ -glicosidase (LUONTERI et al., 1995; MORANA et al., 2007; FRITZ et al., 2008; AMORE et al., 2012) galactosidase (LEE et al., 2003; FRITZ et al., 2008) e manase (FRITZ et al., 2008; GUERFALI et al., 2011) em menor proporção nas células.

Além disso, as ABFs podem apresentar atividade exo ou endo-arabinofuranosidase, sendo que as primeiras atuam sobre as extremidades não redutoras de resíduos de arabinose, geralmente presentes nas cadeias laterais de polissacarídeos, mas também podem agir sobre as arabinoses terminais de polímeros de arabinose; as que apresentam atividade endo-arabinofuranosidase, atuando sobre oligo ou polímeros de arabinose, produzindo oligossacarídeos menores de arabinose (SAHA, 2000; BEYLOT et al., 2001; PANAGIOTOU et al., 2003; RAVANAL et al., 2010; BOURAOUI et al., 2016).

ABFs apresentam diversidade de propriedades catalíticas (SAHA, 2000). Como podemos verificar na **Tabela 2**, o pH ótimo de ABFs de bactérias, que ficam em torno de 5,0 a 6,0, é em geral levemente maior do que o pH ótimo para ABFs de fungos, que é de 4,0 a 5,5, mais ácidas. No entanto, Guais et al. (2010) e De La Mare et al. (2013) isolaram ABFs de duas linhagens diferentes de *Penicillium funiculosum* com pH ótimos de 2,6 e 2,8, respectivamente, meio bastante ácido. Diversas ABFs com pH ótimo em meio alcalino também foram descritas, como a de *Thermonospora fusca* com pH ótimo de 9,0, e a de *Bacillus subtilis* com pH ótimo de 8,0 (TUNCER & BALL, 2003; INÁCIO et al., 2008)

Quanto à temperatura ótima, a maioria dos fungos produz ABFs que toleram temperaturas maiores ou iguais 50 °C, mas essa característica não é definitiva, sendo variável mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Essa característica depende, principalmente, do local de isolamento, cujas condições o micro-organismo está adaptado, assim como sua maquinaria proteica (MIYAZAKI, 2005). No entanto, ABFs microbianas em geral apresentam uma ampla variedade de temperaturas ótimas, com média entre 45 e 60 °C. ABFs com temperatura ótima menores e maiores já foram descritas, como a de *Cellvibrio japonicus* com temperatura ótima de 27 °C, e a de *Pseudothermotoga thermarum* com temperatura ótima de 95 °C (PROCTOR et al., 2005; XIE et al., 2016)

#### 2.4.1 Estabilidade de $\alpha$ -arabinofuranosidases

A estabilidade de ABFs ao pH varia bastante conforme a espécie produtora da enzima, mas geralmente elas permanecem estáveis, com mais de 50% da atividade inicial, em pH de 4,0 a 8,0 (NOGAWA et al., 1999; YANAI & SATO, 2000; ALIAS et al., 2011; DE LA MARE et al., 2013; KURAKAKE et al., 2014). Existem as ABFs que apresentam alta estabilidade em pH muito baixos, de 1,5 a 3,0 (UESAKA et al., 1978; WAN et al., 2007; CULLETON et al., 2014) e também aquelas que apresentam alta estabilidade em pH bastante alcalinos, de 10,0 a 12,0 (KAJI & SHIMOKAWA, 1984; DEBECHE et al., 2000; KURAKAKE et al., 2014; BOURAOUI et al., 2016).

A termoestabilidade é uma característica importante para a maioria dos processos biotecnológicos. Mais da metade das ABFs isoladas apresentam estabilidade superior a 80% de atividade residual, entre 45 e 60 °C, em 24 horas de incubação nessa faixa de temperatura. Algumas ABFs são estáveis a temperaturas superiores a 80 °C, mas a maioria delas é proveniente de organismos termófilos (SCHWARZ et al., 1995; DEBECHE et al., 2000; MIYAZAKI, 2005; MORANA et al., 2007; CANAKCI et al., 2007).

Alguns trabalhos verificaram também a manutenção e estocagem de ABFs por períodos superiores a um mês e relataram estabilidade da atividade enzimática em quase 100%, quando mantidas a temperaturas entre 0 e 5 °C (DE IOANNES et al., 2000; EL-GINDY & SAAD, 2003).

A estabilidade a solventes orgânicos, especialmente ao etanol, também é uma característica importante para enzimas, principalmente aquelas relacionadas com a produção de etanol de 2º geração. Proteínas em geral não são tolerantes à solventes orgânicos, pois estes sequestram parte da água livre que poderia participar da hidrólise. A ausência de água livre também afeta na conformação da proteína, rompendo pontes de hidrogênio de sua estrutura quaternária, afetando o sítio ativo e prejudicando sua ligação ao substrato (KARAN et al., 2012). No entanto, sob determinadas concentrações, a presença desses agentes no meio reacional altera a polaridade do meio, o que pode aumentar a solubilidade de substratos e estabilizar a conformação da enzima, ativando sua atividade catalítica e aumentando seu rendimento em produto (ROMERO et al., 2012). São poucos os trabalhos que descrevem a tolerância de enzimas a etanol, e são menos ainda os que testaram a influência deste solvente sobre ABFs. Grande parte das proteínas tolerantes ao etanol descritas, são provenientes de micro-organismos isolados de processos da indústria do álcool e do vinho. Na literatura, podemos encontrar trabalhos que verificaram a tolerância ao etanol de  $\beta$ -glicosidases (ZIETSMAN et al., 2011; KARNAOURI et al., 2013),  $\beta$ -xilosidase (ROMERO et al., 2012)

ABFs (ZIETSMAN et al., 2011; MICHLMAYR et al., 2011), entre outras (KARAN et al., 2012).

A estabilidade à salinidade também é uma característica desejável para alguns processos biotecnológicos. De modo semelhante ao comportamento das enzimas em solventes orgânicos, os íons salinos sequestram as moléculas de água ao redor das proteínas, interferindo nas ligações intermoleculares de hidrogênio e altas concentrações desses íons podem causar prejuízos à solubilidade, estabilidade e ligações de proteínas (KARAN et al., 2012). Proteínas não-halofílicas geralmente não tem habilidade de competir com os íons salinos pela hidratação, o que aumenta as interações hidrofóbicas e interfere nas interações eletrostáticas das macromoléculas, causando agregação ou repulsão e colapso da estrutura terciária da proteína. Com isso ocorre a perda de atividade enzimática devido à desestruturação tridimensional (OREN, 2002; KARAN et al., 2012). Porém, algumas enzimas apresentam em sua superfície um número maior de aminoácidos carregados, especialmente resíduos ácidos, o que faz com que elas apresentem estabilidade ou aumento de sua atividade enzimática na presença de sais. Em enzimas halofílicas por exemplo, há uma grande quantidade de resíduos de glutamato, que aumenta a capacidade da enzima de se ligar às moléculas de água. Os aminoácidos ácidos das proteínas se ligam aos cátions hidratados mantendo a camada de hidratação com redução da hidrofobicidade e facilitando a repulsão eletrostática da molécula, prevenindo assim a agregação das proteínas sob altas concentrações salinas (OREN, 2002; KARAN et al., 2012). Diversas enzimas que apresentam halotolerância já foram descritas como  $\alpha$ -amilases (AYGAN et al., 2008), xilanases (WANG et al., 2016) entre outras (KARAN et al., 2012), porém a maioria das enzimas com propriedades halofílicas são provenientes de organismos extremófilos halofílicos ou halotolerantes (OREN, 2002).

#### 2.4.2 Purificação de $\alpha$ -arabinofuranosidases

A purificação de proteínas permite a separação da enzima de interesse das demais proteínas e outras substâncias presentes no extrato bruto ou no filtrado enzimático, sendo assim um procedimento importante para a elucidação das propriedades da enzima. Para isso, é necessária a utilização de diferentes métodos bioquímicos de purificação que se baseiam em propriedades das proteínas, como carga iônica, tamanho molecular, afinidades a outras moléculas, entre outros, para separá-las dos demais constituintes do meio.

Várias técnicas de purificação podem ser utilizadas para separar proteínas em geral, e as ABFs têm sido separadas por esses métodos, como visualizado na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Condições experimentais de purificação de algumas  $\alpha$ -arabinofuranosidases de micro-organismos.

Micro-organismo	Método de Purificação	Gene Clonado	M.M. (kDa)	$K_m^*$ (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{mol. min}^{-1}$ )	Íons** Inibidores	Ref.
<i>Aspergillus niger</i>	Gene expresso em <i>Aspergillus nidulans</i> Cromatografia de exclusão molecular: resina Superdex G-75 e Cromatografia de troca iônica: resina Source 15Q, ambas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0.	AbfB	60	—	—	—	I
<i>Aspergillus niveus</i>	Gene expresso em <i>Aspergillus nidulans</i> Cromatografia de troca iônica: resina DEAE-Fractogel em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Cromatografia de exclusão molecular: resina Sephadex G-100 Superfine em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,0.	abfA	88,6	—	—	—	II
<i>Aspergillus oryzae</i>	Gene superexpresso em <i>A. oryzae</i> Cromatografia de troca iônica: Resource Q. Gradiente de NaCl 0-500 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,2. Cromatografia de exclusão molecular: resina Superose 12 em tampão acetato 50 mM com 150 mM NaCl.	abfA	55 (x4)	—	—	—	III
<i>Aspergillus vadensis</i>	Gene superexpresso em <i>A. vadensis</i> Cromatografia de afinidade: resina Polyhistidine-tagged. Gradiente de imidazol 10-500 mM em tampão imidazol 10 mM, HEPES 10 mM (ácido sulfônico) e NaCl 500 mM, pH 7,5.	abfB	53	—	—	—	IV

Tabela 3: continuação.

Micro-organismo	Método de Purificação	Gene Clonado	M.M. (kDa)	K <sub>m</sub> * (mM)	V <sub>máx</sub> (μmol. min <sup>-1</sup> )	Íons** Inibidores	Ref.
<i>Aspergillus sojae</i>	Precipitação com sulfato de amônio 40-80% Cromatografia de troca iônica: resina Macro-Pep High Q. Gradiente de NaCl 0-1,0 M em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5. Cromatografia de exclusão molecular: resina Sephacryl S-200 HR em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 com 0,1 M NaCl. Cromatografia multimodal: resina Bio gel HPT. Gradiente de tampão fosfato de sódio 10-100 mM pH 6,8. Cromatografia de troca iônica: resina Macro-Pep High Q. Gradiente de NaCl 0-0,5 M em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.	—	34	—	—	Mn <sup>+2</sup> EDTA	V
<i>Chaetomium</i> sp.	Precipitação com sulfato de amônio 40-50% Cromatografia de troca iônica: resina Q-sepharose. Gradiente de NaCl 0-125mM em tampão Tris HCl 20 mM pH 9,0. Cromatografia de exclusão molecular: resina Sephacryl S-100 HR em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0.	—	52	1,43	68,3	Hg <sup>+2</sup>	VI
<i>Humicola insolens</i>	Gene expresso em <i>Pichia pastoris</i> Cromatografia de afinidade: resina Ni <sup>2+</sup> -NTA Agarose Gradiente de Imidazol (20-400 mM) em tampão Tris-HCl 50mM, 500 mM NaCl, pH 7,6	Hiabf43	50	1,55	103,0	Ag <sup>+</sup> SDS	VII

Tabela 3: continuação.

Micro-organismo	Método de Purificação	Gene Clonado	M.M. (kDa)	K <sub>m</sub> * (mM)	V <sub>máx</sub> (μmol. min <sup>-1</sup> )	Íons** inibidores	Ref.
<i>Streptomyces</i> sp.	Precipitação com acetona fria (-20 °C) por duas vezes	—	31	—	—	—	VIII
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Precipitação com sulfato de amônio 60% Cromatografia de troca iônica: resina Q-sepharose. Gradiente de NaCl 0-0,5 M em tampão fosfato 20 mM pH 8,0. Cromatografia de exclusão molecular: resina Sephacryl S-200 em tampão fosfato pH 7,0 Cromatografia de troca aniônica (FPLC): resina Mono-Q-Sepharose. Gradiente de NaCl 0-0,5 M em tampão fosfato 20mM pH 8,0.	—	35	0,77	—	Zn <sup>+2</sup> Cu <sup>+2</sup> Hg <sup>+2</sup> EDTA SDS	IX
Biblioteca metagenômica de compostos microbianos	Screening funcional Gene expresso em <i>Escherichia coli</i> Cromatografia de afinidade: resina HisTrap HP Ni <sup>+2</sup> (Polyhistidine-tagged) em tampão fosfato de sódio 20 mM pH7,4 com 500 mM Na Cl e 500 mM de imidazol. Cromatografia de exclusão molecular: Superdex 200 em tampão PBS pH 7,4.	coxyl43	36	2,60	—	Cu <sup>+2</sup> Zn <sup>+2</sup> DMSO Etanol	X

**Fonte:** Elaborado pelo autor. \*Valor de K<sub>m</sub> verificado utilizando-se o substrato p-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo. \*\* Íons e substâncias inibidores da atividade enzimática à mais de 50% da atividade controle. [I] GONÇALVES et al., 2012; [II] DAMÁSIO et al., 2012; [III] MATSUMURA et al., 2004; [IV] CULLETON et al., 2014; [V] KIMURA et al., 1995; [VI] YAN et al., 2012; [VII] YANG, X. et al., 2015; [VIII] KURAKAKE et al., 2014; [IX] GUERFALI et al., 2011; [X] MATSUZAWA et al., 2015.

Geralmente, o primeiro passo do processo de purificação pode ser um fracionamento do filtrado enzimático, separando as proteínas em diferentes frações de acordo com a solubilidade de cada uma. Kimura et al. (1995), Guerfali et al. (2011) e Yan et al. (2012) utilizaram a técnica de fracionamento de proteínas aplicando diferentes concentrações de sulfato de amônio à solução, para primeiramente separar as ABFs da maioria das proteínas presentes. Com a adição do sal no meio, sua concentração aumenta, sequestrando as moléculas de água que estão ao redor das moléculas de proteína, reduzindo assim a solubilidade das proteínas, que precipitam, pelo fenômeno de *salting out*. Kimura et al. (1995) utilizaram uma faixa de concentração de 40 a 80% para precipitar a ABF presente no filtrado do cultivo de *Aspergillus sojae*; já Yan et al. (2012) aplicaram um fracionamento com sulfato de amônio sobre o filtrado de cultura de *Chaetomium* sp., precipitando a ABF na faixa de 40 a 50%. Guerfali et al. (2011) recuperaram a ABF produzida por *Talaromyces thermophilus* do precipitado resultante da adição de 60% de sulfato de amônio (**Tabela 3**). Outro tipo de fracionamento que tem sido utilizado na purificação de ABFs, é com o uso de solventes orgânicos. Kurakake et al. (2014) utilizaram acetona para precipitar a ABF produzida por *Streptomyces* sp. O solvente orgânico reduz a solubilidade das proteínas por apresentar constante dielétrica menor que a da água, fazendo com que as enzimas precipitem. Porém esses solventes devem ser aplicados sob baixas temperaturas, pois nessa condição não afetam a estrutura quaternária das proteínas (KURAKAKE et al., 2014). No trabalho de Kurakake et al. (2014) foi utilizada a precipitação com acetona à -20 °C por duas vezes, pois na primeira separação duas proteínas foram precipitadas, mas na segunda precipitação ocorreu a separação das duas, isolando a ABF (**Tabela 3**). A etapa de fracionamento pode ser importante para separar algumas proteínas que precipitam daquelas que não precipitam, facilitando as próximas etapas de purificação e removendo alguns contaminantes do filtrado enzimático.

Outra etapa fundamental, que tem sido utilizada no processo de purificação de ABFs é a diálise, pois é a técnica que prepara a amostra para os passos subsequentes da purificação. Esta técnica consiste na adição do filtrado enzimático, ou da amostra contendo a proteína de interesse, em um saco semipermeável, com pequenos poros que permitem a passagem de água e íons, mas não de proteínas. Com isso, é possível trocar o solvente da amostra ou diminuir a concentração dos solutos na solução de proteína sem perda da enzima. Apesar de não ter sido mostrado na **Tabela 3**, todos os trabalhos citados, que purificaram ABFs, utilizaram pelo menos um passo de diálise, seja na remoção de sais, seja na troca de tampão da solução proteica.

O método mais eficiente de purificação de proteínas é a cromatografia. Essa técnica tem sido utilizada há mais de 100 anos e conta com as diferenças nas propriedades das proteínas

presentes em uma suspensão proteica, como cargas iônicas, tamanho, afinidade de ligação, entre outras, para separá-las entre si. A cromatografia mais frequentemente utilizada é a cromatografia em coluna, que se caracteriza por um tubo contendo uma resina (fase estacionária), pela qual passa uma solução contendo as proteínas (fase móvel) do topo à base da coluna. Nessa passagem, a fase móvel irá interagir com a fase estacionária de acordo com as características da resina de separação. Kimura et al. (1995), Matsumura et al. (2004), Guerfali et al. (2011), Damásio et al. (2012) e Yan et al. (2012) utilizaram como primeira etapa de cromatografia, na purificação de ABFs, a troca iônica. Esta técnica se baseia na diferença entre a carga elétrica da superfície da resina e as cargas elétricas líquidas das proteínas. A resina é formada por partículas esféricas, compostas por polímeros que apresentam trocadores aniônicos ou catiônicos, dependendo da sua composição, trocando cátions e ânions na sua superfície, respectivamente. A coluna é equilibrada com tampão para que a resina seja carregada com as cargas contrárias à sua carga e as proteínas, quando carregadas contrariamente e aplicadas na coluna, competem com essas cargas pela ligação à resina. Na purificação de ABFs têm sido utilizadas diferentes condições de purificação com a cromatografia de troca iônica, mas nos trabalhos recentes a maioria utiliza resinas de troca aniônica como DEAE, Q-sepharose, Macro-Pep High Q sepharose, entre outras, na presença de tampões com pH entre 5,5 e 9,0 (KIMURA et al., 1995; MATSUMURA et al., 2004; GUERFALI et al., 2011; DAMÁSIO et al., 2012; YAN et al., 2012). Nesses casos, as ABFs carregadas negativamente, permanecem ligadas, enquanto outras proteínas passam pela coluna sem interagir, por apresentarem a mesma carga da resina. Posteriormente, foi aplicada em todos os trabalhos citados, uma solução gradiente de NaCl, que apresenta força iônica maior que a da proteína, quando ocorreu o desligamento das ABFs, aumentando sua pureza na solução enzimática final (KIMURA et al., 1995; MATSUMURA et al., 2004; GUERFALI et al., 2011; DAMÁSIO et al., 2012; YAN et al., 2012). Em alguns casos, a troca iônica pode ser utilizada nas etapas finais da purificação de ABFs, como feito por Gonçalves e colaboradores (2012), aplicando a cromatografia de troca iônica como um refinamento das etapas anteriores; os autores utilizaram a resina Source 15Q, também aniônica, em pH 5,5 (GONÇALVES et al., 2012). Em outros casos, a cromatografia de troca iônica pode ser utilizada mais de uma vez sobre a mesma solução proteica geralmente variando-se o pH da fase móvel para melhorar a ligação entre a ABF e a resina, como descrito por Kimura et al. (1995), que primeiro aplicaram uma troca aniônica em pH 5,5 e depois de outras cromatografias, aplicaram novamente uma aniônica, mas dessa vez com pH 7,0 quando purificaram a ABF de *Aspergillus sojae*. Guerfali et al. (2011) usaram duas cromatografias de

troca aniônica em uma solução enzimática contendo ABF, mas mantiveram o pH 8,0 em ambas, apenas trocando a resina utilizada em cada processo (**Tabela 3**).

A técnica de cromatografia mais utilizada na separação de proteínas é a cromatografia de exclusão molecular, que as separam de acordo com o tamanho molecular. Na cromatografia de exclusão molecular, também denominada filtração em gel, a resina é formada por partículas poliméricas, porosas, de tamanhos específicos para a passagem de proteínas com tamanhos determinados. Assim, as moléculas maiores saem primeiro, enquanto as menores percorrem todos os poros da resina, o que faz com que elas saiam tardiamente. Quase todos os trabalhos revisados neste item, utilizaram a cromatografia de exclusão molecular na purificação de suas respectivas ABFs. A resina de exclusão molecular deve ser escolhida de acordo com o tamanho aproximado da enzima de interesse, pois cada resina apresenta faixa específica de tamanhos. Gonçalves et al. (2012) que utilizaram a resina Superdex G-75, que separa proteínas com massa molecular entre 3 e 70 kD, para purificar uma ABF com massa de 60 kD. Como eles conheciam o tamanho da ABF recombinante e utilizaram essa técnica como primeira etapa da purificação, conseguiram separar a ABF de grande parte das impurezas do meio já nessa etapa (GONÇALVES et al., 2012). Geralmente, essa cromatografia é utilizada como etapa final de purificação, pois a solução já se apresenta livre de outros contaminantes que possam interferir na passagem das moléculas pelos poros da matriz. Damásio et al. (2012), utilizaram resina Sephadex G-10 para purificar uma ABF com 88,6 kDa; Matsumura et al. (2004), resina Superose 12 (resolução entre 1 e 300 kDa) para uma ABF de 220 kDa; Yan et al. (2012), resina Sephacryl-100 para uma ABF de 52 kDa; e Matsuzawa et al. (2015), resina Superdex 200 para uma ABF de 36 kDa. Estes autores utilizaram a cromatografia de exclusão molecular como última etapa de purificação. Já Kimura et al. (1995) e Guerfali et al. (2011) utilizaram essa técnica em uma etapa intermediária, com resina Sephacryl-200 para uma ABF de 34 kDa e uma Superdex 200 para uma ABF de 36 kDa, respectivamente (**Tabela 3**).

Outros tipos de cromatografia podem ser utilizados na purificação de proteínas, explorando outras propriedades dessas moléculas como, por exemplo, a cromatografia de interação hidrofóbica na qual a resina interage com a hidrofobicidade da proteína. A cromatografia de afinidade é um outro tipo de técnica, que se baseia na afinidade da enzima com o grupo químico presente nas partículas da resina. Essa técnica também tem sido utilizada para purificar ABFs, pois é bastante específica para tipos particulares de glicoproteínas. A cromatografia de afinidade tem sido utilizada com mais frequência após clonagem do DNA e sequenciamento genômico, que facilitam o processo de purificação. A utilização, a especificidade e a qualidade dos materiais de cromatografia de afinidade tem aumentado, para

purificar principalmente enzimas recombinantes (CULLETON et al., 2014; YANG, X. et al., 2015; MATSUZAWA et al., 2015). A purificação por cromatografia de afinidade de proteínas recombinantes pode ser facilmente realizada, quando as proteínas são manipuladas para a inclusão de uma sequência de peptídeos – denominada cauda – a qual se ligará especificamente às partículas da resina que a reconhecem (CULLETON et al., 2014; MATSUZAWA et al., 2015). Assim, a proteína permanece ligada enquanto os demais constituintes do meio passam pela coluna. A eluição da proteína ocorre com a diminuição do pH do meio, com a utilização de um ligante competitivo (por exemplo gradiente de tampão imidazol) ou proteases que farão a hidrólise da ligação entre a enzima e o ligante presente na resina (CULLETON et al., 2014; YANG, X. et al., 2015; MATSUZAWA et al., 2015). No caso de proteínas com cauda de polihistidina utilizada nos trabalhos de Culleton et al. (2014), Yang, X. et al. (2015) e Matsuzawa et al. (2015), às proteínas são adicionadas 4 a 10 resíduos de histidina que se ligam à íons metálicos das resinas, e as enzimas com a cauda de histidina possuem maior afinidade a esses íons. A resina de ácido nitrilotriacético – Ni-NTA – utilizada no trabalho de Yang, X. et al. (2015), é uma resina de afinidade carregada com íons de níquel que atraem para si proteínas contendo sequência de polihistidina (**Tabela 3**).

## 2.5 Aplicações de $\alpha$ -arabinofuranosidases – da agricultura à medicina

As ABFs são enzimas versáteis que apresentam propriedades bioquímicas bastante amplas, o que permite a utilização destas em diversos ramos da biotecnologia. A crescente demanda por processos mais eficientes e menos poluidores tem aumentado a busca por reagentes “limpos”, com baixo impacto ambiental e que atuem com maior rendimento. As hemicelulases começaram a ser utilizadas há mais de 50 anos na indústria de alimentos, seguidos da indústria têxtil e de papel e celulose. Atualmente, elas apresentam diversos ramos de aplicação e, especialmente as ABFs podem ser aplicadas na agricultura, na degradação de materiais hemicelulósicos, no desenvolvimento de fármacos, na indústria de alimentos e na nutrição, na produção de polpa de papel e ainda na medicina (NUMAN & BHOSLE, 2006). Em muitas aplicações, as ABFs, por serem enzimas acessórias, são importantes pela sua ação sinérgica com outras enzimas do complexo xilanolítico, pois muitas vezes enzimas com ação endo – como as xilanases – ou com ação exo – como as  $\beta$ -xilosidases – não conseguem acessar o seu substrato, devido a presença de ramificações de arabinose (NUMAN & BHOSLE, 2006).

Na indústria de alimentos, as ABFs são bastante utilizadas no processamento de frutas, vegetais e cereais, pois, juntamente com outras enzimas hemicelulolíticas, como as xilanases, arabinanases e as pectinases, atuam na quebra dos polissacarídeos presentes no filtrado e no suco de maceração. As ABFs atuam sobre as arabinoses laterais  $\alpha$ -1,3 presentes nas hemiceluloses, liberando assim polímeros não ramificados, que precipitam. Porém a atuação das arabinanases, e em alguns casos, a presença de ABFs que atuem sobre as cadeias poliméricas, auxilia na clarificação do sumo e degrada os precipitados (vd VEEN et al., 1991; LUONTERI et al., 1995; NUMAN & BHOSLE, 2006). Outra aplicação das ABFs dentro desse setor é na indústria de vinhos. As ABFs atuam na fabricação dessa bebida pois auxiliam na liberação de terpenóis – compostos aromáticos responsáveis pela aromatização dos vinhos. Esses compostos se localizam na casca da uva onde estão de forma livre, aromática, ou ligados à uma molécula de açúcar (forma não-aromática). Geralmente esse açúcar é uma arabinose, o que confere às ABFs a função de hidrolisar a ligação, liberando o terpeno para sua forma aromática, o que por sua vez, irá aumentar o aroma do vinho, aumentando assim sua qualidade de mercado. Enzimas que apresentem tolerância ao etanol podem ser aplicadas nesse ramo da indústria alimentícia (GUNATA et al., 1990; NUMAN & BHOSLE, 2006).

ABFs podem ser aplicadas também na produção de pães. A aplicação de enzimas que não degradam o amido, mas que atuam sobre outros polissacarídeos da massa, realizam a hidrólise destes, e permitem assim o melhoramento da qualidade do pão e as propriedades nutricionais da massa (POUTANEN, 1997). Mais especificamente, os arabinoxilanos da farinha de trigo absorvem a água presente na massa, reduzindo a maciez do pão e aumentando a sua viscosidade, o que atrapalha o crescimento da massa e acelera o endurecimento do pão (NUMAN & BHOSLE, 2006; BUTT et al., 2008). A aplicação de enzimas xilanolíticas na massa do pão, proporciona a clivagem dessas pentosanas, diminuindo seu grau de polimerização, e permitindo que a água seja redistribuída para o glúten e para o amido (NUMAN & BHOSLE, 2006; BUTT et al., 2008). Com isso, a massa cresce com maior volume e o pão, depois de pronto, envelhece/endurece mais lentamente. Assim a adição de xilanases e ABFs na panificação, aumenta a qualidade do pão, o tempo de prateleira, o volume e a estrutura do miolo (POUTANEN, 1997; NUMAN & BHOSLE, 2006; BUTT et al., 2008)

Outra aplicação das ABFs no ramo alimentício é na fabricação de ração animal. Como a base da alimentação de frangos e porcos é a ração, composta principalmente por material lignocelulósico, estes animais apresentam um tempo de digestão mais prolongado. Com a utilização de celulasas, pectinases e hemicelulasas muitas vezes a solubilização não é suficiente, pois as enzimas glicosídicas não conseguem acessar as regiões da cadeia ramificada. Com a

adição de ABFs, que atuarão sobre essas ramificações, as enzimas glicosídicas acessam as ligações alvo e promovem a solubilização do material, facilitando assim a digestão e o maior aproveitamento do alimento pelos animais (SHALLOM et al., 2002; NUMAN & BHOSLE, 2006). Muitas vezes, a utilização de um caldo enzimático, livre de toxinas, contendo o complexo xilanolítico e enzimas pectinolíticas, é suficiente para o melhoramento da qualidade da alimentação animal (BEZALEL et al., 1993; LUONTERI et al., 1995; NUMAN & BHOSLE, 2006).

ABFs podem ser aplicadas também na produção de xilo-oligossacarídeos (XOS). Esses são oligômeros com baixo grau de polimerização, formados por cadeias curtas de xilose, não ramificadas. Eles podem ser utilizados como prebióticos, substâncias que favorecem o crescimento de bactérias da flora intestinal humana – os probióticos. Os XOS podem ser produzidos quimicamente, mas o uso de enzimas xilanolíticas é mais eficaz, pois elas atacam diretamente as ligações internas da cadeia polissacarídica, quebrando o polímero em cadeias menores, de 2 a 5 xiloses. Nesse contexto, as ABFs atuam em cooperação com as xilanases, hidrolisando as ramificações de arabinose, preparando o açúcar para a atuação das xilanases (NUMAN & BHOSLE, 2006; BRIENZO et al., 2010; CHAPLA et al., 2012). Em alguns casos, arabinoxilo-oligossacarídeos podem ser formados pela ação de ABFs com atividade endo, que atuam sobre as moléculas de arabinana (NUMAN & BHOSLE, 2006; GUERFALI et al., 2011). O consumo de XOS na dieta humana confere diversas vantagens ao organismo, pois promove o crescimento dos micro-organismos que são benéficos à saúde. Os XOS podem ser utilizados em alimentos, bebidas lácteas ou ingeridos na forma de capsulas (CHAPLA et al., 2012; NUMAN & BHOSLE, 2006).

A arabinose pode ser utilizada como um adoçante de baixo teor calórico, devido ao sabor doce que apresenta, com baixa absorção pelo organismo humano. Além disso, ela inibe seletivamente a absorção de sacarose, de maneira não competitiva, quando ingerida ao mesmo tempo, o que permite a redução do índice glicêmico, prevenindo e tratando a hiperglicemia após as refeições em pacientes diabéticos e inibindo a obesidade. Nesse ramo de aplicação, as ABFs se fazem extremamente necessárias para a aplicação destas em substratos ricos em arabinoses, para que elas possam atuar na liberação desses monômeros (SERI et al., 1996; NUMAN & BHOSLE, 2006).

Na indústria de polpa de papel, as ABFs podem ser aplicadas aumentando a eficiência das soluções de xilanases, facilitando a deslignificação da polpa. As ABFs atuam sobre as hemiceluloses, liberando os resíduos de arabinose que muitas vezes impedem a ação das enzimas do branqueamento, o que permite a remoção da lignina ligada às hemiceluloses. Para

que essas enzimas possam atuar de maneira eficiente nesse processo, é necessário que elas apresentem alta estabilidade a temperaturas elevadas, em pH alcalino e ausência de atividade celulolítica (MATSUMURA et al., 2004; MAKKONEN & NAKAS, 2005; NUMAN & BHOSLE, 2006)

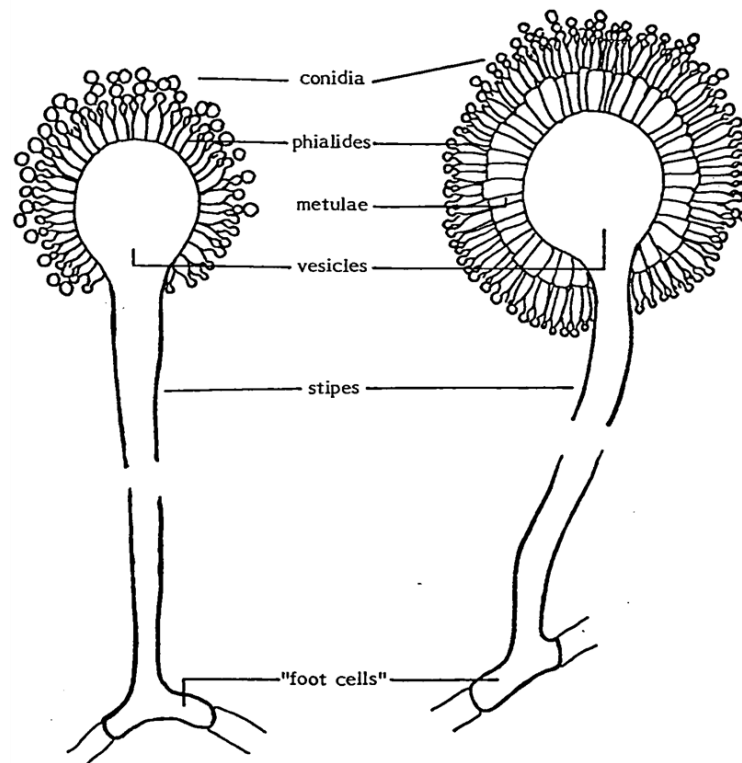
Nos últimos anos, o estudo da aplicação de ABFs na hidrólise de resíduos lignocelulósicos tem aumentado bastante, com o objetivo de produção de bioetanol. Como esses materiais são ricos em hemiceluloses, compostos não fermentescíveis, eles não podem ser aproveitados pelas células fermentadoras de etanol, sendo acumulados no meio ambiente ou queimados para a produção de energia elétrica nas indústrias (SAHA, 2000; NUMAN & BHOSLE, 2006). Como será descrito no **item 2.7**, para o reaproveitamento eficiente do material lignocelulósico na fermentação para produção de etanol, primeiramente ele deve sofrer um pré-tratamento para liberar o acesso às enzimas lignocelulolíticas. Como já visto anteriormente, a matriz lignocelulósica é bastante complexa, sendo necessário a atuação de diversas enzimas em conjunto para a eficiente conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Assim, as ABFs com capacidade de degradar biomassa, se tornam fundamentais para o processo de sacarificação das paredes celulares e fibras de resíduos florestais e agrícolas. Isso resulta na produção de monômeros de açúcares para a fermentação por micro-organismos capazes de utilizar pentoses e resistentes à altas concentrações de etanol. Além da produção de etanol, a sacarificação de polissacarídeos também permite a obtenção de diversos produtos químicos como, por exemplo, o xilitol (FERNÁNDEZ-ESPINAR et al., 1994; SAHA, 2000; PROCTOR et al., 2005; NUMAN & BHOSLE, 2006; GÍRIO ET AL., 2010; YANG, W. et al., 2015; PÉREZ & EYZAGUIRRE, 2016)

## 2.6 O gênero *Aspergillus* e a espécie *Aspergillus hortai*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são pertencentes ao filo *Ascomycota*, classe dos *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*. O gênero foi primeiramente catalogado e nomeado pelo padre italiano Micheli em 1729. As espécies desse gênero podem ser encontradas em uma grande variedade de ambientes; eles são, principalmente, fungos decompositores no solo, em alimentos e restos orgânicos em geral. Algumas espécies são parasitas de insetos, plantas e animais, sendo que algumas podem causar patologias em humanos. Outras espécies são economicamente importantes na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica/química (KLICH & PITT, 1998; BENNETT, 2010).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são anamórficos e produzem conídios assexuados em estruturas características do gênero, os conidióforos denominados aspergillum, que estão representados na **Figura 7**. Durante a diferenciação micelial algumas células se ampliam e desenvolvem uma espessa parede celular, formando as células podais, em forma de T ou L, e a partir delas se formam os conidióforos perpendiculares à essas células. O conidióforo se desenvolve ereto a partir do ramo de hifas, que aumenta em sua extremidade, formando uma vesícula arredondada, elíptica ou em forma de taco. Essa vesícula dá origem às métulas e fiálides, que por sua vez, produzem longas cadeias de esporos mitóticos – os conídios. Todas essas estruturas apresentam características específicas, quando cultivadas em um mesmo meio de cultura, como, tamanho, arranjo, formato do conidióforo e dos conídios, bem como a coloração, o que permite a diferenciação e classificação das espécies.

**Figura 7:** Características de conidióforos específicos de *Aspergillus*.



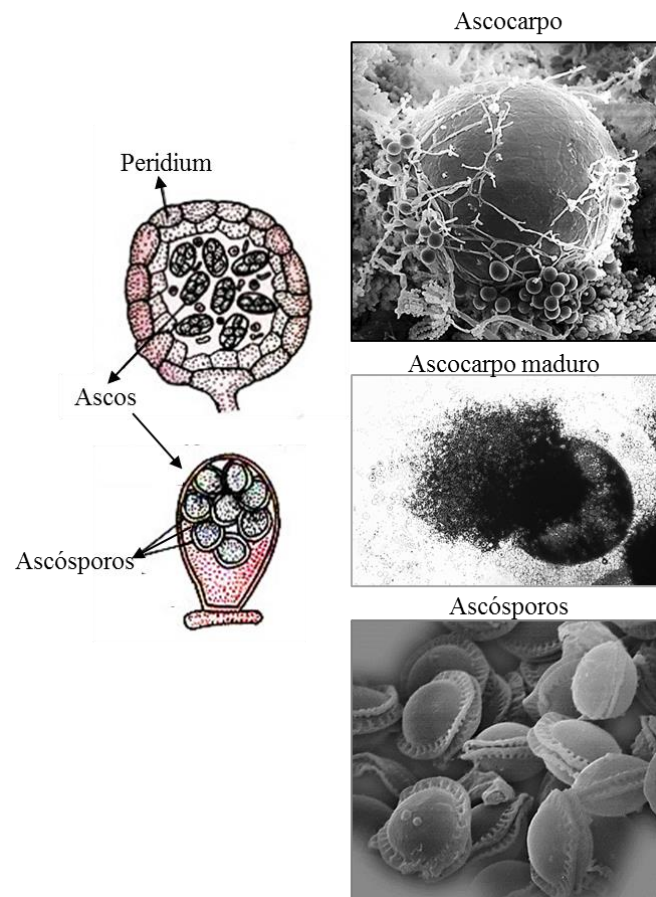
**Fonte:** Klich & Pitt (1998).

Algumas espécies apresentam uma fase sexual, com a visualização dos teleomorfos das espécies, o que permite, juntamente com o sequenciamento de DNA e outras características bioquímicas, a classificação desse gênero no filo Ascomycota (KLICH & PITT, 1998; BENNETT, 2010). Na fase teleomórfica de *Aspergillus*, ocorre a formação dos ascocarpos do

tipo cleistotécios, que é o corpo frutificante característico do gênero, e nele se desenvolvem os ascos de onde são liberados os ascósporos, as células haplóides (**Figura 8**).

Existem mais de 200 espécies de *Aspergillus* descritas, dentre elas, a espécie *Aspergillus hortai*, uma espécie descrita por Samson et al. (2011). Até a data da identificação, essa espécie vinha sendo classificada como *Aspergillus terreus*. Porém os autores utilizaram uma abordagem polifásica para a identificação e diferenciação de linhagens da espécie *A. terreus*, sequenciando genes codificadores de  $\beta$ -tubulinas e calmodulinas, e de regiões ITS, além de análises macro e micromorfológicas e de extrólitos, o que permitiu a distinção de *A. hortai* ao nível de espécie (SAMSON et al, 2011). Segundo os autores, *A. hortai* apresenta grande semelhança morfológica com *A. terreus*, porém o perfil de extrólitos produzidos é bastante distinto.

**Figura 8:** Estruturas sexuais de *Aspergillus*. À esquerda, representação de um corte de cleistotécio maduro cercado pelo perídium, ascos e ascósporos do gênero. À direita, micrografias de cleistotécios e ascósporos de *Aspergillus nidulans*.



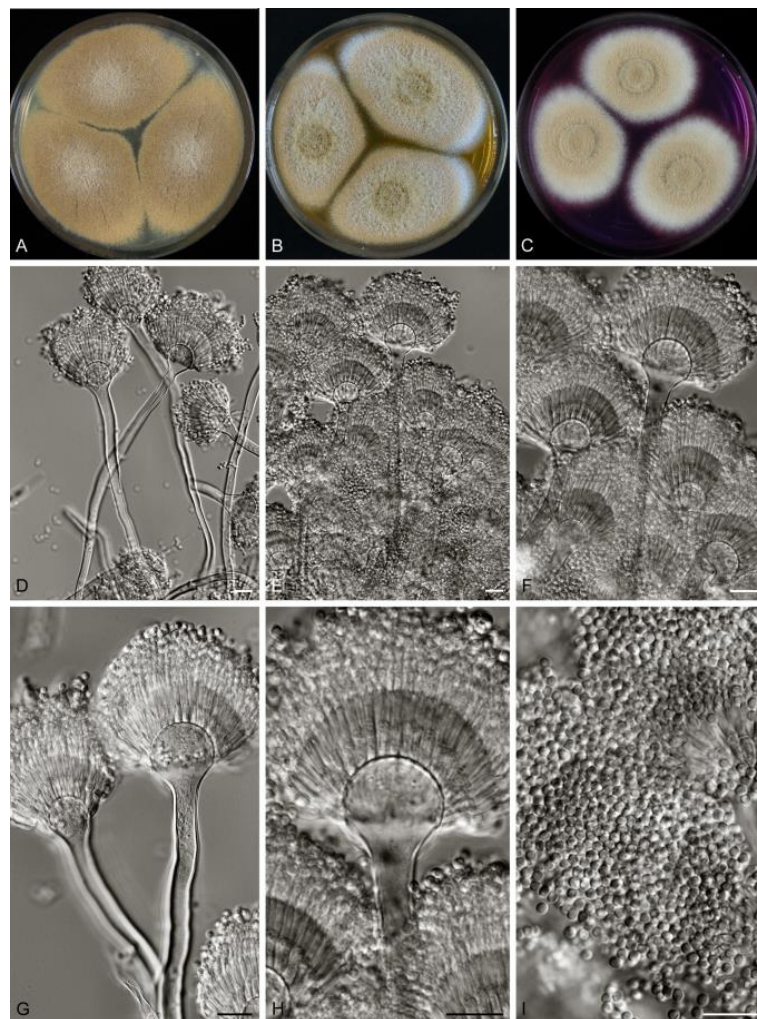
**Fonte:** *Aspergillus & Aspergillosis Website – [www.Aspergillus.org.uk/](http://www.Aspergillus.org.uk/)*

Na **Figura 9** podem ser visualizadas as estruturas morfológicas de *A. hortai*. Essa linhagem se caracteriza por apresentar cabeças conidiais colunares e de tonalidade castanho a marrom. Os extrólitos produzidos pelas linhagens de *A. hortai* utilizadas na identificação, foram

acetilcarnitina, butirolactonas, citrinina, ácido-3-metil-orselínico, terreína e terrequinona A; destes, a única micotoxina é a citrinina (SAMSON et al., 2011).

*A. hortai* é um fungo cosmopolita, frequentemente isolado de regiões tropicais e subtropicais de solos, materiais orgânicos, e de produtos agrícolas como milho, cevada e amendoim. As linhagens utilizadas por Samson et al. (2011) foram isoladas de solo da Ilha de Galápagos (Equador), solo na Flórida (EUA), e uma delas, a mais antiga, foi isolada da orelha de um paciente de um hospital no Rio de Janeiro (Brasil).

**Figura 9:** Fotografias e micrografias de estruturas de *Aspergillus hortai*. A, B e C: colônias incubadas a 25 °C por 7 dias nos meios CYA, MEA e CREA, respectivamente. D, E, F, G, H e I: conidióforos e conídios (escala de 10 µm).



**Fonte:** Samson et al. (2011)

Como mencionado anteriormente, diversos fungos do gênero *Aspergillus* são utilizados para a obtenção de produtos da indústria de alimentos e de ração animal, entre outras diversas

aplicações. Eles são bastante utilizados devido à sua alta capacidade fermentativa com altos níveis de secreção de proteínas, especialmente aquelas envolvidas na degradação da parede celular de plantas, como as ABFs (VRIES & VISSER, 2001). Diversos trabalhos já descreveram a produção de ABFs por espécies do gênero *Aspergillus* e suas aplicações (VRIES & VISSER, 2001), e uma dessas aplicações é na conversão da biomassa lignocelulósica em combustíveis. Os diferentes tipos de pré-tratamentos que podem ser aplicados sobre esse material, em geral, reduzem o grau de polimerização dos polissacarídeos, transformando-os em mono e oligossacarídeos, sendo que estes últimos precisam ser degradados a monossacarídeos para eficiente utilização pelos micro-organismos fermentadores (SAHA, 2000). Com isso, as ABFs utilizadas sinergicamente com as demais enzimas do complexo xilanolítico, se tornam fundamentais para o processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica à monossacarídeos.

## **2.7 Etanol de 2ª geração – pré-tratamento e hidrólise da biomassa**

A produção de etanol é uma alternativa importante como fonte de energia renovável. Os biocombustíveis, apresentam diversas vantagens em relação aos combustíveis não-renováveis, como o petróleo, pois apresentam maior sustentabilidade em relação ao crescimento econômico, favorecem os países com economia baseada na agricultura, seu uso reduz a liberação de gases do efeito estufa, sua produção favorece o sequestro de carbono, além de poder ser continuamente renovado em relação aos combustíveis fósseis (U.S. DOE, 2006; AMARASEKARA, 2013; KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). A utilização de resíduos da agroindústria, transformando-os em subprodutos, é outra vantagem da produção de biocombustíveis. Já que o acúmulo destes materiais causa graves danos ao meio ambiente, a produção de bioetanol a partir dessa matéria prima oferece um destino a esses materiais, que somam mais de 35 milhões de toneladas/ano, tornando-os as fontes de biomassa mais abundantes do mundo (PATEL et al., 2015). Outra vantagem importante para esses subprodutos, é que eles não são usados como produtos na alimentação humana, o que diminui a tensão político-econômica existente na produção de biocombustíveis (AMARASEKARA, 2013; KENNES et al., 2015)

Os biocombustíveis provenientes da biomassa lignocelulósica – o chamado etanol de segunda geração (2G) – são produzidos a partir da desconstrução da matriz lignocelulósica (pré-tratamentos), seguida da sacarificação dos polissacarídeos (hidrólise ácida ou enzimática) e fermentação dos açúcares C5-C6 resultantes (U.S. DOE, 2006; AMARASEKARA, 2013). A

matriz lignocelulósica apresenta uma estrutura complexa e recalcitrante, contendo a celulose cristalina, a hemicelulose, mais hidratada, e a lignina, conforme revisado no **item 2.1**. Por isso, a biomassa deve ser primeiramente pré-tratada, com quebra da barreira de lignina, ponto fundamental para o aumento da acessibilidade dos agentes de hidrólise às estruturas de celulose e hemicelulose (BRIENZO et al., 2014; DEVARAPALLI & ATIYEH, 2015; BRIENZO et al., 2015; SUN et al., 2016).

Os métodos utilizados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica podem ser divididos em métodos físicos, como trituração e moagem, métodos termoquímicos, como o uso de vapor, auto hidrólise, hidrotermólise, entre outros, métodos químicos, como o uso de álcali, ácidos diluídos, agentes oxidantes ou solventes orgânicos, e métodos biológicos, enzimáticos ou microbianos (U.S. DOE, 2006; DEVARAPALLI & ATIYEH, 2015; AMARASEKARA, 2013; KENNES et al., 2015). Cada método apresenta vantagens e desvantagens, por isso, o uso combinado de alguns métodos também pode ser utilizado no pré-tratamento da biomassa para aumentar a acessibilidade dos agentes de hidrólise aos polissacarídeos e a recuperação da lignina para formação de produtos com maior valor agregado (DEVARAPALLI & ATIYEH, 2015; SUN et al., 2016). A escolha e a otimização do método de pré-tratamento a ser utilizado são importantes na produção de etanol 2G, pois devem ser feitas visando maximizar o rendimento de açúcares fermentáveis, minimizando a formação de compostos tóxicos, como furfural, ácidos orgânicos ou fenóis, que podem inibir os passos subsequentes da produção, como a hidrólise enzimática e a fermentação (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

### *2.7.1. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica*

O primeiro passo do pré-tratamento, anterior a todos os métodos, é o tratamento físico, como a trituração, a moagem e a irradiação (raios gama, micro-ondas, etc.). Esses métodos têm sido utilizados pois reduzem o tamanho da biomassa, diminuindo a cristalinidade e aumentando a acessibilidade e digestibilidade dos reagentes de pré-tratamento (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). A moagem pode ser realizada com diversos sistema, como moinho de bolas, moinho de facas, moinho de rolos, entre outros, com o objetivo de pulverizar a biomassa ao máximo possível. O problema com a moagem rigorosa é o alto consumo de energia, que pode encarecer e inviabilizar o processo. A irradiação, por sua vez, pode ser utilizada em associação com outros métodos de pré-tratamento, sendo mais efetiva do que aquecimento convencional, utilizado na hidrólise ácida, por exemplo (SUN et al., 2016). Porém o custo de aplicação desta técnica na indústria é inviável (SUN et al., 2016).

#### 2.7.1.1 Métodos termoquímicos

Os métodos termoquímicos são bastante utilizados por serem relativamente mais baratos. A explosão à vapor é o método de pré-tratamento mais comum na produção de biocombustíveis, que alia efeitos físico e térmico. Ele ocorre com a aplicação da biomassa em um reator sob alta pressão saturada de vapor (entre 1 a 4 Mpa), e alta temperatura (150-250 °C) por poucos minutos. Assim uma rápida reação ocorre, e em seguida a pressão é instantaneamente reduzida à pressão atmosférica, o que faz com que a biomassa sofra uma “explosão”, com ruptura das fibras. Durante este processo a hemicelulose e a lignina podem sofrer decomposição, o que permite o acesso das enzimas hidrolíticas à celulose (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

Outro método bastante similar, é a explosão à vapor com amônia. Esse método ocorre nas mesmas condições da explosão à vapor simples, porém nesse, juntamente com a biomassa é adicionado uma solução de amônia e a temperatura fica entre 60 e 120 °C. Nesse método a hemicelulose não é completamente hidrolisada, mas a matriz de lignina é rompida e a celulose perde parcialmente sua cristalinidade, favorecendo os próximos passos de hidrólise enzimática (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

#### 2.7.1.2 Métodos químicos

Dentre os métodos químicos de pré-tratamento de biomassa, destacam-se aqueles que utilizam reagentes alcalinos, pois removem boa parte da lignina e preservam a celulose e a hemicelulose (para serem hidrolisadas posteriormente) com menor formação de produtos de degradação dos açúcares. Nesse processo, as ligações ésteres das hemiceluloses e da lignina são facilmente quebradas o que promove a solubilização destes compostos e a exposição da celulose ao processo de hidrólise (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). O pré-tratamento alcalino é o mais comumente utilizado e ocorre na presença de álcalis como hidróxido de sódio (NaOH), de potássio (KOH), de cálcio  $\text{Ca(OH)}_2$ , carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ou amônia aquosa. A temperatura e o tempo de reação nesse método, devem ser controlados de forma que quanto mais quente a reação estiver ocorrendo, menor deve ser o tempo de contato do álcali com a biomassa (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). Esse método é a melhor opção em processos de extração e recuperação de hemiceluloses. Nele a estrutura da hemicelulose é mantida em solução facilitando sua separação da celulose que permanece insolúvel e da lignina, a partir do uso de solvente orgânico após a solubilização, que precipita a hemicelulose, mas não a lignina. Após a etapa de pré-tratamento alcalino, se faz necessária a neutralização da solução pré-tratada. Esse processo forma uma quantidade elevada de sais, que podem interferir nos processos posteriores, principalmente de hidrólise enzimática. Assim é necessária a realização de etapas de lavagem, que permitam a remoção/redução da concentração salina no meio.

Outro método químico que remove a lignina sem grandes prejuízos à celulose é a utilização de líquidos iônicos. Estes são sais contendo cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos, que apresentam ponto de fusão menores do que 100 °C, usados no pré-tratamento na forma líquida a 100 °C. Alguns exemplos são os sais de cloreto (Cl<sup>-</sup>) e acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), que devem ser usados com cautela porque seu excesso afeta a solubilidade da celulose, pois são ânions com alta capacidade de formar ligações de hidrogênio que se ligam às hidroxilas da celulose, dissolvendo-a. Já o cátion utilizado geralmente é um imidazol, que reage com a porção hidrofóbica da celulose (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016). A utilização de líquidos iônicos é favorável ao uso de enzimas na etapa de hidrólise, pois eles aumentam bastante a superfície de contato dos polissacarídeos, porém a etapa de pré-tratamento e de hidrólise enzimática não podem ocorrer simultaneamente, pois os líquidos iônicos são desnaturantes para enzimas (SUN et al., 2016).

O terceiro pré-tratamento químico mais importante é o uso de solventes orgânicos ou aquosos – método *organosolv*. Esse método promove a precipitação e recuperação praticamente integral da lignina e a solubilização da hemicelulose; isso permite a formação de poros maiores na biomassa e aumento da superfície de contato pelos agentes de hidrólise, reduzindo significativamente o teor de lignina. Reagentes como etanol, metanol, acetona e glicerol são utilizados na presença de um catalisador ácido forte, como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, base forte, como NaOH ou um ácido orgânico fraco, como ácido fórmico, acético e salicílico. Sob altas pressão e temperatura (150 a 250 °C) o catalisador não é requerido (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

Em oposição ao alcalino, o pré-tratamento químico ácido solubiliza a hemicelulose, podendo em alguns casos, dependendo da concentração e força do ácido, degradar boa parte dos açúcares, formando compostos inibidores dos processos de hidrólise e de fermentação. Nesse método, podem ser utilizados ácidos concentrados ou diluídos. Pré-tratamentos que utilizam ácidos concentrados podem causar degradação da celulose; o uso de ácido diluído é mais favorável pois, é mais barato, causa menos danos à celulose, gera menos produtos de degradação e causa menor corrosão dos equipamentos. O ácido mais utilizado nesses casos é o sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em concentrações ao redor de 2,5% (m/m), mas os ácidos nítrico (HNO<sub>3</sub>), fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e clorídrico (HCl) também podem ser utilizados para tratar diferentes materiais lignocelulósicos. O aquecimento a 120-200 °C pode ser realizado em processos mais rápidos, com menos de 1 hora de reação, com ácido diluído a 0,5-2,5 %, sem causar grandes perdas de açúcares (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

### 2.7.1.3 Métodos bioquímicos e biológicos

Esses tipos de pré-tratamentos são realizados na presença de enzimas ou de micro-organismos ligninolíticos, como os fungos da podridão branca, parda e branca. Os mais utilizados são os fungos da podridão branca, que produzem enzimas, como lacase, lignina-peroxidase e manganês-peroxidase, capazes de reduzir a recalcitrância da matriz lignocelulolítica pela degradação da lignina. Já os fungos da podridão parda produzem preferencialmente enzimas celulolíticas, por isso são pouco utilizados. Esse método não utiliza reagentes químicos e não necessitam de ajustes de temperatura e pressão, o que reduz o custo do processo e favorece o meio ambiente. Porém é um processo bastante demorado (duração de várias semanas) o que dificulta sua aplicação na indústria (KENNES et al., 2015; SUN et al., 2016).

### *2.7.2 Hidrólise da biomassa pré-tratada*

Após a etapa de pré-tratamento da biomassa, a celulose e a hemicelulose estão mais acessíveis para a aplicação dos processos de hidrólise. A sacarificação da biomassa ou hidrólise dos polissacarídeos a monossacarídeos é o gargalo da produção de etanol de segunda geração, a etapa mais desafiadora do processo. Isso ocorre devido à alta resistência da biomassa em sofrer hidrólise por enzimas ou ácidos, a chamada recalcitrância, uma característica adquirida pelas plantas durante milhões de anos de seleção natural (U.S. DOE, 2006; AMARASEKARA, 2013; KENNES et al., 2015). Portanto, o sucesso da hidrólise na produção de açúcares fermentáveis depende principalmente da eficiência do pré-tratamento na degradação da lignina e exposição da celulose e da hemicelulose, além da menor formação de produtos de degradação dos açúcares. Do processo de hidrólise obtém-se principalmente hexoses e pentoses, sendo o principal açúcar gerado a glicose (KENNES et al., 2015).

Na hidrólise química com ácidos diluídos ou concentrados como ácido sulfúrico e ácido clorídrico, a temperatura de reação aumenta de acordo com a concentração do ácido: ácidos mais diluídos ( $\pm 0,1\%$ ) são aplicados em processos mais quentes (200 °C). O uso de ácidos mais concentrados (30-70%) pode ser realizado a temperaturas mais brandas, porém esse processo causa mais problemas de corrosão e formação de resíduos mais agressivos ao meio ambiente. A recuperação do ácido na hidrólise ácido-concentrado pode encarecer o processo de maneira que a hidrólise enzimática se torna um processo mais barato (KENNES et al., 2015).

A hidrólise enzimática é a melhor opção para essa etapa pois é favorável ao meio ambiente, utiliza temperaturas mais baixas e é muito mais específica, sendo que as enzimas atacam seus substratos de forma ordenada, e não formam produtos de degradação da lignina

como fenóis, nem de açúcares, como furfural e hidroximetil-furfural, inibidores do processo de fermentação. No entanto, a necessidade de altas concentrações enzimáticas em determinadas condições também pode encarecer o processo (KENNES et al., 2015).

Devido à estrutura bastante rígida e fechada da celulose, as celulasas apresentam grande dificuldade de acesso a esses polissacarídeos e baixo rendimento quando eles estão em sua forma in natura (U.S. DOE, 2006; KENNES et al., 2015). Para a completa e eficiente quebra de celulose e hemiceluloses a monossacarídeos é necessária a utilização de coquetéis enzimáticos, contendo enzimas catalisadoras da hidrólise de todas as ligações presentes na matéria-prima. O grande desafio da utilização de coquetéis enzimáticos, é igualar as condições de reação para que todas as enzimas presentes atuem com o maior rendimento possível, de acordo com suas propriedades catalíticas, como pH e temperatura ótimos, estabilidade, inibição por íons, outras substâncias e produtos (U.S. DOE, 2006; KENNES et al., 2015). Antes da aplicação de coquetéis enzimáticos na degradação da matéria-prima pré-tratada, é importante conhecer a composição molecular e estrutural, propriedades físico-químicas, função e arranjos da biomassa, para realizar a aplicação e a dosagem da concentração correta das enzimas necessárias, bem como o tempo de aplicação para que cada enzima sobreponha a função da anterior (U.S. DOE, 2006; KENNES et al., 2015). O coquetel enzimático mais eficiente na sacarificação da celulose contém endo e exo-celulasas e  $\beta$ -glicosidases; na sacarificação das hemiceluloses, as xilanasas, ABFs e  $\beta$ -xilosidases são as principais enzimas requeridas (U.S. DOE, 2006; KENNES et al., 2015). Geralmente as enzimas utilizadas nesse processo são provenientes de bactérias anaeróbias ou de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (KENNES et al., 2015).

Recentemente, verificou-se que a adição de surfactantes, como Tween 20 ou Tween 80, após o pré-tratamento, reduz a quantidade de lignina depositada sobre a biomassa pela formação de emulsões com os compostos hidrofóbicos da lignina. Assim, ela é mantida em solução e não impede o acesso das enzimas hemi e celulolíticas aos seus substratos. O uso de surfactantes, então, aumenta a taxa de conversão da celulose/hemicelulose em monossacarídeos, além de proteger a enzima da desnaturação, o que acelera a hidrólise enzimática e reduz a concentração necessária de enzimas (KENNES et al., 2015; MESQUITA et al., 2016).

Após a hidrólise, com formação do licor contendo hexoses e/ou xiloses, os açúcares estão prontos para serem fermentados e convertidos em etanol. Em alguns processos de produção de etanol, a hidrólise do material lignocelulósico, utilizando soluções de enzimas microbianas, ocorre em etapas e reatores diferentes para fermentação de hexoses, da fermentação de pentoses, num processo denominado sacarificação e fermentação separadas (SHF). Em outros

processos, a hidrólise pode ocorrer simultaneamente à fermentação de hexoses, e posteriormente é realizada a fermentação de pentoses - sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Em outros casos a fermentação tanto de hexoses quanto de pentoses ocorrem no mesmo reator, simultaneamente à hidrólise, com a utilização de micro-organismos manipulados geneticamente para fermentar ambos os açúcares, no processo de sacarificação e co-fermentação (SSCF). Alguns processos ainda englobam a produção da enzima, hidrólise da biomassa e fermentação no mesmo reator. Esses ocorrem com a utilização de um único micro-organismo que produz as enzimas, que catalisam a hidrólise da biomassa com consequente produção de açúcares, que serão fermentados pelo próprio micro-organismo – processo denominado bioprocessamento consolidado (CBP) (DEVARAPALLI & ATIYEH, 2015; KENNES et al., 2015). Kennes e colaboradores (2015) descrevem com riqueza de detalhes estas quatro configurações de processo para a produção de etanol. Cada uma apresenta limitações, como o alto custo do pré-tratamento e das enzimas utilizadas na hidrólise, e dificuldades no processo, pois alguns parâmetros necessitam ser bem controlados para sucesso da produção de etanol 2G. Apesar disso, essas são ainda alternativas mais vantajosas para o meio ambiente do que os processos químicos (DEVARAPALLI & ATIYEH, 2015; KENNES et al., 2015).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi isolar uma nova  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por uma linhagem de *Aspergillus hortai* CRM 1919, e aplicar essa enzima na hidrólise de hemiceluloses extraídas de resíduos agroindustriais.

#### 3.1. Objetivos específicos

i). Produzir  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases cultivando a linhagem de *A. hortai* em diferentes substratos, a fim de se determinar o melhor substrato para a produção da enzima.

ii). Otimizar a produção da enzima, estabelecendo os fatores físicos e químicos para maior produção da enzima.

iii). Purificar a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida pelo referido fungo, utilizando o menor número de etapas possível.

iv). Caracterizar propriedades bioquímicas da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase purificada, como pH e temperatura ótimos de reação, estabilidade ao pH, temperatura e salinidade, halotolerância e influência de íons e algumas substâncias na atividade enzimática, determinando, assim, quais as melhores condições físico-químicas de ação da enzima.

v). Extrair e caracterizar hemiceluloses de bagaço de cana e de bagaço de malte, resíduos da agroindústria.

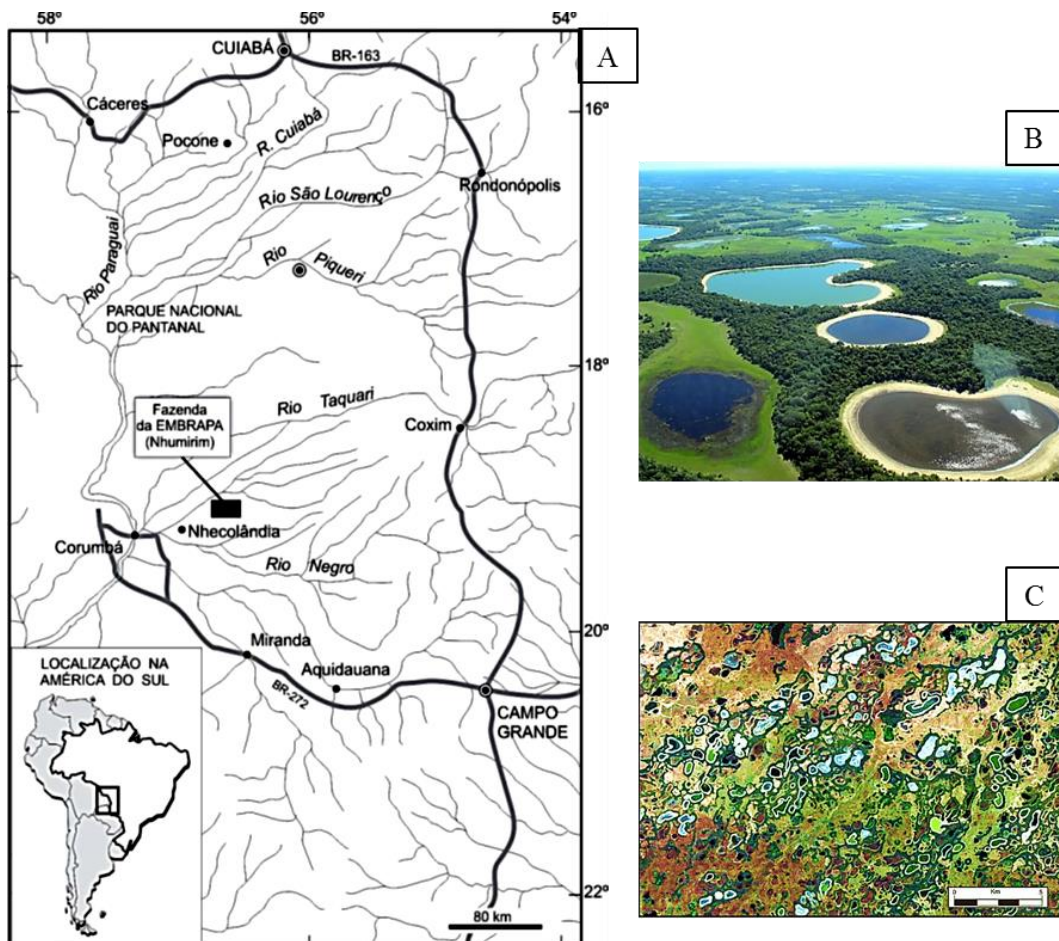
vi). Aplicar a enzima purificada, tanto isoladamente, quanto misturada em um coquetel xilanolítico, em soluções de hemiceluloses extraídas dos resíduos agroindustriais, determinando os produtos de hidrólise formados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Micro-organismo e condições de crescimento

A linhagem de *A. hortai* utilizada neste trabalho foi isolada de solo da margem de lagoas da região do Pantanal Matogrossense, conhecida como Nhecolândia (**Figura 10**), que apresentam elevada salinidade e alcalinidade. No isolamento, amostras do solo foram diluídas e inoculadas em meio de cultura contendo xilana sendo incubadas à 40 °C. A linhagem de *A. hortai* cresceu nessas condições e em trabalhos anteriores apresentou eficiente produção de xilanases (NASCIMENTO, 2017).

**FIGURA 10:** Nhecolândia no Pantanal Mato-grossense. A: local de isolamento da linhagem; B: imagem de algumas das lagoas salinas; C: imagem aérea das lagoas da Nhecolândia.



Fonte: A: ALMEIDA et al., 2003; B: FURQUIM et al. (2010); C: SANTOS (2016).

A linhagem de *Aspergillus hortai* está mantida na Central de Recursos Microbianos da Unesp (CRM-Unesp) sob o código CRM 1919. A linhagem foi cultivada em meio sólido de Vogel (1956), cuja composição está relacionada na **Tabela 4**, suplementado com 1,5% (m/v) de farelo de trigo e com ágar na mesma proporção, mantida em nosso laboratório pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939), o qual consiste na preservação, principalmente de fungos filamentosos. Culturas puras foram inoculadas em meio sólido de Vogel (1956) e após o crescimento da colônia, foram recortados pequenos cubos ou círculos do meio e adicionados em frascos de vidro contendo água destilada estéril ou solução salina. Os frascos foram mantidos em refrigerador à 10 °C, sendo renovados anualmente.

Para produção de conídios, o fungo foi inoculado em tubos de ensaio contendo 7 mL do meio sólido de Vogel, contendo 3% (m/v) de farelo de trigo, os quais foram previamente inclinados, e incubado por 7 dias a 28 °C. Os conídios produzidos foram suspensos em água estéril destilada, o número de esporos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e a concentração da suspensão foi ajustada para  $5 \times 10^7$  conídios/mL, contados câmara de Neubauer, sendo então essa solução utilizada como inóculo para os meios de cultivo.

#### **4.2. Condições de cultivo para produção de enzimas**

Os meios líquidos utilizados para o cultivo e a produção enzimática foram preparados utilizando-se o meio de sais de Vogel (1956) descrito na **Tabela 4**, suplementado com 1% (m/v) das fontes de carbono a serem avaliadas na influência da produção. O pH inicial do meio de cultura foi ajustado de acordo com cada experimento, assim como o período e a temperatura de incubação. Frascos Erlenmeyers (125 mL), contendo 24 mL do meio, foram inoculados com 1,0 mL da suspensão de  $5 \times 10^7$  conídios/mL e incubados a diferentes condições como indicado. Os cultivos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados com os valores médios das três repetições.

**Tabela 4.** Meio de sais de Vogel.

<b>Soluções</b>	<b>Concentração</b>
<i>Solução de elementos-traço</i>	
Ácido cítrico.H <sub>2</sub> O	5,00 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,00 g
Fe (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,00 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,005 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,005 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,005 g
Água destilada qsp.	100,00 mL
<i>Solução de biotina</i>	
Biotina	5,00 mg
Água destilada qsp.	50,0 mL
<i>Solução de sais de Vogel</i>	
Citrato de sódio.5H <sub>2</sub> O	15,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25,00 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10,00 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,50 g
Solução de biotina	0,50 mL
Solução de elementos-traço	0,50 mL
Água destilada qsp.	100,00 mL
Clorofórmio	0,2-0,3 mL
O meio de cultura foi preparado com a solução de sais de Vogel diluída 50 vezes em água destilada, suplementada com 1% (m/v) da fonte de carbono utilizada em cada experimento.	

**Fonte:** Vogel (1956).

### **4.3. Obtenção das soluções enzimáticas**

Após o crescimento em meio líquido em determinadas condições conforme o experimento, as culturas foram filtradas a vácuo utilizando papel de filtro em funil de Büchner. Assim, foram separados o filtrado de cultura e o micélio. O filtrado foi utilizado como fonte de proteínas e enzimas extracelulares.

### **4.4. Determinação da atividade $\alpha$ -L-arabinofuranosidase**

A atividade de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (ABF) foi determinada utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNPArA, Sigma-Aldrich Chem. Co.: St. Louis, MO, USA), conforme descrito por Biely (2003). A solução de substrato foi preparada com 5,5 mM de pNPArA em tampão McIlvaine (**Tabela 5**) pH 4,0, preparado conforme Morita & Assumpção (2007). Uma solução foi preparada reunindo substrato, tampão e amostra da enzima, e incubada em banho maria a 50°C por 10 minutos. A cada 5 min, alíquotas da solução foram retiradas e adicionadas a uma solução saturada de tetraborato de sódio para interromper a reação enzimática. O *p*-nitrofenolato liberado foi quantificado pela leitura de absorbância em espectrofotômetro a 405 nm (KERSTERS-HILDERSON et al., 1982). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenolato por minuto, sob as condições de atividade enzimática. A atividade específica foi expressa em unidade por miligrama de proteína. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata e os resultados foram dados em valores médios.

**Tabela 5:** Composição da solução tampão de McIlvaine – fosfato dissódico/ácido cítrico.

<b>pH</b>	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M (mL)</b>	<b>Ácido Cítrico 0,1 M (mL)</b>
3,0	4,11	15,89
4,0	7,71	12,29
5,0	10,30	9,70
6,0	12,63	7,37
7,0	16,47	3,53
8,0	19,45	0,55

Preparo do ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) – 0,1 M

Dissolver 21,008g de ácido cítrico em água e diluir a 1 litro.

Preparo do Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,1 M

Dissolver 17,814g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em água e diluir a 1 litro.

**Fonte:** Morita & Assumpção (2007, p.275).

#### 4.5. Determinação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951). Inicialmente foi preparado o reagente A, que consiste em adicionar Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2% (m/v) em uma solução de NaOH 0,1 M, adicionados de CuSO<sub>4</sub> 1% e de tartarato de sódio e potássio 1%, nas proporções de 100:1:1, respectivamente. Em tubos de ensaio, as amostras de proteína foram diluídas com água destilada a um volume final de 0,5 mL. Aos tubos, foram acrescentados 2,5 mL de solução A para reação por 15 minutos. Em seguida foram acrescentados 250 µL de solução de Folin diluído em água destilada (1:1) e mantidos sob reação por 30 min. A quantificação de proteínas totais presentes em solução foram determinadas por leitura de absorbância, em espectrofotômetro a 660 nm.

#### 4.6. Influência da fonte de carbono sobre a produção de α-L-arabinofuranosidase

A linhagem de *A. hortai* foi cultivada em diferentes fontes de carbono a fim de se comparar a produção de ABF em cada substrato. Os meios de cultura líquidos foram suplementados com 1% (m/v) de carboidratos puros incluindo arabinose, Avicel®, carboximetilcelulose, glicose, lactose, sacarose, pectina de maçã, xilana de aveia e xilose – e de subprodutos ou resíduos agrícolas e agroindustriais tais como bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de malte, casca de laranja, casca de arroz, casca de mandioca, farelo de trigo, polpa

cítrica e sabugo de milho. O pH dos meios foi ajustado para 6,5 e os frascos foram incubados em câmara de crescimento à 40 °C por 7 dias.

Os resíduos/subprodutos agroindustriais foram adquiridos na região de Rio Claro - SP: o bagaço de malte foi gentilmente cedido pela cervejaria Baumgartner (Ipeúna – SP); a polpa cítrica foi gentilmente cedida pela empresa Citrosuco (Araras – SP); o sabugo de milho foi adquirido da empresa Rasul (Andirá – PR); os demais foram obtidos domesticamente ou do comércio local. Os resíduos foram preparados por lavagem exaustiva com água destilada para remoção de contaminantes e interferentes na reação, foram secos à 85 °C por 36 horas, moídos e as partículas menores que 18 mesh foram utilizadas. O resíduo/subproduto agroindustrial selecionado para continuar as próximas etapas de produção foi aquele no qual o fungo liberou maior quantidade de ABF no meio extracelular.

#### **4.7. Cultivo do fungo em condição estática e agitada**

Para verificação da influência do tempo de incubação sobre a produção de ABF, a referida linhagem foi inoculada em meio líquido de Vogel (1956), suplementado com 1% de polpa cítrica em frascos Erlenmeyers. Estes foram incubados de forma estática por 15 dias e sob agitação de 120 rpm por 10 dias. O pH dos meios foi ajustado para 6,5 e a temperatura de incubação foi de 40 °C.

#### **4.8. Interação entre o pH e a temperatura sobre a produção de $\alpha$ -arabinofuranosidase**

Após a seleção da melhor condição de cultivo de *A. hortai* para a produção de ABF, um delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes, foi realizado para a otimização da produção da enzima e verificação da interação entre o pH e a temperatura sobre a produção de ABF.

A produção de ABF foi realizada com um planejamento experimental com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais, 4 pontos laterais e uma triplicata do ponto central (3 experimentos) totalizando 11 experimentos. O pH e a temperatura foram as variáveis independentes e a atividade ABF foi a variável dependente. Os valores reais e os valores codificados de pH e temperatura foram ajustados de acordo com a **Tabela 6** para cada ensaio. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Como esse experimento é um fatorial completo

2<sup>2</sup>, então o valor de  $\alpha$  (que representa a distância entre o centro do desenho e um dos pontos da estrela do modelo) foi calculado de acordo com a **Equação 1** onde  $k = 2$  fatores (pH e temperatura) portanto  $\alpha = 1,414$ .

**Equação 1**  $\alpha = [2^k]^{(1/4)}$

**Tabela 6:** Planejamento composto central com duas variáveis e matriz dos valores reais (e codificados).

Variáveis	Fatores				
	- $\alpha$ (-1,41)	-1	0	+1	+ $\alpha$ (+1,41)
pH	3	3,87	6	8,13	9
Temperatura (°C)	25	27,9	35	42,1	45

Experimento	pH	Temperatura (°C)
1	3.87 (-1)*	27.9 (-1)*
2	8.13 (+1)*	27.9 (-1)*
3	3.87 (-1)*	42.1 (+1)*
4	8.13 (+1)*	42.1 (+1)*
5	3.00 (-1.41)**	35.0 (0)**
6	9.00 (+1.41)**	35.0 (0)**
7	6.00 (0)**	25.0 (-1.41)**
8	6.00 (0)**	45.0 (+1.41)**
9	6.00 (0)***	35.0 (0)***
10	6.00 (0)***	35.0 (0)***
11	6.00 (0)***	35.0 (0)***

**Fonte:** Elaborado pelo autor. \*Valores do planejamento experimental; \*\*Pontos axiais; \*\*\*Pontos centrais.

Os dados foram aplicados no programa Statistica 8 da StatSoft Inc. (Tulsa, OK, EUA) e analisados por regressão múltipla através da **Equação 2**. A análise de variância (ANOVA) do modelo foi realizada e a qualidade da equação do modelo polinomial foi verificada pelo coeficiente R<sup>2</sup> e sua significância foi verificada por um teste F.

**Equação 2**  $Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2$

Sendo: Y é o valor da variável de resposta (atividade ABF); x<sub>1</sub> e x<sub>2</sub> representam as variáveis independentes em valores codificados;  $\beta_0, \beta_1, \beta_{11}, \beta_{22}$  e  $\beta_{12}$  são constantes e são os coeficientes do modelo de regressão.

Para a validação da condição experimental otimizada foram realizados sete cultivos sob as condições otimizadas para a produção de ABF.

#### **4.9. Purificação da $\alpha$ -arabinofuranosidase produzida por *A. hortai***

##### *4.9.1. Precipitação com sulfato de amônio*

A linhagem de *A. hortai* foi cultivada em meio líquido nas condições otimizadas de maior produção de ABF para obtenção de filtrado bruto rico nessa atividade enzimática.

A etapa de precipitação com sulfato de amônio foi realizada de acordo com Scopes (1994) e com Janson & Rydén (1998) e para isso foram utilizados 100 mL do extrato bruto otimizado. A esse volume foi aplicado sulfato de amônio pulverizado, estando a amostra em banho de gelo, e sob lenta agitação. O sulfato de amônio foi aplicado nas faixas de 0-25%, 25-65% e de 65-90% (m/v) para avaliação da melhor faixa de precipitação da enzima, e separação das demais proteínas. Após cada etapa de centrifugação (5.000xg, 30 min, 4 °C) os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0 e dialisado contra o mesmo tampão para remoção do sal. A atividade enzimática e o teor de proteínas foram avaliados e a solução que apresentou maior atividade específica foi utilizada na etapa subsequente.

##### *4.9.2. Cromatografia de troca iônica*

A amostra obtida da diálise da etapa anterior foi aplicada em uma coluna de troca iônica CM Sephadex® C-50 (1,4 cm diâmetro x 18,0 cm altura), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0. Na coluna, foi aplicado um fluxo de 58,0 mL/hora e frações de 3 mL foram coletadas em tubos de ensaio. O teor de proteína em cada tubo foi estimado por leitura de absorbância a 280 nm e a atividade ABF foi medida em cada fração coletada. Após a completa lavagem da coluna, as proteínas que se ligaram foram eluídas com um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl. As frações que apresentaram atividade ABF foram reunidas em uma única amostra, a qual foi dialisada contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 4,0 e liofilizada.

##### *4.9.3. Cromatografia de exclusão molecular*

A amostra liofilizada da etapa anterior foi ressuspensa em 3 mL de tampão acetato de amônio 0,05 M pH 4,0, e aplicada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-100 (2,6 cm diâmetro x 64,0 cm altura), equilibrada e eluída com o mesmo tampão. O fluxo aplicado foi de 20,0 mL/hora e frações de 3 mL foram coletadas. O teor de proteína em cada tubo foi estimado

por leitura de absorvância a 280 nm e a atividade ABF foi avaliada em cada fração. Após completa lavagem da coluna, as frações que continham atividade ABF foram reunidas.

Para determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular, a coluna Sephadex G-100 foi calibrada com o Kit para Calibração de Filtração em Gel com proteínas de baixo peso molecular (Gel Filtration Calibration Kit - Low Molecular Weight - GE Healthcare UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) e dele foram utilizadas as proteínas ribonuclease A (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa) e blue dextran para determinação do volume morto da coluna. A massa molecular da ABF purificada foi estimada a partir de uma curva de regressão obtida da correlação entre o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrões (LogMM) e a razão entre os volumes de eluição ( $V_e$ ) dos padrões (e da amostra) e o volume morto ( $V_o$ ) da coluna, de acordo com a equação da reta:  $\text{LogMM} = (a \cdot V_e/V_o) + b$

#### *4.9.4. Eletroforese SDS-PAGE*

Para verificar a homogeneidade eletroforética da enzima purificada, foi realizada uma eletroforese utilizando um gel de dodecil sulfato de sódio com um gradiente de poliacrilamida de 8 a 18% de acordo com Laemmli (1970). As bandas de proteína foram visualizadas no gel após a aplicação de uma solução de coomassie brilliant blue R-250 a 0,1% (m/v) em etanol, ácido acético e água na proporção 3:1:6 (v/v/v). Como padrão, foi utilizado um kit de proteínas de baixo peso molecular para eletroforese (GE Healthcare UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) contendo fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14.4 kDa), o qual foi utilizado para estimar a massa molecular da ABF purificada de acordo com a mobilidade relativa das proteínas no gel.

#### **4.10. Caracterização da $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada**

A ABF purificada foi caracterizada quanto às seguintes propriedades:

- Massa molecular, estimado por cromatografia de exclusão molecular e PAGE-SDS (ANDREWS, 1964; LAEMMLI, 1970);
- pH ótimo, na qual a reação enzimática foi realizada utilizando-se tampão McIlvaine com pH de 3,0 a 7,0, à temperatura de 40 °C.

- Temperatura ótima nas quais foram realizadas reações enzimáticas em tampão McIlvaine pH 4,0 às temperaturas de 30 a 70 °C.

- Estabilidade térmica às temperaturas de 40, 50 e 60 °C, nas quais a ABF foi incubada na ausência de substrato por 2 horas, sendo retiradas alíquotas em tempos determinados, resfriadas e utilizadas em reação enzimática para determinação da atividade residual. Foi utilizado como controle a atividade enzimática da amostra sem incubação. A meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima para cada temperatura foi calculada de acordo com a **Equação 3**:

**Equação 3** 
$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k \cdot t$$

Em que: A é a atividade no tempo t,  $A_0$  é a atividade no tempo 0 e k é a constante de inativação térmica.

- Estabilidade na faixa de pH de 3,0 a 7,0 nos quais foram incubadas alíquotas da amostra na proporção de 1:2 (v/v) em tampão McIlvaine, na ausência de substrato, por 24 horas à 4 °C. Após esse período foi verificada a atividade residual das amostras, tendo como controle amostras nos mesmos tampões por até 2 minutos.

- Sensibilidade aos íons  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Zn}^{+2}$  e às substâncias DMSO, EDTA, Etanol, PMSF, SDS, Triton X-100, Tween 20, Tween 80 nas concentrações de 2 e 10 mM (10 e 20% para Etanol e DMSO). Alíquotas dessas substâncias foram adicionadas à reação enzimática nas concentrações citadas, verificando-se a influência destas na atividade. O resultado obtido está apresentado como atividade relativa com base na comparação com a atividade enzimática na ausência dessas substâncias.

- Tolerância e estabilidade ao sal NaCl foi realizada em concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 M de NaCl. A tolerância foi avaliada através da adição de NaCl nessas concentrações aos tubos de reação, com verificação da atividade residual, com base na atividade ABF na ausência de NaCl. A estabilidade foi realizada incubando-se alíquotas da enzima à solução de NaCl com as referidas concentrações finais de sal, por 24 horas à 25 °C. A atividade residual também foi obtida comparando-se o valor de atividade com uma amostra incubada por 24 horas à 25 °C na ausência de NaCl.

- As constantes cinéticas ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) foram determinadas conforme procedimento gráfico do duplo-recíproco proposto por Lineweaver-Burk (1934), sendo utilizadas concentrações de substrato pNPAra de 1,79 a 21,56 mM em tampão McIlvaine pH 4,0. O número de renovação ( $K_{cat}$ ) da ABF purificada foi calculado a partir do número de moléculas de substrato convertidas em produtos por unidade de tempo, por uma única molécula de enzima saturada com o substrato.

• A especificidade a substratos da  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada e do filtrado bruto, foi determinada utilizando-se os substratos sintéticos p-nitrofenil  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo, p-nitrofenil  $\beta$ -D-xilopiranosídeo, p-nitrofenil  $\alpha$ -D-galactopiranosídeo e p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo na concentração final de 0,04 M em tampão McIlvaine pH 4,0 a 60 °C. Os resultados foram expressos em relação à atividade observada com o substrato p-nitrofenil  $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo.

#### **4.11 Extração de hemiceluloses**

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de malte foram moídas, selecionadas em peneira de 20 mesh, secos em estufa a 45 °C e tratadas com solução de ácido etileno diamina tetracético (EDTA) 0,2 % (m/v) durante 1h em banho termostaticado a 90°C, para remoção de íons metálicos. Em seguida o material foi lavado com água destilada e seco em estufa a 45 °C por 7 dias.

Cerca de 10 gramas desses materiais foram colocados em frascos de 500 mL, seguido da adição de 200 mL solução de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 6% em água destilada (v/v) sendo o pH da solução ajustado para 11,6 com solução de NaOH 5M. Os frascos foram mantidos por 24 h sob agitação de 120 rpm a 20 °C, conforme método otimizado por Brienzo et al. (2009), com modificações no tempo de agitação e na rotação por minuto. Após o período de agitação, a solução foi filtrada em papel de filtro, para separação da parte solúvel (hemicelulose e lignina) da parte insolúvel (rica em celulose), e o pH da solução foi ajustado para próximo de 6,0 com solução de HCl 6M.

A solução resultante foi mantida em estufa a 70 °C para redução do volume à 1/3 do inicial. Em seguida foi adicionado álcool etílico a 96% em um volume 3 vezes maior que o volume da solução reduzida, para precipitação e separação da hemicelulose, pois a lignina se manteve solúvel, e para remoção do sal formado na neutralização. Após a decantação da hemicelulose, o sobrenadante foi removido e ao precipitado foi adicionado álcool etílico a 70% em um volume 3 vezes maior que o precipitado. Esta etapa de lavagem foi repetida por mais 3 vezes, para completa remoção do sal formado e da lignina.

Após as lavagens, a hemicelulose extraída foi seca em estufa a 70 °C e, posteriormente, triturada para uso nas etapas seguintes.

## 4.12 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e do bagaço de malte in natura

### 4.12.1 Teor de umidade

Para determinação da umidade dos substratos, foram pesados 1 grama de cada substrato, em triplicata, em cadinhos previamente tarados, e essa massa foi colocada em estufa a 105 °C, até massa constante. Descontando o valor do peso do cadinho obteve-se a massa seca dos materiais e a diferença em massa é referente à água, a qual foi utilizada para calcular o teor de umidade (porcentagem em relação a massa inicial de material).

### 4.12.2 Teor de extrativos

Na determinação do teor de extrativo presente no bagaço de cana-de-açúcar e no bagaço de malte foram pesados cerca de 1,0 grama de cada, sendo o material colocado em cartuchos de papel de filtro, os quais foram inseridos em um sistema de extração Soxhlet. Ao sistema, foi acoplado um balão de 200 mL de uma mistura de ciclo-hexano/etanol (1:1, v/v), que foi aquecido até temperatura de ebulição. Após 8 horas de extração em solvente orgânico, o cartucho foi utilizado para um novo ciclo de extração em água, adicionando-se 200 mL de água ultrapura no balão sob aquecimento até temperatura de ebulição. O material foi extraído nessas condições por 24 horas. Após esse período, alguns cartuchos foram secos em estufa a 45 °C, até massa constante, para utilização na caracterização química, e outros foram secos a 105°C, até massa constante, para determinação do teor de extrativos. O material foi retirado do cartucho e pesado para determinação da massa residual. Descontando o valor da massa inicial, obteve-se a massa do material livre de extrativos e a diferença foi a massa de extrativos, utilizada para calcular o teor de extrativos (porcentagem em relação a massa inicial de material).

### 4.12.3 Caracterização química – Hidrólise ácida dos substratos

Cerca de 300 mg das amostras de bagaço de cana-de-açúcar e de malte, em base seca e livres de extrativos, foram hidrolisadas com 3 mL de solução de ácido sulfúrico a 72 % (m/m) em banho termostaticado a 30 °C por 1 h, sob agitação constante, com um bastão de vidro. Após a reação, a segunda etapa do método foi iniciada com adição ao frasco de 84 mL de água ultrapura para diluir o ácido à 4%. Então as amostras foram autoclavadas a 121 °C por 1 hora. Após o resfriamento, as amostras foram filtradas em cadinho de vidro com placa porosa 10 a 16 µm, previamente tarados, os quais foram colocados em estufa à 105 °C até massa constante, para determinação do teor de lignina insolúvel. O filtrado líquido (hidrolisado) foi utilizado para determinação de lignina solúvel – por leitura em espectrofotômetro a 215 e 280 nm – e

determinação de carboidratos e produtos de degradação dos carboidratos – por análise em cromatografia líquida (HPLC). Todos os procedimentos seguem as normas constantes no protocolo do *National Renewable Energy Laboratory* (SLUTTER et al., 2011). Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### **4.13 Caracterização da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte**

Cerca de 300 mg de hemicelulose extraídos de bagaço de cana-de-açúcar e de malte foram adicionados a frascos contendo 1,5 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m), e foram mantidos a 45 °C em banho termostatizado por 7 minutos. Posteriormente, a cada frasco foram adicionados 45 mL de água ultrapura e essa mistura foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos. O conteúdo dos frascos foi filtrado em cadinho de vidro com placa porosa, previamente tarados. O resíduo sólido foi lavado com água destilada e seco em estufa a 105 °C até massa constante para a determinação de lignina insolúvel. A fração solúvel (hidrolisado) foi utilizada para determinação de lignina solúvel – por leitura em espectrofotômetro a 215 e 280 nm – e determinação de carboidratos: glicose, xilose, arabinose e produtos de degradação dos mesmos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BRIENZO et al., 2009).

#### **4.14 Hidrólise enzimática de hemiceluloses**

Os experimentos foram realizados em tubos tampados, contendo os substratos xilana de aveia, xilana de faia (*beechwood*), hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte, em tampão acetato de amônio 0,05 M, pH 4,5 em banho termostatizado a 40 °C. As reações foram realizadas na presença da ABF de *A. hortai* purificada, do filtrado bruto de *A. hortai* contendo a ABF e de xilanase purificada de *A. hortai*. Foram realizados dois experimentos: um com a enzima purificada associada à xilanase e outro com o filtrado bruto associado à xilanase. No primeiro experimento foi utilizada a xilana de aveia à 2% de concentração na presença de:

- 0,141 U de ABF purificada por 24 h.
- 0,141 U de ABF purificada por 48 h + 700 U de xilanase por 24 h.
- 700 U de xilanase por 24 horas.

No segundo experimento foram utilizadas as duas xilanas e as duas hemiceluloses citadas na concentração de 2% em experimentos individuais, na presença de:

- 0,141 U de ABF no filtrado bruto por 2, 12, 24 e 48 h.
- 0,141 U de ABF no filtrado bruto por 48 h + 350 U de xilanase por 24 h.
- 350 U de xilanase por 24 h.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os produtos de hidrólise foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Influência da fonte de carbono utilizada no cultivo de *Aspergillus hortai* sobre a produção de $\alpha$ -arabinofuranosidase

Os resultados obtidos sobre a produção de ABF por *A. hortai* em diferentes fontes de carbono podem ser visualizados na **Tabela 7**. Dentre os carboidratos puros, a arabinose resultou na produção da maior quantidade de enzima (23,2 U/L), provavelmente devido ao papel indutivo que esse monossacarídeo apresenta sobre a produção de ABF. A atividade ABF não foi detectada quando o micro-organismo foi cultivado em substratos simples, como a glicose, o que comprova que a produção de ABF é induzida e não constitutiva. O cultivo em pectina de maçã foi o segundo maior indutor da produção de ABF, apresentando valor de 20,05 U/L.

Em relação aos subprodutos e resíduos da agroindústria, farelo de trigo é conhecido por conter arabinoxilanas em nível maior que os demais resíduos (BEAUGRAND et al., 2004) e tem sido mencionado como um forte indutor da produção de ABF (LAURUENGTANA & PINPHANICHAKARN, 2006; GUERFALI et al., 2011). No entanto, nesse trabalho, os cultivos com farelo de trigo apresentaram os menores valores de produção (em média 3,35 U/L) em relação aos demais cultivos em resíduos agroindustriais. A maior atividade ocorreu em fontes de carbono ricas em pectina como casca de laranja e polpa cítrica, apresentando 34,0 U/L e 17,8 U/L, respectivamente. Casca de laranja e outras fontes de pectina são conhecidas como indutores da produção de ABF, porque alguns polissacarídeos pécticos (por exemplo a ramnogalacturonana) apresentam cadeias laterais com resíduos de  $\alpha$ -L-arabinose, individuais, lineares ou ramificados (MOHNEN, 2008; SATHISHKUMAR et al., 2013).

**Tabela 7:** Influência de carboidratos puros, subprodutos e resíduos da agroindústria utilizados como substrato, sobre a produção de  $\alpha$ -arabinofuranosidase por *Aspergillus hortai*.

<i>Carboidratos puros</i>	Atividade $\alpha$ -arabinofuranosidase (U/L)	Proteína extracelular (mg)
Arabinose	23,18 $\pm$ 1,69	2,88 $\pm$ 0,17
Avicel®	ND	0,21 $\pm$ 0,07
CMC	ND	0,80 $\pm$ 0,48
Glicose	ND	3,46 $\pm$ 0,32
Lactose	0,65 $\pm$ 0,13	3,48 $\pm$ 0,06
Pectina de maçã	20,05 $\pm$ 1,45	5,50 $\pm$ 0,26
Sacarose	0,70 $\pm$ 0,06	3,91 $\pm$ 0,27
Xilana de aveia	1,38 $\pm$ 0,37	5,08 $\pm$ 0,64
Xilose	2,13 $\pm$ 0,13	4,96 $\pm$ 1,79
<i>Subprodutos/ Resíduos agroindustriais</i>		
Bagaço de malte	3,14 $\pm$ 0,45	8,13 $\pm$ 0,40
Bagaço de cana	1,14 $\pm$ 0,07	5,39 $\pm$ 0,23
Casca de arroz	ND	3,61 $\pm$ 0,54
Casca de laranja	34,00 $\pm$ 0,67	8,78 $\pm$ 0,05
Casca de mandioca	ND	2,28 $\pm$ 0,53
Farelo de aveia	1,80 $\pm$ 0,57	9,10 $\pm$ 0,47
Farelo de trigo	3,35 $\pm$ 0,32	7,91 $\pm$ 0,70
Polpa cítrica	17,80 $\pm$ 2,43	5,80 $\pm$ 0,19
Sabugo de milho	1,95 $\pm$ 0,08	10,04 $\pm$ 1,10

**Fonte:** Elaborado pelo autor. Valores médios e desvio padrão de triplicatas. O cultivo foi realizado sob condição estática em meio de Vogel, pH 6,5 suplementado com 1% (m/v) de cada fonte de carbono, incubado por 7 dias a 40 °C. ND: atividade não detectada sob as condições de reação.

Alguns estudos têm explorado a produção de ABF por fungos filamentosos cultivados em resíduos de laranja: Terrasan et al. (2010) obteve resultados similares com o cultivo de *Penicillium janczewskii* em casca de laranja (21,0 U/L), valores intermediários quando usado farelo de aveia no meio de cultura (4,0 U/L) e valores mais baixos com bagaço de cana-de-açúcar (0,2 U/L). Temer et al. (2015) observaram uma produção de 70,0 U/L de ABF por *P. janczewskii*, após a otimização do meio de cultivo utilizando como substrato casca de laranja.

Assim, dentre as fontes de carbono avaliadas na produção de ABF pela linhagem de *A. hortai*, o cultivo com casca de laranja e com polpa cítrica apresentaram as maiores atividades. Como o subproduto resultante da indústria de laranjas é a polpa cítrica e não a casca de laranja (obtida domesticamente), o primeiro foi selecionado como fonte de carbono para os experimentos subsequentes.

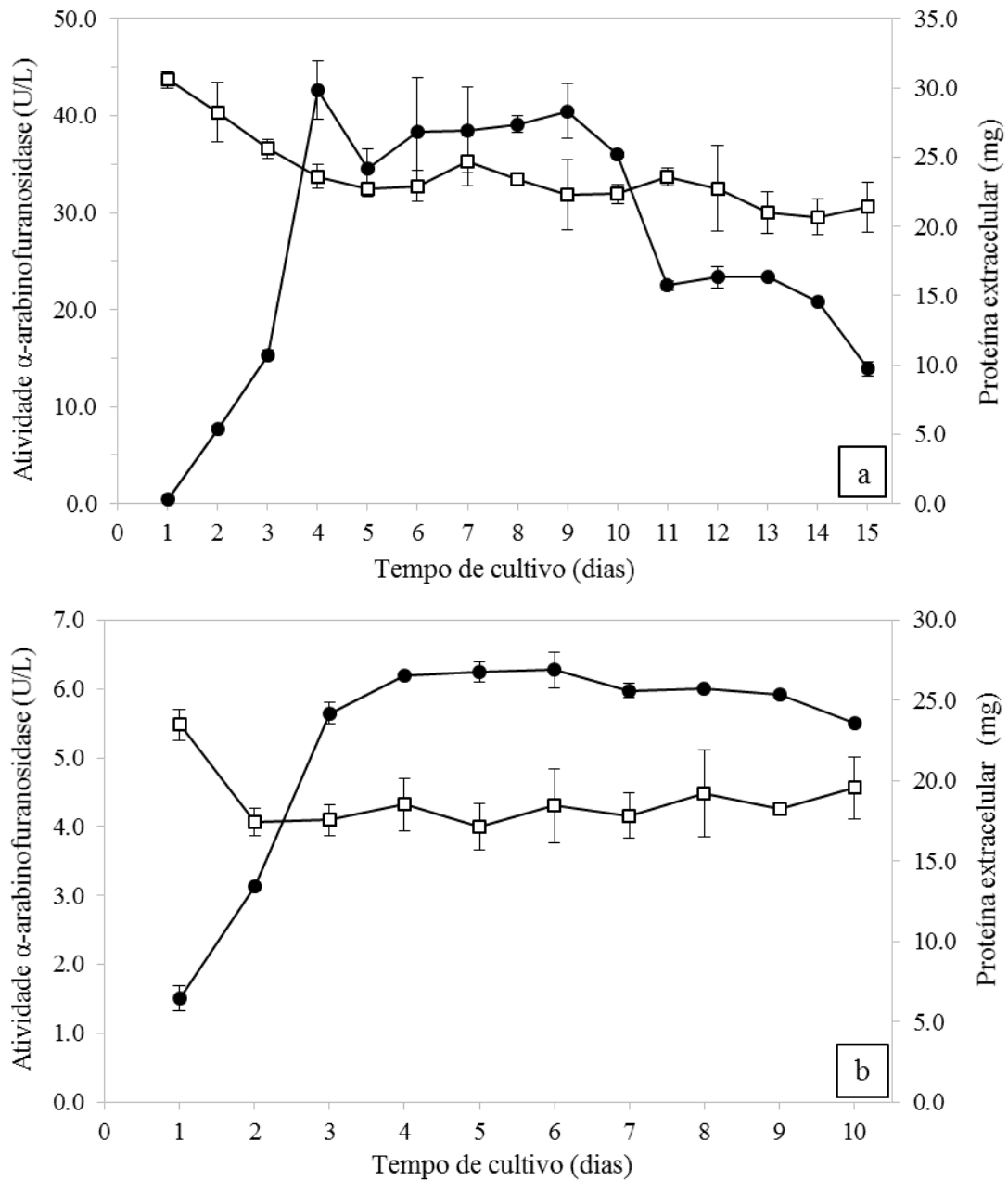
## 5.2. Influência dos dias de cultivo e da agitação sobre a produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase

A produção de ABF pode ser influenciada pela agitação, sendo que, em alguns casos esse fator favorece a produção da enzima. Guerfali et al. (2011) demonstraram que o cultivo de *Talaromyces thermophilus* em condição agitada foi a melhor condição observada, com uma produção de 250 U/L quando cultivado a 160 rpm; já Wu et al. (2016) cultivaram uma linhagem de *Chaetomium* sp. a 200 rpm e obtiveram uma atividade enzimática de 106,2 U/L.

Entretanto, nesse trabalho, comparando os picos de atividade das culturas realizadas em condição estática e estacionária, foi observado que os cultivos estáticos apresentaram atividades cerca de 6 vezes maiores do que aquelas obtidas em cultivos agitados, nos mesmos períodos. A atividade máxima obtida sob condição estática foi de 42,6 U/L no quarto dia de cultivo, enquanto que nos cultivos agitados a atividade permaneceu em torno de 6,0 U/L a partir do terceiro até o nono dia analisado (**Figura 11**). Sathishkumar et al. (2013) observaram que na produção de ABF por espécies de *Penicillium*, o aumento da agitação diminui a produção e que os melhores resultados foram obtidos em baixa agitação – 52 U/L a 133 rpm. Segundo o autor, agitações elevadas causam o aumento da força de cisalhamento sobre as células o que, consequentemente, pode causar a lise celular do fungo, diminuindo a produção de ABF e aumentando a degradação da ABF secretada pelas proteases que seriam liberadas no meio com

a morte da célula; a agitação vigorosa também pode aumentar a dispersão do ar no meio o que pode afetar a concentração da biomassa (SATHISHKUMAR et al., 2013) e a produção de ABF.

**Figura 11:** Produção de  $\alpha$ -arabinofuranosidase por *Aspergillus hortai*, por 15 dias sob cultivo estático (a) e por 10 dias agitado (120 rpm) (b). Os cultivos foram realizados em meio líquido de Vogel contendo 1% (m/v) de polpa cítrica, pH 6,5 a 40 °C. (●) Atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase (U/L) e (□) proteína extracelular (mg).



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 5.3. Metodologia de superfície de resposta para otimização da produção de $\alpha$ -arabinofuranosidase

O delineamento central composto rotacional foi realizado a fim de se obter respostas sobre a interação entre o pH e a temperatura, verificando a influência destes sobre a produção de ABF e obtendo os parâmetros ótimos de cultivo de *A. hortai* para uma produção otimizada. Para isso foram aplicados dois fatores independentes (pH e temperatura), cinco níveis de variação ( $\pm 1,41$ ;  $\pm 1$ ; 0) e três replicatas do ponto central, totalizando 11 experimentos. Os resultados de cada experimento podem ser visualizados na **Tabela 8**, que também apresenta os valores codificados e os valores reais das variáveis.

**Tabela 8:** Condições experimentais em valores reais (codificados) e resultados do desenho experimental para a produção de  $\alpha$ -arabinofuranosidase por *Aspergillus hortai*.

Experimento	Valores reais (codificados)		
	pH	Temperatura (°C)	$\alpha$ -arabinofuranosidase <sup>a</sup> (U/L)
1	3,87 (-1)	27,9 (-1)	131,60
2	8,13 (+1)	27,9 (-1)	0,00
3	3,87 (-1)	42,1 (+1)	3,62
4	8,13 (+1)	42,1 (+1)	0,00
5	3,00 (-1,41)	35,0 (0)	190,01
6	9,00 (+1,41)	35,0 (0)	5,76
7	6,00 (0)	25,0 (-1,41)	45,13
8	6,00 (0)	45,0 (+1,41)	0,00
9	6,00 (0)	35,0 (0)	84,85
10	6,00 (0)	35,0 (0)	81,25
11	6,00 (0)	35,0 (0)	86,44

**Fonte:** Elaborado pelo autor. <sup>a</sup>Resultados de atividade enzimática para cada experimento, cujo valor é a média de duplicatas, e cada atividade enzimática foi realizada em duplicata.

A maior produção de ABF foi observada no experimento 5 (190 U/L) e no experimento 1 (131,6 U/L). A atividade ABF não foi detectada em meios mais alcalino, como nos experimentos 2 e 4, tanto em temperaturas mais altas ou mais baixas (27,9 °C e 42,1 °C, respectivamente). Estes resultados estão de acordo com Guerfali et al. (2011) que sugeriu que a produção de ABF é induzida a valores baixos de pH, e com Paredes et al. (2015) que verificou que a produção de ABF diminui com o aumento do pH do meio.

Entretanto, mesmo em meio ácido, quando o fungo foi cultivado em temperatura mais elevada (experimento 8 – 45 °C) a atividade ABF não foi detectada. Quando comparadas a atividade a 35 °C (pontos centrais – experimentos 9, 10 e 11) e a 25 °C (experimento 7) é

possível verificar que a produção foi reduzida à metade. Alguns artigos relatam que a maior produção de ABF foi observada, principalmente, quando o micro-organismo foi cultivado a temperaturas em torno de 30 e 37 ° C (YAN et al., 2012; SATHISHKUMAR et al., 2013; PAREDES et al., 2015; PATEL et al., 2015;).

De acordo com a análise de variância (ANOVA), baseado no teste F, todos os termos para pH e temperatura foram significativos ( $p < 0,1$ ), exceto o termo quadrático para pH ( $p > 0,1$ ), o qual foi eliminado do modelo, resultando na **Tabela 9**. A análise dos dados de regressão múltipla resultou em uma equação polinomial de segunda ordem (**Equação 4**) que prediz a produção de ABF em função do pH e da temperatura (T);

$$\text{Equação 4} \quad \text{ABF (U/L)} = 84,50 - 49,52 \cdot \text{pH} - 24,02 \cdot T - 37,72 \cdot T^2 + 31,99 \cdot \text{pH} \cdot T$$

**Tabela 9:** Análise de variância (ANOVA) do modelo polinomial de segunda ordem e os valores dos coeficientes dos fatores significantes na produção de  $\alpha$ -arabinofuranosidase por *Aspergillus hortai*.

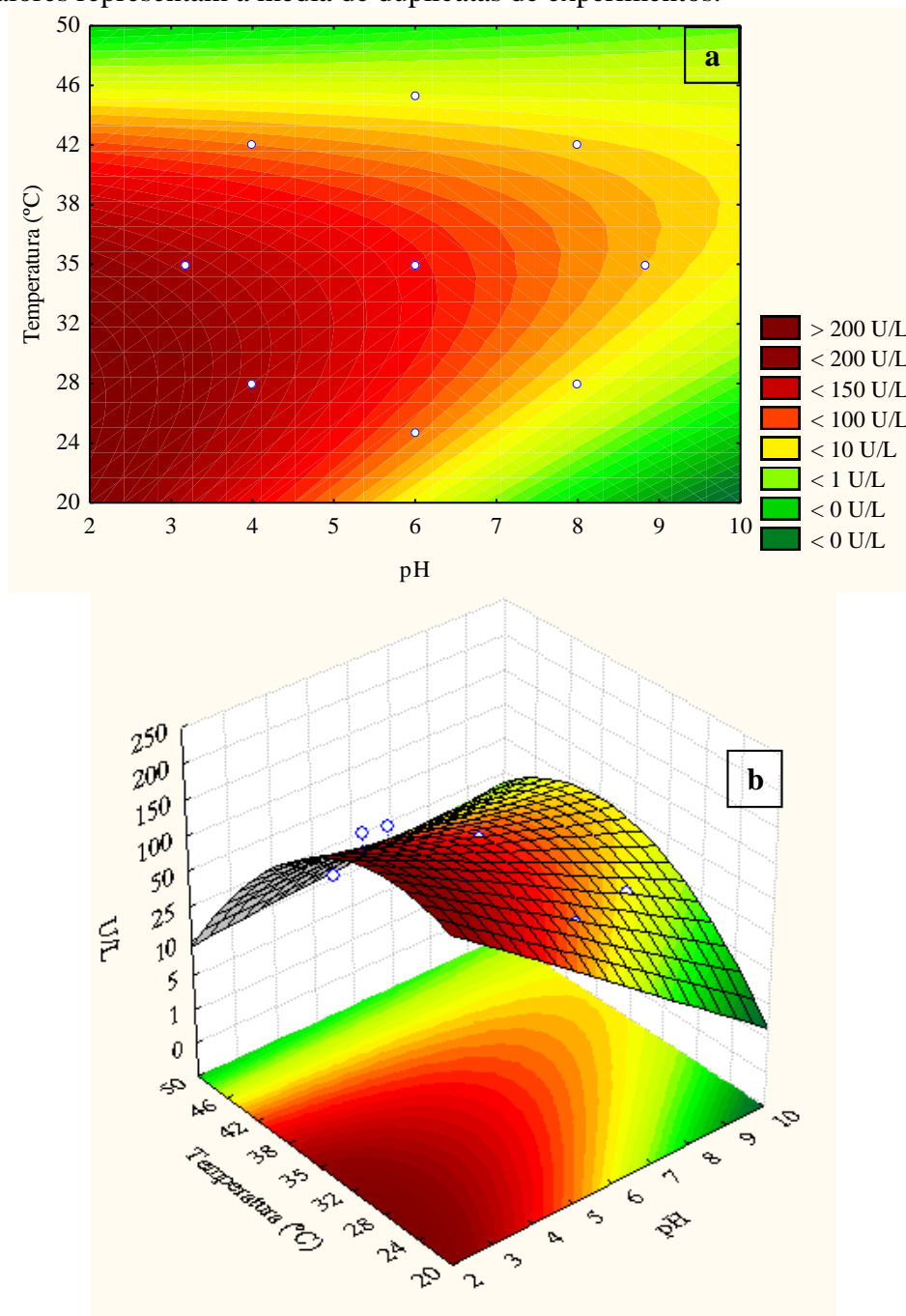
Fonte de variação	$\alpha$ -arabinofuranosidase				
	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
<b>Regressão do modelo</b>	4	36.968,95	9.242,24	14,29	0,050
<b>Resíduo</b>	6	3.879,55	646,59		
<b>Ajuste</b>	4	3.865,40	966,35	136,59	0,049
<b>Erro puro</b>	2	14,15	7,07		
Fator	Coeficientes		p-valor		
Intercepto	84,50		0,0002		
pH	-49,53		0,0003		
T	-24,03		0,0015		
T <sup>2</sup>	-37,72		0,0008		
pH.T	31,99		0,0017		

**Fonte:** Elaborado pelo autor.  $R^2 = 0,90$ ; F tabelado ao nível de 10% de probabilidade = 3,18.

O ajuste da equação do modelo foi significativo, já que o R quadrado foi 0,90, indicando que 90% da variabilidade nos valores de resposta observados, de produção de ABF, podem ser explicados pelos fatores experimentais e suas interações. O modelo foi preditivo como uma função de pH e temperatura, uma vez que o F calculado (14,29) foi maior do que o F listado (3,18) à um nível de confiança de 10%. O baixo p-valor também indica a significância do modelo. Portanto, o modelo codificado na **Equação 4** foi usado para plotar a curva de superfície

de resposta (**Figura 12**) e para calcular as condições necessárias para a obtenção de maior atividade de ABF no extrato bruto.

**Figura 12:** Superfície de contorno (a) e curva de superfície de resposta (b) resultante da análise do efeito do pH e da temperatura sobre a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Os cultivos foram realizados em meio de Vogel com 1% (m/v) de polpa cítrica por 4 dias sob condição estática. Nos gráficos acima, as variáveis pH e T °C foram representadas em valores codificados. O gradiente de diferentes cores indica a atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase em U/L, cujos valores representam a média de duplicatas de experimentos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O estudo do efeito do pH e da temperatura sobre a produção enzimática é importante para definir as condições ótimas de produção. O uso de análises estatísticas combinadas com método de superfície de resposta para identificar os valores ótimos de pH e temperatura, é a estratégia mais efetiva para verificar a interação desses parâmetros (FARINAS et al, 2010).

A partir da análise estatística foi verificado que o pH e a temperatura ótimos para a produção de ABF por *A. hortai* foi pH 2,5 e 30 °C, e o máximo valor de atividade predito foi de 200,89 U/L, calculado pela **Equação 4** com os valores codificados para essas variáveis. A média observada na validação experimental, realizada sob as condições otimizadas foi de 196,82 U/L, um valor muito próximo ao valor predito, mostrando a validação do modelo. Todos os passos de otimização resultaram em um filtrado bruto contendo mais de 15 vezes a atividade de ABF em comparação com a quantidade de enzima nos cultivos iniciais.

#### 5.4. Purificação da $\alpha$ -arabinofuranosidase produzida por *Aspergillus hortai*

O filtrado bruto contendo a ABF extracelular produzida por *A. hortai* sob condições otimizadas, com 281,86 U/L de atividade e 0,031 U/mg de proteína, foi submetido a três passos de purificação, cujo resultado está resumido na **Tabela 10**.

A precipitação de proteínas, usando de 25 a 65% de saturação com sulfato de amônio, foi o primeiro passo aplicado sobre o extrato bruto. Nesse processo, cerca de 72% da atividade enzimática foi recuperada.

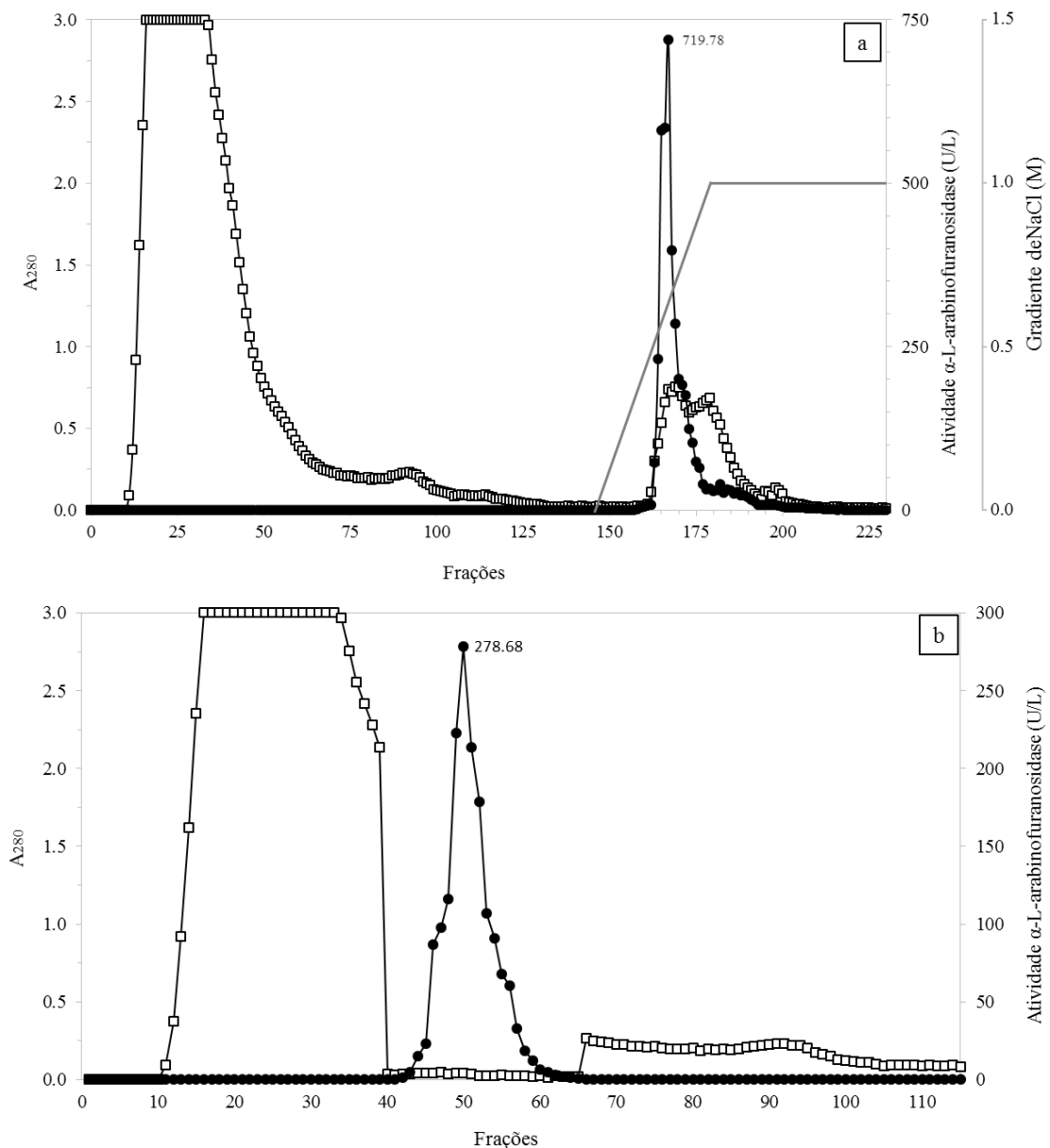
**Tabela 10:** Purificação da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por *Aspergillus hortai*.

Etapa de purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg de proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Filtrado bruto	28,19	900,76	0,031	100,0	1,0
Precipitação entre 25-65% de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20,26	89,95	0,225	71,9	7,2
CM Sephadex C-50 pH4.5	15,86	8,96	1,770	56,3	56,6
Sephadex G-100	2,85	1,55	1,837	10,1	58,7

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Em seguida, a amostra obtida foi aplicada em uma coluna cromatográfica de interação catiônica, sendo que a eluição das proteínas ligadas foi realizada com um gradiente crescente de NaCl, resultando em um único pico de atividade ABF, como pode ser visualizado na **Figura 13a**. As frações contendo o pico de atividade, foram reunidas formando uma nova amostra contendo 528,69 U/L de atividade ABF.

**Figura 13:** Perfis cromatográficos da purificação da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produzida por *Aspergillus hortai*. (a) Cromatografia de troca iônica em resina CM Sephadex C-50 equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e eluída com gradiente molar de NaCl (0-1M) no mesmo tampão. (b) Filtração em gel com Sephadex G-100 equilibrada com tampão acetato de amônio 50 mM, pH 4,0. Os fluxos das colunas foram de 58,0 mL/h (a) e 20,0 mL/h (b). ( $\square$ )  $A_{280}$  nm, ( $\bullet$ ) Atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e (—) gradiente salino.

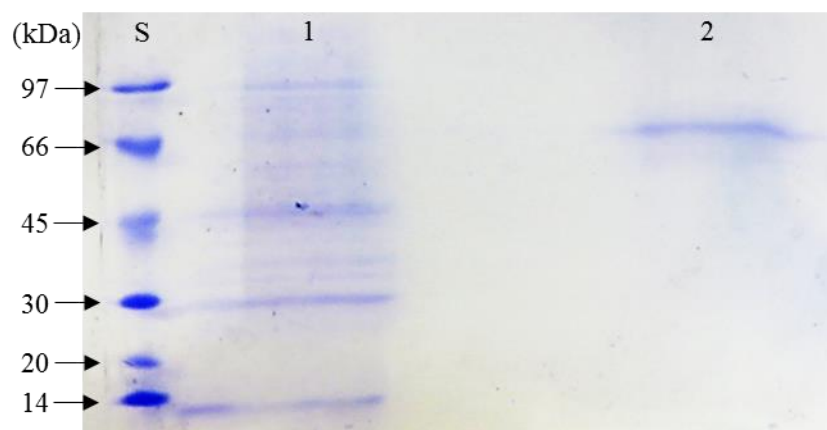


Fonte: Elaborado pelo autor.

Após passar por liofilização a amostra foi ressuspensa em tampão e aplicada em uma coluna de exclusão molecular ou filtração em gel, sendo eluída em um único pico com atividade ABF (**Figura 13b**). Este pico foi reunido, em uma amostra com 154,15 U/L de atividade ABF. Esta amostra, então, foi aplicada em um gel de eletroforese, no qual apresentou homogeneidade eletroforética. O processo de purificação da ABF produzida por *A. hortai* apresentou 10,12% de recuperação e fator de purificação de 58,70 (**Tabela 10**). A ABF purificada apresentou uma atividade específica de 1,83 U/mg de proteína.

A análise eletroforética (**Figura 14**) revelou que a banda correspondente a ABF apresentou massa molecular de aproximadamente 74 kDa, o qual foi um valor similar a massa molecular estimada na filtração em gel de 76,34 kDa, o que indica que essa enzima é monomérica. A massa molecular da ABF produzida por *A. hortai* está de acordo com a massa molecular de outras ABFs isoladas de diferentes fungos: Damásio et al. (2012) isolou uma ABF produzida por *A. niveus* com massa molecular de 88,60 kDa; Chimpango et al. (2012) estimou a massa molecular de uma ABF, produzida por um mutante de *A. niger*, em 67,5 kDa; Gonçalves et al. (2012) também purificou uma ABF, produzida por uma linhagem recombinante de *A. nidulans*, estimando sua massa molecular em 60 kDa.

**Figura 14:** Perfil de SDS-PAGE (8-18%) das proteínas padrões e das amostras contendo ABF. Linha S: proteínas padrões de baixo peso molecular; linha 1: filtrado bruto; linha 2  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase purificada.



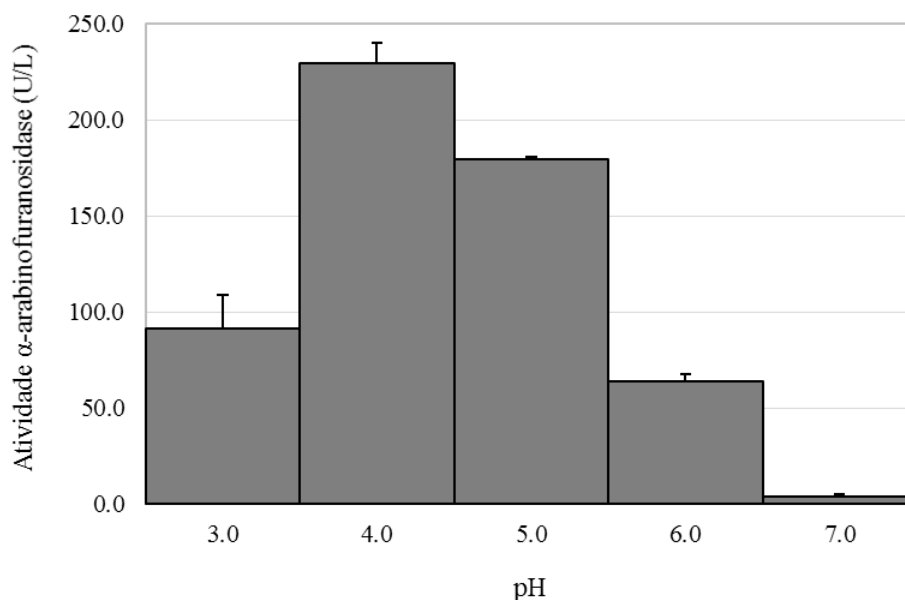
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 5.5 Propriedades da $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada

### 5.5.1. Temperatura e pH ótimos de reação

Na determinação das condições ótimas de atividade da enzima o efeito do pH sobre a atividade enzimática foi verificado, como ilustrado na **Figura 15**. A ABF apresentou maior atividade na região ácida, com pH ótimo em 4,0 sendo o valor de atividade de aproximadamente 230 U/L. Em pH 5,0 a atividade também foi elevada com valor aproximado de 180 U/L. A atividade enzimática foi notadamente afetada com o aumento do pH para região menos ácida e neutra, onde a atividade reduziu em mais de 80%. Isso deve ocorrer devido a alterações na configuração da enzima, devido a mudança no estado de ionização de certos grupos da proteína.

**Figura 15:** Efeito do pH sobre a atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada. Atividade realizada em tampões McIlvaine de diferentes valores de pH, utilizando  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo 5,5 mM como substrato à 50 °C. Valores médios de triplicatas e seus desvios padrões.



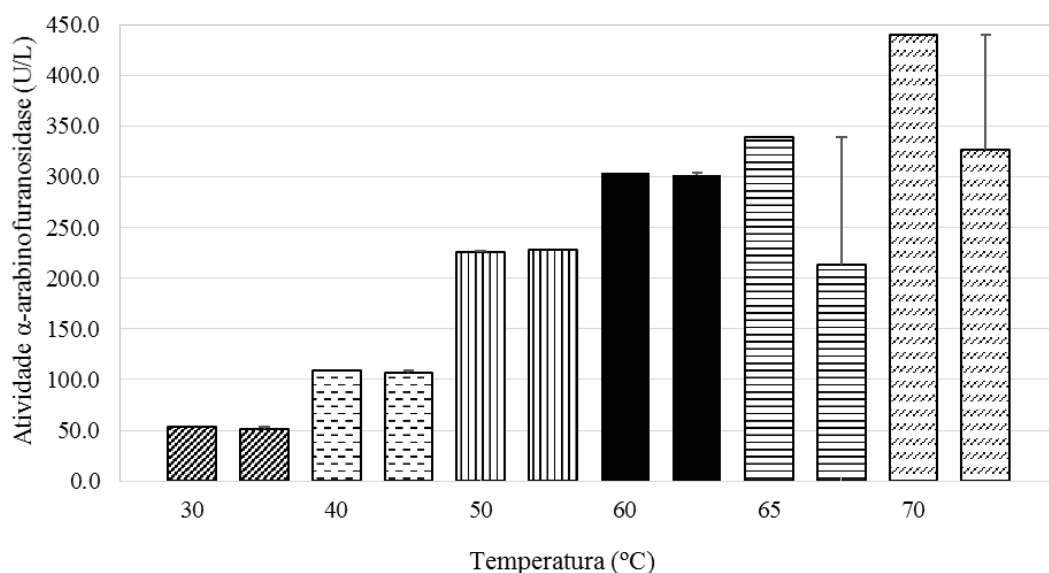
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Alguns trabalhos indicam que ABFs produzidas por fungos apresentam pH ótimos ácidos, geralmente entre 4,0 e 5,0. Kaneko et al. (1993) isolaram uma ABF de *Aspergillus niger* e verificaram que seu ótimo era pH 4,0. Patel et al. (2015) isolaram uma nova linhagem de *Aspergillus niger* e verificaram que o pH ótimo de sua ABF também foi 4,0, utilizando pNPArA como substrato, à 55 °C. Pérez & Eyzaguirre (2016) isolaram duas ABFs de *Aspergillus fumigatus* e caracterizaram suas atividades determinando valores de pH ótimo entre 4,5 e 5,0 para ambas. Wilkens et al. (2016) isolaram uma ABF de *Aspergillus nidulans*, que apresentou

pH ótimo de 5,5. Já Matsuzawa et al. (2015) avaliaram o pH ótimo de uma ABF mais resistente à variação de pH, isolada via *screening* funcional de uma biblioteca metagenômica de compostos microbianos, e determinaram que nos pH entre 5,5 e 9,0 ocorreram as maiores atividades.

Para determinação da temperatura ótima da atividade ABF, temperaturas entre 30 e 70 °C foram avaliadas usando tampão McIlvaine pH 4,0, em períodos de 5 e 10 min. Verificou-se que a faixa ótima de temperatura foi entre 60 °C e 70 °C, exibindo valor de atividade de 302,7 U/L a 60 °C. Em temperaturas mais elevadas – como a 65 e 70 °C – a atividade enzimática foi maior do que a 60 °C nos primeiros 5 min., porém aos 10 min. de reação, a atividade enzimática foi parcialmente perdida. Na **Figura 16** é possível verificar o comportamento da atividade ABF nas diferentes temperaturas avaliadas, mostrando a atividade para os tempos 5 e 10 min. Em trabalhos recentes, a determinação da temperatura ótima de reação de ABFs indica que no geral elas ocorrem entre 50 e 55 °C (PATEL et al., 2015; GUERFALI et al., 2010; MATSUZAWA et al. 2015; WILKENS et al., 2016), porém no trabalho de Pérez & Eyzaguirre (2016) as ABFs isoladas apresentaram temperaturas ótimas de 37 °C para a ABF I e de 42 °C para a ABF II.

**Figura 16:** Efeito da temperatura sobre a atividade da  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada. Atividade realizada em tampão McIlvaine pH 4,0, *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo 5,5 mM, em diferentes temperaturas. As barras com padronizações iguais indicam mesma temperatura, sendo a primeira barra, da esquerda para a direita, valores para 5 min, e a segunda barra, valores para 10 min de reação enzimática. Valores médios de triplicatas em cada tempo e desvio padrão entre os tempos 5 e 10 min.

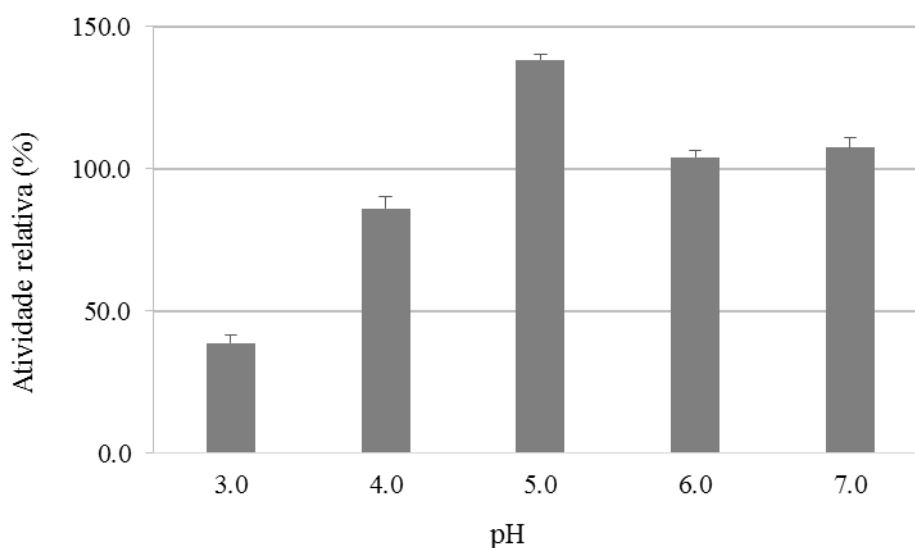


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 5.5.2. Estabilidade térmica e ao pH

Após incubação por 24 horas a 4 °C em tampão McIlvaine de pH 3,0 a 7,0, a atividade foi determinada e comparada com a atividade de cada controle, que correspondeu a ABF adicionada aos mesmos tampões sem incubação. A ABF se mostrou bastante estável na faixa de pH entre 4,0 e 7,0 apresentando valores de atividade relativa próximos a 100%, conforme **Figura 17**. Contudo, após a incubação em pH 5,0, a atividade ABF foi ativada, apresentando quase 40% mais atividade em relação ao controle sem incubação. Guerfali et al. (2010) também verificou uma ativação na atividade de uma ABF, quando incubada em pH 6,0, e estabilidade em 100 % na faixa de pH de 6,0 a 8,0. Patel et al. (2015) isolaram uma ABF e verificaram que ela permaneceu estável em mais de 87% de atividade em pH 4,0 após 3 h de incubação, resultado bastante similar ao apresentado neste trabalho. Porém quando eles incubaram por 3 horas em pH 7,0 ocorreu uma grande perda de atividade (PATEL et al., 2015). Yan et al. (2012) também verificaram uma estabilidade de 80% da atividade em pH 4,0 após 30 minutos de incubação de uma ABF isolada de *Chaetomium* sp.

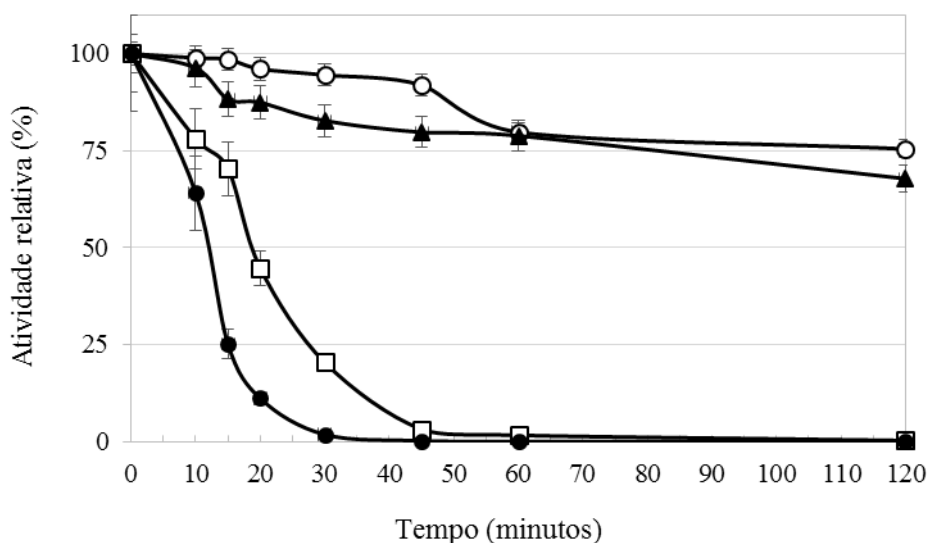
**Figura 17:** Estabilidade da atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase ao pH. As amostras foram incubadas em tampão McIlvaine com diferentes pH à 4 °C por 24 horas. As atividades foram realizadas com  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo 5,5 mM em tampão McIlvaine pH 4,0 a 60 °C. Atividade relativa ao controle (100%) de cada pH se refere a amostras adicionadas nos mesmos tampões sem incubação. Valores médios e desvios padrões de triplicatas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Quanto à termoestabilidade, a ABF de *A. hortai* apresentou elevada estabilidade nas temperaturas de 30 e 40 °C, com valores de atividade residual maiores que 70%, em relação ao controle, após 2 horas de incubação, conforme ilustrado na **Figura 18**. À 50 °C apresentou atividade de cerca de 50% após 20 min. A estabilidade da ABF de *A. hortai* em temperaturas mais elevadas do que a ambiente, como a 40 e 50 °C, além da estabilidade a meios ácidos são características favoráveis ao uso dessa enzima na sacarificação de biomassa lignocelulósica.

**Figura 18:** Termoestabilidade da atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada. Amostras incubadas às temperaturas de (○) 30 °C, (▲) 40 °C, (□) 50 °C e (●) 60 °C na ausência de substrato. As atividades foram realizadas utilizando  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo 5,5 mM em tampão McIlvaine pH 4,0 a 60 °C. Atividade relativa ao controle (100%) sem incubação. Valores médios de triplicatas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

De acordo com a **Equação 3** o  $t_{1/2}$  aproximado da ABF à 30 °C foi de 265 min (4,5 h), à 40 °C foi de 230 min (3 h e 50 min), à 50 °C foi de 13 min e à 60° foi de 5 min. O  $t_{1/2}$  calculado foi levemente diferente do tempo de perda de 50% da atividade, observado experimentalmente. Porém o cálculo reflete a estabilidade da enzima nos tempos que não foram realizados os experimentos (mais de 2 horas). O tempo de meia vida da enzima é bastante alto nas temperaturas de 30 e 40 °C, considerando a termoestabilidade de outras ABFs.

Diversos trabalhos relatam a estabilidade de ABFs à temperatura: Patel et al. (2015) isolaram uma ABF estável entre 45 e 55 °C, sendo que a 55 °C a atividade se manteve em mais de 82% da atividade inicial, após 3 h de incubação. Yan et al. (2012) verificaram que a ABF de *Chaetomium* sp. permaneceu estável a 55 °C por 30 min. Guais et al. (2010) detectaram uma

perda de 50% da atividade ABF a 60 °C após 12 min de incubação. Pérez & Eyzaguirre (2016) isolaram duas ABFs, sendo que a ABF II apresentou mais de 50% da atividade a 50 °C após 1 h de incubação. Guerfali et al. (2010) verificaram que a estabilidade da ABF isolada permaneceu próxima a 100% a 50 °C por 7 h. Os autores também verificaram que o  $t_{1/2}$  da ABF a 55 °C foi de 4 h e a 70 °C de 30 min (GUERFALI, 2010).

### 5.5.3. Influência de íons e substâncias

A tolerância da ABF purificada à presença de íons e outras substâncias também foi avaliada, conforme exposto na **Tabela 11**. A enzima apresentou tolerância à maioria dos íons testados, com exceção do  $\text{Fe}^{+2}$  na concentração de 10 mM e de  $\text{Zn}^{+2}$  em ambas as concentrações. Na presença de  $\text{Fe}^{+2}$  a atividade foi inibida decaindo de 10% da atividade do controle na concentração de 10 mM; já na presença de  $\text{Zn}^{+2}$ , a atividade diminuiu mais de 20% na concentração de 2 mM e quase 90% na concentração de 10 mM. Esses resultados indicam que os íons zinco podem inibir o mecanismo catalítico ou dificultar a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. ABF apresentou leve ativação na presença de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  a 2 mM e  $\text{Fe}^{+2}$  a 2 mM, com valores de atividade na presença desses íons de até 25% à mais da atividade controle. Já na presença de  $\text{Mg}^{+2}$  2 e 10 mM, a atividade de ABF foi aumentada de 35 a 45% em relação ao controle, respectivamente, e na presença de 10 mM de  $\text{Na}^{+}$  a atividade aumentou mais de 60%.

Na presença das substâncias testadas, a ABF apresentou ativação na presença de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), um agente quelante de íons metálicos, frequentemente utilizado na inibição de metaloproteases durante purificações, na preparação de extratos celulares ou ainda em soluções proteicas para evitar a oxidação por metais (MÓNICO et al., 2017). A adição desse reagente no meio pode ter ocasionado a imobilização de algum íon presente no meio reacional que interfere na reação enzimática, já que com 10 mM dessa substância no meio, a atividade aumentou em cerca de 50%.

Na presença de 2 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsufonil) a atividade enzimática não sofreu alteração, porém com 10 mM da substância a atividade ABF foi inibida em mais de 50%. Como PMSF é um inibidor de serino/cisteíno proteases ou endopeptidases, que se liga especificamente aos resíduos de serina ou de cisteína de uma proteína, a inativação por PMSF indica que a ABF apresenta resíduos de serina ou de cisteína fundamentais em seu sítio ativo, que estão envolvidas na catálise ou na manutenção da estrutura tridimensional da enzima (KARUTURI, 2017).

**Tabela 11:** Influência de íons e algumas substâncias sobre a atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada de *A. hortai*.

Íons e substâncias	Atividade relativa (%)	
	2 mM	10 mM
Controle	100,0	100,0
CaCl <sub>2</sub>	104,9 ± 5,4	112,3 ± 18,2
FeSO <sub>4</sub>	126,3 ± 6,8	88,7 ± 10,1
MgCl <sub>2</sub>	135,4 ± 6,4	144,2 ± 7,7
NaCl	115,2 ± 8,4	161,3 ± 8,6
ZnSO <sub>4</sub>	78,6 ± 5,6	11,2 ± 7,5
EDTA	117,9 ± 4,4	149,6 ± 11,2
PMSF	102,5 ± 2,3	46,1 ± 5,9
SDS	32,9 ± 10,3	13,3 ± 4,9
Triton X-100	184,2 ± 3,6	170,4 ± 2,8
Tween 20	184,5 ± 1,1	178,5 ± 0,2
Tween 80	192,0 ± 0,6	196,4 ± 0,3
	<b>10%</b>	<b>20%</b>
DMSO	132,3 ± 6,5	118,3 ± 7,2
Etanol	124,3 ± 6,5	50,9 ± 8,2

**Fonte:** Elaborado pelo autor. Atividades realizadas com  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo 5,5 mM em tampão McIlvaine pH 4,0 a 60 °C. Atividade controle (100%) referente a atividade verificada sem adição de substâncias. Valores médios de triplicatas.

Na presença do detergente aniônico SDS, que em solução aquosa liberam íons orgânicos com cargas negativas, que interagem com a proteína, desnaturando-a, a atividade ABF foi fortemente reduzida. Na presença de detergentes não iônicos como Triton X-100 e Tween 20, a atividade ABF foi ativada em mais de 70%, e na presença de Tween 80 a atividade dobrou. Esses detergentes são bastante utilizados em soluções de proteínas para evitar que essas moléculas se agreguem pois em baixas concentrações esses reagentes são bem efetivos na função de estabilização de proteínas. O mecanismo de ação desses surfactantes não iônicos ainda não foi totalmente esclarecido, mas admite-se que eles protegem as proteínas de ligação à superfície, pois eles competem com as mesmas pelas superfícies ligando-se a regiões

hidrofóbicas da proteína e, com isso, diminuindo a interação molecular entre elas (AGARKHED et al., 2012).

A influência de DMSO (dimetilsulfóxido) sobre a atividade ABF também foi avaliada, e verificou-se que houve ativação de cerca de 30%, quando na concentração de 10%, mas à 20% a ativação diminuiu para cerca de 18%. DMSO, um solvente orgânico, geralmente é utilizado para preparar soluções estoque por apresentar baixa reatividade química e baixa pressão de vapor. Segundo Tjernberg et al. (2006), DMSO pode afetar as propriedades de uma proteína em solução, levando a desnaturação da proteína por agregação ou degradação. Mas isso não ocorre com todas as proteínas, pois em alguns casos DMSO não altera a atividade enzimática (TJERNBERG et al., 2006).

Na presença de etanol à 10% de concentração, a atividade ABF foi ativada em cerca de 25% e na concentração de 20% a atividade reduziu para 50% da atividade do controle. Uma ABF estável e tolerante ao etanol é importante para processos que envolvam a utilização desse composto, como na produção de etanol de 2<sup>o</sup> geração por exemplo, onde a enzima e o etanol podem estar presentes simultaneamente. Zietsman et al. (2011) isolaram uma ABF clonada em *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram que na concentração de 16% de etanol a ABF manteve cerca de 60% de atividade. Michlmayr et al. (2011) isolaram uma ABF de *Oenococcus oeni* e duas de *Lactobacillus brevis* e verificaram a influência do etanol sobre suas atividades nas concentrações de 6 e 12%; como resultado, obtiveram uma redução de cerca de 50% da atividade das três ABFs, porém em ambas concentrações de etanol as ABFs de *L. brevis* foram mais tolerantes que a ABF de *O. oeni*.

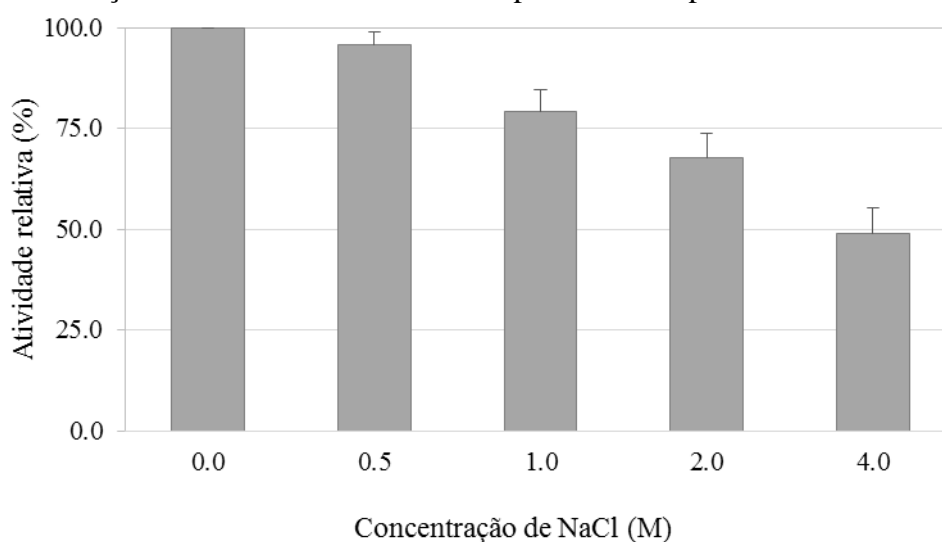
Em trabalhos recentes a influência de íons e metais sobre a atividade ABF foi avaliada. Alias et al. (2011) avaliaram a influência de íons sobre a atividade ABF de *Aspergillus niger* e verificaram que a enzima sofreu leve inibição, em torno de 10%, na presença de  $Zn^{+2}$ , mas sofreu forte inibição, com perda de mais de 50% da atividade, na presença de  $Fe^{+2}$  e  $Cu^{+2}$ . Assim como em nosso trabalho, os autores verificaram pequena inativação na presença de DMSO e ativação na presença de EDTA e de Triton X-100 (ALIAS et al., 2011). Yan et al. (2012) verificaram a influência de 1 mM de  $Fe^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$  e de SDS, que diminuíram a atividade em 10%, 5% e 30%, respectivamente, sendo a atividade ABF aumentada na presença de EDTA (119%) e  $Mg^{+2}$  (109%). Shi et al. (2014) verificaram que a ABF isolada de *Thermotoga thermarum*, apresentou forte inibição (cerca de 40%) na presença de 0,05% de EDTA, resultado oposto ao obtido em nosso trabalho. Isso sugere que a ABF de *Thermotoga thermarum* necessita de algum íon metálico para atividade ABF satisfatória. Temer et al. (2014) verificaram a influência de alguns íons e substâncias sobre a atividade ABF presente no filtrado bruto de uma cultura de

*Penicillium janczewskii*. Essa enzima sofreu inibição na presença de  $Zn^{+2}$  (33%),  $Mg^{+2}$  (43%), EDTA (35%), PMSF (78%) e SDS (95%), sendo uma ABF mais sensível à presença dessas íons e substâncias em comparação à isolada de *A. hortai* neste trabalho. Matsuzawa et al. (2015) verificaram que a ABF clonada sofreu inativação na presença de etanol (à 10% - inibiu 83% da atividade e à 25% inibiu 93%), DMSO (70%),  $Zn^{+2}$  (90%) e  $Cu^{+2}$  (97%). Os autores também verificaram que a adição de  $Mn^{+2}$  ao meio reacional resultou em um aumento de cerca de 50% da atividade, e que a adição de  $Ca^{+2}$  aumentou cerca de 25% da atividade inicial.

#### 5.5.4. Tolerância e estabilidade ao NaCl da $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada

A tolerância da atividade ABF foi avaliada na presença de diferentes concentrações de NaCl, conforme exposto na **Figura 19**. Como podemos verificar, a ABF apresentou alta tolerância (mais de 50% de atividade) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 M de NaCl. Já na concentração de 4 M a atividade foi reduzida a mais de 50%, em relação ao controle, mas ainda assim mais de 40% da atividade foi mantida. São poucos os trabalhos que descrevem a influência/tolerância de NaCl, nessas concentrações, sobre a atividade ABF. Hashimoto & Nakata (2003) verificaram que a atividade de uma ABF de *Aspergillus oryzae* nas concentrações de 2,0 e 4,0 M se manteve maior do que 50%, em ambas as concentrações.

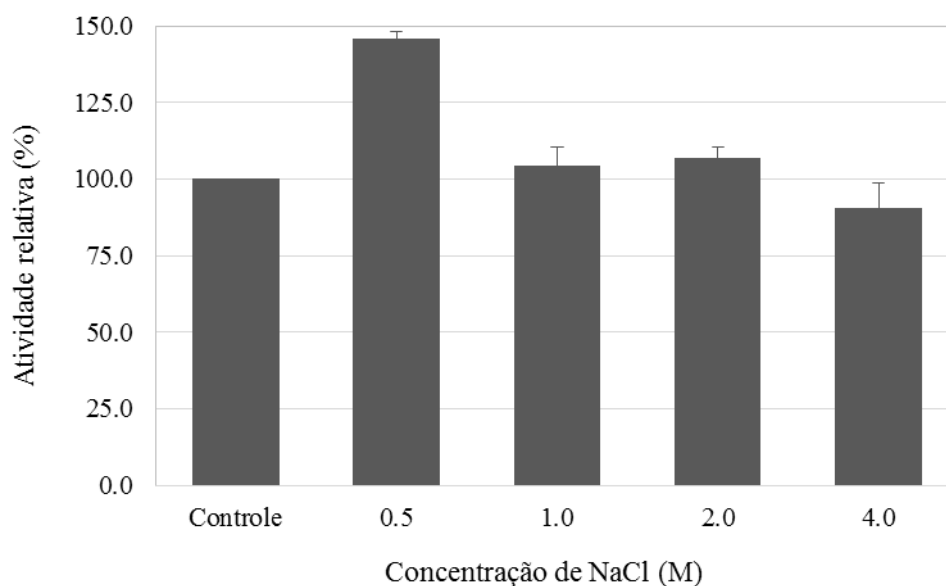
**Figura 19:** Efeito do NaCl sobre a atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase. Atividades realizadas com  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo 5,5 mM em tampão McIlvaine pH 4,0 à 60 °C, na ausência (controle - 100%) e na presença de NaCl em diferentes concentrações. Valores médios e desvios padrões de triplicatas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A estabilidade da ABF em diferentes concentrações de NaCl também foi avaliada, e de acordo com o gráfico na **Figura 20**, verifica-se que a atividade ABF foi ativada na presença de 0,5 M de NaCl. Isso pode ter ocorrido, pois, a presença de sal em uma solução de enzimas pode sequestrar parte da água ao redor da proteína, expondo mais o seu sítio catalítico e permitindo que o substrato se ligue mais eficientemente à enzima (KARAN, 2012).

**Figura 20:** Estabilidade ao NaCl da atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase. Amostras incubadas em diferentes concentrações de NaCl por 24 horas à 25 °C. Atividades realizadas com  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo 5,5 mM em tampão McIlvaine pH 4,0 a 60 °C. Atividade controle (100%) correspondeu a ABF mantida a 25 °C por 24 horas na ausência de NaCl. Valores médios e desvios padrões de triplicatas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

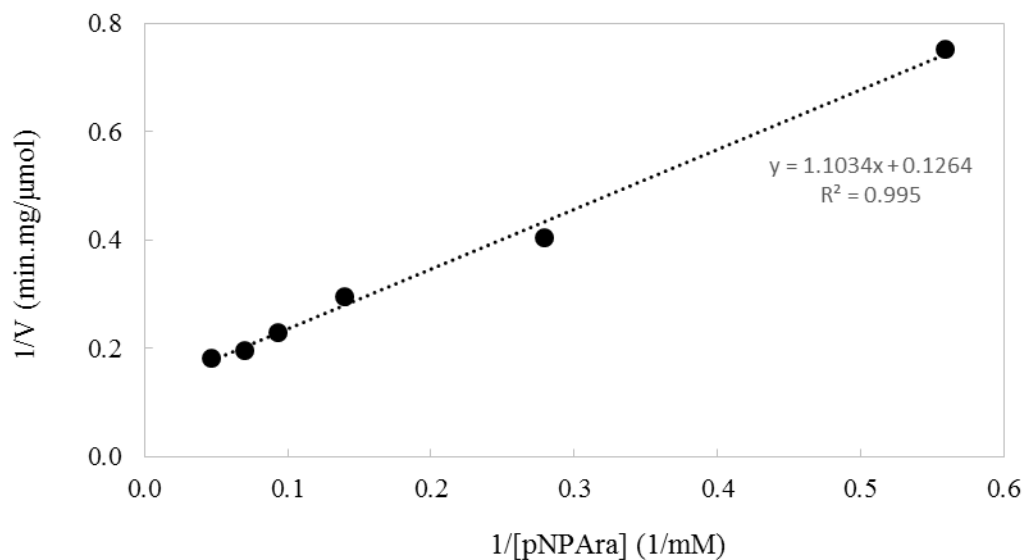
Nas concentrações de 1,0 e 2,0 M a atividade se manteve praticamente a mesma do controle, o que indica que a presença de sal na solução pode conservar a atividade enzimática, visto que aumenta a estabilidade da enzima por períodos mais longos e a temperaturas mais elevadas em comparação ao teste de estabilidade ao pH descrito no **item 5.5.2**. Essas propriedades apresentadas pela ABF de *A. hortai* sugerem que se trata de uma enzima halotolerante, resultados já esperados pelo fato do micro-organismo ter sido isolado de solo próximo a lagoas salinas. Enzimas halotolerantes apresentam em sua composição grande parte de resíduos de aminoácidos ácidos, especialmente glutamato, o que confere à proteína maior estabilidade na presença de elevadas concentrações salinas (OREN, 2002; KARAN et al., 2012). Essas características demonstram o potencial de aplicação dessa ABF em diversos

processos biotecnológicos com alta salinidade como, por exemplo, na hidrólise de hemiceluloses extraídas pelo método alcalino.

#### 5.5.5. Parâmetros cinéticos

A ABF foi avaliada quanto aos seus parâmetros cinéticos, utilizando-se o substrato sintético  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo. O gráfico obtido pode ser visualizado na **Figura 21**. Assim, a partir do gráfico da concentração de substrato *versus* a velocidade de reação, verifica-se que a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) para a ABF nas condições de atividade ótima foi de 8,73 mM e que a velocidade máxima de reação correspondeu a 7,91  $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$  de proteína. O número de renovação enzimática ( $K_{\text{cat}}$ ) da ABF purificada calculado, considerando a massa molecular da ABF de 75 kDa, foi de 0,59/min.

**Figura 21:** Gráfico duplo-recíproco da atividade  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada. Atividades realizadas com diferentes concentrações de  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo em tampão McIlvaine pH 4,0 a 60 °C. Valores médios de triplicatas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Yan et al. (2012) determinaram  $K_m$  e  $V_{\text{máx}}$  de uma linhagem de *Chaetomium* sp. e verificaram que  $K_m$  foi de 1,43 mM e  $V_{\text{máx}}$  foi de 68,3  $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$  de proteína. Shi et al. (2014) verificaram que  $K_m$ ,  $V_{\text{máx}}$  e  $K_{\text{cat}}$  de uma ABF da família GH 2 isolada de *Thermotoga thermarum*, foram de 0,77 mM e 2,3  $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$  e 4,52/s, respectivamente. Siguier et al. (2014) relataram os valores de  $K_m$  de duas ABFs, uma isolada de *Podospora anserina* de 6,1 mM e outra de *Ustilago maydis* de 7,5 mM, semelhantes ao determinado neste trabalho.

### 5.5.6. Especificidade por substratos

A especificidade por substratos foi avaliada para a ABF purificada, bem como no filtrado bruto em presença de outras enzimas do complexo xilanolítico do cultivo otimizado de *A. hortai*. Para isso foram utilizados alguns substratos sintéticos como  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo ( $\rho$ NPAra),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -xilopiranosídeo ( $\rho$ NPXyl),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NPGal),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NPGli). Os resultados podem ser visualizados na **Tabela 12**.

**Tabela 12:** Atividades enzimáticas presentes no filtrado bruto e especificidade ao substrato da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase purificada.

Substrato	Extrato bruto	ABF purificada	
	Atividade (U/L)	Atividade (U/L)	Atividade relativa* (%)
$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo	162,9 $\pm$ 3,4	448,4 $\pm$ 22,6	100,0
$\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -xilopiranosídeo	36,9 $\pm$ 0,7	9,4 $\pm$ 0,7	2,1
$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo	467,3 $\pm$ 26,1	2,2 $\pm$ 0,1	0,5
$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo	199,9 $\pm$ 9,5	1,9 $\pm$ 0,2	0,4

**Fonte:** Elaborado pelo autor. \*Relativa à atividade no substrato  $\rho$ NPAra. Determinação de atividade em tampão McIlvaine pH 4,0 a 60 °C. Valores médios de triplicatas.

De acordo com os resultados obtidos, verificamos que a enzima purificada apresenta alta afinidade pelo substrato  $\rho$ NPAra e baixa atividade sobre os demais substratos testados. Portanto, a ABF de *A. hortai* apresenta especificidade pela ligação  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, não apresentando bifuncionalidade.

Já com o filtrado bruto, verifica-se atividade sobre outros substratos, devido à presença de atividade  $\beta$ -glicosidase e, principalmente, atividade galactosidase. Estas enzimas em conjunto podem atuar sobre materiais hemicelulósicos, degradando as cadeias laterais e extremidades de estruturas constituídas por glicose, galactose, xilose e arabinose.

Yan et al. (2012) e Shi et al. (2014) verificaram que a atividade ABF máxima em seus isolados ocorreu em  $\rho$ NPAra, não sendo detectada atividade em outros derivados de  $\rho$ -nitrofenol nem em substratos naturais. Matsuzawa et al. (2015) isolaram uma enzima bifuncional que apresentou atividade  $\beta$ -xilosidase e  $\alpha$ -arabinofuranosidase com aproximadamente o mesmo valor de atividade sobre os respectivos substratos, não apresentando mais de 5% de atividade sobre os demais substratos avaliados.

## 5.6 Caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte e extração de hemiceluloses.

### 5.6.1 Caracterização dos materiais in natura

Pelo método de caracterização química (hidrólise ácida) do bagaço de cana-de-açúcar e do bagaço de malte, foi possível verificar a composição das biomassas in natura. O bagaço de cana-de-açúcar apresentou quase 30% de celulose, 16% de hemicelulose e 20% de ligninas totais (**Tabela 13**).

**Tabela 13:** Composição química de bagaço de cana-de-açúcar e de malte in natura.

Biomassa	Composição (% base massa seca)				
	Celulose	Hemicelulose	Lignina*	Extrativos	Umidade
Bagaço de cana-de-açúcar	27,8 ± 3,5	16,0 ± 1,7	19,8 ± 1,6	2,5 ± 0,1	3,6 ± 0,5
Bagaço de malte	19,8 ± 2,4	20,0 ± 2,4	19,0 ± 1,4	8,9 ± 0,9	4,0 ± 0,1

**Fonte:** Elaborado pelo autor. \*Lignina solúvel e insolúvel. Valores médios e desvios padrões de triplicatas.

Bagaço de malte apresentou cerca de 3 vezes mais extrativos do que o bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados de composição de biomassa diferem bastante de acordo com a variedade da planta, região de plantação (estado, país), fatores ambientais e climáticos, entre outros. Os valores obtidos nesse trabalho condizem com outros artigos que descrevem a composição desses materiais: Rezende et al. (2011) caracterizaram bagaço de cana-de-açúcar do interior de São Paulo, Brasil, e verificaram que o material apresentou 35% de celulose, 24% de hemicelulose e 22% de lignina. Em trabalho publicado em 2016, conduzido por Slutter et al., a composição de uma única amostra de bagaço de cana-de-açúcar, proveniente de uma fazenda em Araras (Brasil), foi verificada em 8 laboratórios brasileiros diferentes, utilizando o mesmo método de caracterização do presente trabalho, com o objetivo de determinar as diferenças na análise da composição do bagaço de cana-de-açúcar entre os diversos pesquisadores. Com isso foi concluído que houve pouca variação nos resultados dos diversos laboratórios e em média a composição daquela amostra de bagaço de cana-de-açúcar foi 42% de celulose, 25% hemicelulose e 21% de lignina (SLUTTER et al., 2016).

Já a caracterização do bagaço de malte neste trabalho, revelou a composição em cerca de 20% de celulose, 20% de hemicelulose e 20% de lignina total (**Tabela 13**). Não foi verificado o teor de proteínas nesse material, mas pelas análises experimentais, verificou-se a presença de proteínas no material extraído, mas esse componente não foi quantificado. Os valores de cada componente foram condizentes com os dados encontrados na literatura. Del Ríó et al. (2013) verificaram a composição de bagaço de malte, proveniente de uma cervejaria na Inglaterra, obtendo valores de 50% de carboidratos (celulose e hemiceluloses), 15% de lignina, 15% de proteínas e 10% de lipídios. Trabalhos na literatura mostram que o bagaço de malte é um material rico em proteínas. Mathias et al. (2015) caracterizaram o bagaço de malte proveniente de uma cervejaria no Rio de Janeiro (Brasil) e verificaram que cerca de 30% deste material é constituído por proteínas. Em revisão bibliográfica realizada por Aliyu & Bala em 2011, diversos trabalhos que estudaram a caracterização do bagaço de malte, foram citados, e em média as amostras avaliadas apresentaram 21% de celulose, 30% de hemicelulose, 20% de lignina e 20% de proteínas.

#### *5.6.2 Extração e caracterização química de hemiceluloses*

O processo de extração de hemiceluloses de bagaço de cana-de-açúcar e de malte foi realizado, obtendo-se em média, rendimento de 60% de hemiceluloses. Assim com a utilização de cada 10 gramas de material in natura, cerca de 1 e 1,2 gramas de hemiceluloses foram obtidas de bagaço de cana-de-açúcar e de malte, respectivamente. O rendimento de extração pode ser aumentado com a otimização das condições de extração para cada tipo de biomassa utilizada, pois nesse processo, parte das hemiceluloses pode ser degradada, dependendo das condições de extração. Doner & Hicks em 1997, relataram um dos primeiros experimentos a utilizar peróxido de hidrogênio em solução alcalina, na extração de hemiceluloses de fibra de milho. O rendimento de extração máximo foi de 42%. Fang et al. (2000) também utilizaram a extração alcalina na presença de peróxido para extrair hemiceluloses de palha de centeio. Os autores testaram diversas temperaturas e condições de extração e obtiveram rendimento de extração de cerca de 70%.

A deslignificação e solubilização de hemiceluloses utilizando tratamento alcalino na presença de peróxido de hidrogênio é bastante influenciado pelo pH da reação. Sob pH muito alcalinos, idealmente a pH 11,6 a deslignificação e a solubilização são mais eficientes, devido a presença de maior concentração de íons hidróperóxido ( $\text{HOO}^-$ ) que atacam a lignina. Já pH mais elevados que 11,6 devem ser evitados pois aceleram a decomposição do peróxido, o que reduz o rendimento de extração da solução (FANG et al., 2000). Por outro lado, durante a reação

de solubilização, o pH do meio reacional aumenta até cerca de pH 13,0, mas essa condição favorece a extração, pois Fang et al. (2000) adicionaram ácido à um experimento de extração durante o período de reação, para manter o pH constante em 11,5 e verificaram que o rendimento de extração diminuiu em relação aos que não foram controlados.

Nenhum trabalho foi encontrado na literatura com a descrição da extração de hemiceluloses de bagaço de malte com o uso de solução alcalina de peróxido de hidrogênio e poucos trabalhos descrevem a extração de hemiceluloses a partir de cana-de-açúcar. Brienzo et al. (2009) utilizaram esse método para extração de hemicelulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar, aplicando um planejamento para otimização das condições de extração. Os autores verificaram que as melhores condições de extração foram com solução de peróxido à 6% à 20 °C por 4 horas. O rendimento de extração nessas condições foi de 86% de hemiceluloses.

Após a extração de hemiceluloses, foi possível caracterizá-las quanto ao teor de açúcares e lignina residual, conforme indicado na **Tabela 14**. Xilose foi o açúcar predominante nas soluções de hemicelulose analisadas, mas também glicose e arabinose foram detectadas em ambas as biomassas. Bagaço de malte exibiu maiores teores de glicose e de arabinose em relação ao bagaço de cana-de-açúcar. Apesar do tratamento para remoção da lignina, ainda foi possível verificar a presença de cerca de 15% de lignina em ambas as hemiceluloses. Novos testes seriam necessários para a otimização do processo de extração de hemiceluloses, para maximizar a sua extração, dessas duas biomassas.

Chimphango et al. (2012) verificaram a composição de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando o mesmo método de caracterização do presente trabalho, e obtiveram como resultado da composição, 71% de xilose, 8% de glicose e 17% de arabinose.

**Tabela 14:** Composição em monossacarídeos e lignina de hemiceluloses extraídas de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte.

Hemiceluloses	Composição (peso seco em %)			
	Glicose	Xilose	Arabinose	Lignina*
Bagaço de cana-de-açúcar	7,8 ± 0,4	23,7 ± 1,5	2,6 ± 0,1	16,8 ± 0,4
Bagaço de malte	20,6 ± 1,6	28,3 ± 1,3	9,4 ± 0,7	15,2 ± 0,1

**Fonte:** Elaborado pelo autor. \*Lignina solúvel e insolúvel. Valores médios de triplicatas.

### 5.7 Hidrólise enzimática de xilanas e hemiceluloses

Na avaliação da hidrólise de xilanas de aveia, foram utilizadas a ABF purificada de *A. hortai*, bem como uma endoxilanase purificada (Xyl II), isolada dessa mesma linhagem de fungo (NASCIMENTO, 2017) em reações sequenciais. Os resultados de hidrólise dessa combinação enzimática, podem ser visualizados na **Tabela 15**. A primeira reação ocorreu por 24 h e a 2ª reação por mais 24 h, totalizando 48 h. O efeito da aplicação das enzimas em diferentes momentos de hidrólise evidencia a ação sinérgica que ocorre entre xilanases e enzimas acessórias, como a ABF. Quando Xyl II foi aplicada sobre a solução de xilana de aveia, houve uma liberação de 0,12 mg/mL de xilose; no entanto, quando a ABF purificada foi incubada por 24 h numa solução de xilana de aveia e, em seguida, aplicada a Xyl II, o rendimento em xilose dobrou. Esse resultado sugere que a atuação anterior da ABF remove as cadeias laterais da xilana, tornando a cadeia principal mais acessível para a Xyl II.

**Tabela 15:** Produtos de hidrólise formados após ação de xilanase e  $\alpha$ -arabinofuranosidase de *A. hortai*.

Enzimas		Xilana de aveia 2% (m/v)	
1º reação	2º reação	Xilose liberada (mg/mL)	Arabinose liberada (mg/mL)
ABF	-	0,01 ± 0,00	0,15 ± 0,02
Xyl II	-	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,00
ABF	Xyl II	0,25 ± 0,03	0,16 ± 0,01

**Fonte:** Elaborado pelo autor. ABF:  $\alpha$ -arabinofuranosidase purificada de *A. hortai* (atividade de 0,141 U). Xyl II: endoxilanase purificada de *A. hortai* (atividade de 700 U). Valores médios e desvios padrões de triplicatas.

A hidrólise de xilana de aveia, de faia (*beechwood*) e de hemiceluloses de bagaço de cana-de-açúcar e de bagaço de malte também foi avaliada (**Tabela 16**), porém, na presença do filtrado bruto de cultivo do fungo *A. hortai* contendo a ABF. Como visto anteriormente, no **item 5.5.6** o filtrado bruto além da atividade ABF também apresenta atividade  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -galactosidase e glicosidase.

**Tabela 16:** Produtos de hidrólise formados após ação das enzimas presentes no filtrado bruto e da xilanase de *A. hortai*

Enzimas		Xilana de faia <sup>1</sup>		Xilana de aveia		Hemicelulose Bag. Cana*		Hemicelulose Bag. Malte**	
1º reação	2º reação	[X] <sup>a</sup>	[A] <sup>b</sup>	[X]	[A]	[X]	[A]	[X]	[A]
<sup>2</sup> F.B. 2 h	-	0,12	0,00	0,11	0,16	0,13	0,19	0,17	0,35
F.B. 12 h	-	0,65	0,00	0,39	0,31	0,48	0,34	0,51	0,58
F.B. 24 h	-	0,85	0,00	0,47	0,18	0,53	0,28	0,59	0,68
F.B. 48 h	-	1,06	0,00	0,56	0,19	0,60	0,30	0,64	0,72
<sup>3</sup> Xyl II 24 h	-	0,31	0,00	0,17	0,00	0,17	0,04	0,19	0,04
F.B. 24 h	Xyl II 24 h	1,13	0,00	0,64	0,24	0,81	0,38	0,77	0,74

**Fonte:** Elaborado pelo autor. Substratos à concentração de 2% (m/v). <sup>1</sup>Xilana de *beechwood*. <sup>2</sup>F.B.: Filtrado bruto (atividade ABF de 0,141 U). <sup>3</sup>Xyl II: Xilanase purificada de *A. hortai* (350 U). <sup>a</sup>Concentração de xilose em mg/mL. <sup>b</sup>Concentração de arabinose em mg/mL. \*Bagaço de cana-de-açúcar. \*\*Bagaço de malte. Valores médios de triplicatas.

Assim, a aplicação do filtrado em conjunto com a Xyl II permitiu verificar a cooperação de xilanases com outras enzimas do complexo xilanolítico. Em todos os substratos avaliados, a aplicação da Xyl II após a atuação do filtrado bruto, resultou em maior liberação de xilose, já que a aplicação apenas da Xyl II rendeu baixos valores de xilose em relação aos demais experimentos. A aplicação apenas do filtrado bruto também resultou na produção de xilose, indicando que esse filtrado pode conter uma xilanase, ou uma enzima bifuncional, que atua simultaneamente, rendendo menos produtos do que quando essas enzimas foram aplicadas sequencialmente.

Na hidrólise de xilana de faia, não houve produção de arabinose, visto que na composição desse substrato a presença de ramificações de arabinose é muito baixa, menor que 2% (Sigma-Aldrich Chem. Co.: St. Louis, MO, USA). Já na xilana de aveia, que apresenta em sua composição cerca de 10% de arabinose e mais de 70% de xilose (Sigma-Aldrich Chem. Co.: St. Louis, MO, USA), houve produção de ambos os açúcares com aumento inclusive de arabinose, após a adição da Xyl II na reação com o filtrado bruto (**Tabela 16**).

Quanto às hemiceluloses extraídas das biomassas de bagaço de cana-de-açúcar e de malte, houve similaridade no sinergismo da Xyl II com as demais enzimas do filtrado bruto. Na hidrólise de bagaço de malte ocorreu maior produção de arabinose, visto na caracterização que esse material apresenta em sua composição porcentagem maior desse açúcar, do que a hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar.

Diversos trabalhos relataram a avaliação do sinergismo entre ABFs,  $\beta$ -xilosidases e xilanases, entre outras enzimas hemicelulolíticas, sobre diferentes substratos, e neles os autores relatam uma melhoria no rendimento de açúcares redutores quando as enzimas acessórias são aplicadas anteriormente à aplicação das xilanases (DE WET et al., 2008; GUERFALI et al., 2011; PATEL et al., 2015; YANG X. et al., 2015; YANG W. et al., 2015; BOURAOUI et al., 2016).

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho verificou-se que a linhagem de *Aspergillus hortai*, isolada do Pantanal Mato-grossense, produz diversas enzimas hemicelulolíticas quando cultivado no subproduto agroindustrial polpa cítrica. A utilização desse material para a produção enzimática, permite a uma destinação mais nobre, com maior valor agregado, que o descarte ou a queima.

Sob condições físico-químicas otimizadas, a linhagem de *Aspergillus hortai* produz grande quantidade de  $\alpha$ -arabinofuranosidase. A enzima foi purificada em poucas etapas, com rendimento apropriado para sua aplicação. Pela caracterização da enzima purificada verificou-se que esta apresenta propriedades interessantes para a aplicação no setor industrial como por exemplo:

- pH ótimo ácido: na indústria de vinho, principalmente em reatores onde ocorre a maceração e a fermentação simultaneamente, cujo pH nessas condições varia de 3,5 a 5,0.

- termoestabilidade a 40 °C: na produção de xilo-oligossacarídeos e na panificação, já que a etapa de fermentação da massa deve ocorrer em torno de 35 °C.

- halotolerância e tolerância ao etanol: na produção de bioetanol pois a produção ocorre com cerca de 10% de etanol no meio de fermentação, e ainda pode ser utilizada após pré-tratamento da biomassa vegetal, onde ocorre a formação de sais.

Estudos da biomassa também foram realizados, como a caracterização de bagaço de cana-de-açúcar e de malte in natura e das hemiceluloses extraídas destes materiais. O rendimento de extração, em torno de 60%, permitiu realizar análises laboratoriais, mas novos experimentos podem ser realizados para determinação de condições de extração que permitam rendimento mais elevado.

A hidrólise das hemiceluloses comerciais e extraídas no laboratório permitiu demonstrar a ação sinérgica e sequencial entre enzimas do complexo xilanolítico, bem como a ordem de atuação destas enzimas na hidrólise e produção de açúcares redutores. Com esses experimentos, conclui-se que as enzimas acessórias, principalmente as  $\alpha$ -arabinofuranosidasas, são essenciais na degradação de material hemicelulósico para a produção de xilooligossacarídeos ou monossacarídeos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARKHED, M.; O'DELL, C.; HSIEH, M. C.; ZHANG, J.; GOLDSTEIN, J.; SRIVASTAVA, A. Effect of polysorbate 80 concentration on thermal and photostability of a monoclonal antibody. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n.1, p. 1–9, 2012. doi: 10.1208/s12249-012-9878-0.
- AHMED, S.; LUIS, A.; BRAS, J.; FONTES, C.; GOYAL, A. The family 6 carbohydrate-binding module (CtCBM6B) of *Clostridium thermocellum* alpha-L-arabinofuranosidase binds xylans and thermally stabilized by Ca<sup>2+</sup> ions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 31, p. 217-225, 2013.
- ALIAS, N.; MAHADI, N.; MURAD, A.; BAKAR, F.; RABU, A.; ILLIAS, R. Expression optimisation of recombinant alpha-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 120120 in *Pichia pastoris* and its biochemical characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 6700-6710, 2011.
- Aliyu, S.; Bala, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 324-331, 2011.
- ALMEIDA, T. I. R.; SÍGOLO, J. B.; FERNANDES, E.; NETO, J. P. D. Q.; BARBIERO, L.; SAKAMOTO, A. Y. Proposta de classificação e gênese das lagoas da baixa Nhecolândia-MS com base em sensoriamento remoto e dados de campo. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 33, n. 2, p. 83-90, 2003.
- AMARASEKARA, A. S. Feedstocks for cellulosic ethanol production. In: \_\_\_\_\_. **Handbook of Cellulosic Ethanol**. 1th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013, p. 43-129. ISBN 9781118878422.
- AMORE, A.; AMORESANO, A.; BIROLO, L.; HENRISSAT, B.; LEO, G.; PALMESE, A.; FARACO, V. A Family GH51  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*: identification, recombinant expression and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 995-1006, 2012. doi 10.1007/s00253-011-3678-4.
- AYGAN, ASHABIL, ARIKAN, BURHAN, KORKMAZ, HATICE, DINÇER, SADIK, & ÇOLAK, ÖMER. Highly thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 547-553, 2008. doi: 10.1590/S1517-83822008000300027.

BCC, Research Biotechnology Report: **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>> Acesso em 27 mar. 2017.

BEAUGRAND, J.; CRÔNIER, D.; DEBEIRE, P.; CHABBERT, B. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. **Journal of Cereal Science**, v. 40, n. 3, p. 223-230, 2004.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. **Aspergillus molecular Biology and Genomics**. 1th ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2010, p. 1-17

BEYLOT, M.H.; MCKIE, V.A.; VORAGEN, A.G., DOESWIJK-VORAGEN CH, GILBERT HJ. The *Pseudomonas cellulosa* glycoside hydrolase family 51 arabinofuranosidase exhibits wide substrate specificity. **Biochemistry Journal**, v. 358, p. 607-614, 2001.

BEZALEL, L.; SHOHAM, Y.; ROSENBERG, E. Characterization and delignification activity of a thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 40, p. 57–62, 1993.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BIELY, P. Xylanolytic enzymes. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology**. 1th ed. New York: Marcel Dekker, 2003, p. 879-916.

BIELY, P.; PUCHART, V. Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1636–1647, 2006. doi:10.1002/jsfa.2519.

BOCHICCHIO, R., REICHER, F. Are hemicelluloses from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms? **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 2, p. 127-136, 2003.

BOURAOUI, H.; DESROUSSEAUX, M.L.; IOANNOU, E.; ALVIRA, P.; MANAIÏ, M.; RÉMOND, C.; DUMON, C.; FERNANDEZ-FUENTES, N.; O'DONOHUE, M.J. The GH51  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase from *Paenibacillus* sp. THS1 is multifunctional, hydrolyzing main-

chain and side-chain glycosidic bonds in heteroxylans. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 9, p. 140, 2016. doi: 10.1186/s13068-016-0550-x.

BOURGOIS, T.M.; van CRAEYVELD, V.; van CAMPENHOUT, S.; COURTIN, C.M.; DELCOUR, J.A.; ROBBEN, J.; VOLCKAERT, G. Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051: a GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1309-1317, 2007. doi:10.1007/s00253-007-0956-2.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A.F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, , p. 199-204, 2009.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A.M. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1195-1205, 2010. doi: 10.1007/s12010-009-8892-5.

BRIENZO, M.; FERREIRA, S.; VICENTIM, M. P.; SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. Comparison Study on the Biomass Recalcitrance of Different Tissue Fractions of Sugarcane Culm. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 4, p. 1454–1465, 2014.

BRIENZO, M.; TYHODA, L.; BENJAMIN, Y.; GORGENS, J. Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New Biotechnology**, v. 32 n. 2, p. 253-262, 2015.

BURLACU, A., CORNEA, C. P., ISRAEL-ROMING, F. Microbial Xylanase: A Review. **Scientific Bulletin**, Series F, Biotechnologies, v. 20, p. 335-342, 2016.

BUTT, M. S.; TAHIR-NADEEM, M.; AHMAD, Z.; SULTAN, M. T. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 22-31, 2008.

CANAKCI, S.; BELDUZ, A.O.; SAHA, B.C.; YASAR, A.; AYAZ, F.A.; YAYLI, N. Purification and characterization of a highly thermostable alpha-L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 813-820, 2007.

CANTERO, D.A.; MARTINEZ, C.; BERMEJO, M. D.; COCERO, M. J. Simultaneous and selective recovery of cellulose and hemicelulose fractions from wheat bran by supercritical water hydrolysis. **Green Chemistry**, v. 17, p. 610-618, 2015. doi: 10.1039/c4gc01359j.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010. ISSN 0960-8524. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.097.

CASTELLANI A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 270-276, 1939.

CHANG, S.; ZHAO, Z.; ZHENG, A.; HE, F.; HUANG, Z.; LI, H. Characterization of products from torrefaction of sprucewood and bagasse in an auger reactor. **Energy Fuels**, v. 26, p. 7009–7017, 2012. doi: 10.1021/ef301048a.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215-221, 2012. doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.083.

CHEN, W.H., XU, Y.Y., HWANG W.S., WANG, J.B. Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10451-10458, 2011. doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.118.

CHIMPHANGO, A. F.A.; VAN ZYL, W. H.; GÖRGENS, J. F. Isolation, characterization and enzymatic modification of water soluble xylans from *Eucalyptus grandis* wood and sugarcane bagasse. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 10, p. 1419–1429, 2012.

COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

CULLETON, H.; MCKIE, V.; DE VRIES, R. Overexpression, purification and characterisation of homologous alpha-L-arabinofuranosidase and endo-1,4-beta-D-glucanase in *Aspergillus vadensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 1697-1708, 2014.

DAMÁSIO, A. R. L.; PESSELA, B. C.; SEGATO, F.; PRADE, R. A.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. L. T. M. Improvement of fungal arabinofuranosidase thermal stability by reversible immobilization. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2411-2417, 2012. doi:10.1016/j.procbio.2012.09.024.

- DE IOANNES P.; PEIRANO, A.; STEINER, J.; EYZAGUIRRE, J. An alpha-L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties. *Journal of Biotechnology* v. 76, n. 2-3, p. 253-258, 2000.
- DE LA MARE, M.; GUAIS, O.; BONNIN, E.; WEBER, J.; FRANCOIS, J. M. Molecular and biochemical characterization of three GH62  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from the soil deuteromycete *Penicillium funiculosum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 5, p. 351-358, 2013. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.07.008.
- DE WET, B. J. M.; MATTHEW, M. K. A.; STORBECK, K. H.; VAN ZYL, W. H.; PRIOR B. A. Characterization of a family 54  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 975–983, 2008. doi:10.1007/s00253-007-1235-y
- DEBECHE, T.; CUMMINGS, N.; CONNERTON, I.; DEBEIRE, P.; O'DONOHUE MJ. Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1734-1736, 2000.
- DEL RÍO, J. C.; PRINSEN, P.; GUTIÉRREZ, A. Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 248 – 254, 2013.
- DEUTSCHMANN, R. & DEKKER, R.F.H. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1627-1640, 2012.
- DEVARAPALLI M.; ATIYEH H.K. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 3, p.268-280, 2015. doi: 10.18331/BRJ2015.2.3.5.
- DODD, D., CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Global Change Biology Bioenergy*, v. 1 n. 1, p. 2-17, 2009.
- DOMINIC, W. S. W. **Food Enzymes: Structure and Mechanism**. 1. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 2013. 390 p.
- DONER, L. W.; HICKS, K. B. Isolation of Hemicellulose from Corn Fiber by Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 176–181, 1997.

EBRINGEROVA, A. & HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - bipolymers with valuable properties. 1, naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000.

EBRINGEROVA, A., HROMADKOVA, Z., HEINZE, T. Hemicellulose. In: \_\_\_\_\_. **Polysaccharides I: structure, characterisation and use**. Advances in Polymer Science, v. 186, 1<sup>th</sup> ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 2005, p. 1-67 ISBN: 9783540261124.

EL-GINDY, A.A.; SAAD, R. R. An alpha-L-arabinofuranosidase production by a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Ann. Microbiol*, v. 53, p. 437-445, 2003.

EMBRAPA. **Embrapa no Brasil**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/embrapa-no-brasil>>. Acesso em 27 mar. 2017.

FANG, J. M.; SUN, R. C.; TOMKINSON, J. Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction. **Cellulose**, v. 7, p. 87–107, 2000.

FARHAT, W.; VENDITTI, R.A.; HUBBE, M.; TAHA, M.; BECQUART F.; AYOUB, A. A review of water-resistant hemicellulose-based materials: processing and applications. **Chemistry and Sustainability (ChemSusChem)**, v. 10, p. 305-323, 2017. ISSN: 1864-564X. doi: 10.1002/cssc.201601047.

FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; BARALDO, A.; TARDIOLI, P. W.; NETO, V. B.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: Evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 810–815, 2010. doi:10.1016/j.nbt.2010.10.001.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; PEÑA, J. L.; PIÑAGA F, VALLÉS, S.a-L-arabinofuranosidase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 115, n. 1, p. 107–112, 1994. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06622.x.

FILHO, E.X.F.; PULS, J.; COUGHLAN, M.P. Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid state culture of the fungus *Penicillium capsulatum*. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 62, n. 1, p.168–172, 1996.

FRITZ, M.; RAVANAL, M.C.; BRAET, C.; EYZAGUIRRE, J. A family 51 alpha-l-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: purification, properties and amino acid sequence. *Mycological Research*, v. 112, p. 933-942, 2008. doi: 10.1016/j.mycres.2008.01.02

- FURQUIM, S. A. C.; BARBIÉRO, L.; GRAHAM, R. C.; QUEIROZ NETO, J. P.; FERREIRA, R. P. D.; FURIAN, S. Neof ormation of micas in soils surrounding an alkaline-saline lake of Pantanal wetland, Brazil. **Geoderma**, v. 158, n. 3–4, p. 331-342, 2010. doi: 10.1016/j.geoderma.2010.05.015.
- GE HEALTHCARE. Handbooks: **GE Healthcare Life Science** - Principles and Methods. Disponível em: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-br/service-and-support/handbooks/>>. Acesso em 2017.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SEGATO, F.; ALVAREZ, T. M.; BRAGATTO, J.; BRENELLI, L. B.; CITADINI, A. P. S.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R.; PAES LEME, A. F.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293-299, 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.062.
- GUAIS, O.; TOURRASSE, O.; DOURDOIGNE, M.; PARROU, J.L.; FRANCOIS, J. M. Characterization of the family GH54 alpha-L-arabinofuranosidases in *Penicillium funiculosum*, including a novel protein bearing a cellulose-binding domain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1007-1021, 2010. doi: 10.1007/s00253-010-2532-4.
- GUERFALI, M.; CHAABOUNI, M.; GARGOURI, A.; BELGITH, H. Improvement of alpha-L-arabinofuranosidase production by *Talaromyces thermophilus* and agro-industrial residues saccharification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1361–1372, 2010.
- GUERFALI, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Catalytic properties of *Talaromyces thermophilus* alpha-L-arabinofuranosidase and its synergistic action with immobilized endo-beta-1,4-xylanase. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 68, p. 192-199, 2011.
- GUNATA, Z.; BRILLOUET, J. M.; VOIRIN, S.; BAUMES, R.; CORDONNIER, R. Purification and some properties of alpha-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 772–776, 1990.
- HASHIMOTO, T.; NAKATA, Y. Synergistic degradation of arabinoxylan with alpha-L-arabinofuranosidase, xylanase and beta-xylosidase from soy sauce koji mold, *Aspergillus oryzae*, in high salt condition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 2, p. 164-169, 2003.

HEINZE, T.; PETZOLD-WELCKE, K.; VAN DAM, J. E. G. Polysaccharides: Molecular and Supramolecular Structures. Terminology. In: NAVARD, P. **The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE): Research Initiatives and Results**. ed. Ilustrada, Suíça: Springer Science & Business Media, 2012. p. 23-64.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991.

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

HENRISSAT B.; BAIROCH A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal (Letters)**, v. 316, p. 695-696, 1996.

HOFFMAM, Z.B.; OLIVEIRA, L.C.; COTA, J.; ALVAREZ, T.M.; DIOGO, J.A.; NETO M. D. E. O.; CITADINI, A. P.; LEITE, V. B.; SQUINA, F.M.; MURAKAMI, M.T.; RULLER R. Characterization of a hexameric exo-acting GH51  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from the mesophilic *Bacillus subtilis*. **Molecular Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 260-267, 2013.

HOWARD, R. L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENBURG, E.L., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

HUANG, H. J.; RAMASWAMY, S.; AL-DAJANI, W.; TSCHIRNER, U.; CAIRNCROSS, R.A. Effect of biomass species and plant size on cellulosic ethanol: a comparative process and economic analysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 2, p. 234-246, 2009. ISSN 0961-9534. doi: 10.1016/j.biombioe.2008.05.007.

INÁCIO, J.M.; CORREIA, I.L.; DE SÁ-NOGUEIRA, I. Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 154, p. 2719-2729, 2008. doi: 10.1099/mic.0.2008/018978-0.

KANEKO, S.; SHIMASAKI, T.; KUSAKABE, I. Purification and some properties of intracellular  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, p. 1161-1165, 1993.

KAJI, A.; SHIMOKAWA, K. New exo-type arabinase from *Erwinia carotovora* IAM 1024. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, p. 67-72, 1984.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; PASCHOS, T.; TAOUKI, I.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **PeerJ** 1:e46, 2013. doi:10.7717/peerj.46.

KARUTURI, A. 19 need to know facts about PMSF inhibitors. **AG Scientific – Accelerating Scientific Discovery**. Disponível em: <<http://agscientific.com/blog/2017/01/19-inhibitor-pmsf/>> Acesso em 14 de junho de 2017.

KENNES, D.; ABUBACKAR, H. N.; DIAZ, M.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 91, p. 304–317, 2016. doi:10.1002/jctb.4842.

KERSTERS-HILDERSON H, CLAEYSSSENS M, VAN DOORSLAER E, SAMAN E, DE BRUYNE CK. beta-D-Xylosidase from *Bacillus pumilus*. **Methods in Enzymology**, v. 83, p. 631–639, 1982.

KIMURA, I.; HIROYUKI, S.; SHIGEYUKI, T. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 4, p. 334-339, 1995. doi.org/10.1016/0922-338X(95)94200-B

KLICH, M. A; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. 1. ed. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988, 116 p.

KOMAE, K.; KAJI, A.; SATO, M. An alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 46, p. 1899-1905, 1982.

KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN A. G. J. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 688-695, 1993. doi:10.1007/BF00182811.

KOSHLAND, D. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biological Reviews**, v. 28, n. 4, p. 416-436, 1953. doi:10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x.

KURAKAKE, M.; KANBARA, Y.; MURAKAMI, Y. Characteristics of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. I10-1 for production of L-arabinose from corn hull

arabinoxylan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2650-60, 2014. doi: 10.1007/s12010-013-0691-3.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. doi: 10.1038/227680a0.

LAURUENGTANA, V.; PINPHANICHAKARN, P. Optimization of culture medium and conditions for  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase production by *Streptomyces* sp. PC22. **Journal of scientific research, Chulalongkorn University**, v. 31, p. 57–66, 2006.

LE CLINCHE, F.; PINAGA, F.; RAMON, D.; VALLES, S.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases from *Aspergillus terreus* with potential application in enology: Induction, purification, and characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2379-2383, 1997.

LEE, R.C.; HRMOVA, M.; URTON, R.A.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G. B. Bifunctional Family 3 Glycoside Hydrolases from Barley with alpha-L-Arabinofuranosidase and beta-D-Xylosidase Activity. Characterization, Primary Structures, and COOH-Terminal Processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 7, p. 5377-5387, 2003. doi: 10.1074/jbc.M210627200.

LEE, S. H., LEE, Y.E. Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH51  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus* sp. DG-22. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 236-44, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYNCH, K. M.; STEFFEN, E. J.; ARENDT, E. K. Brewer's spent grain: a review with an emphasis on food and health. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 553-568, 2016. doi: 10.1002/jib.363.

LUONTERI, E.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; VIKARI, L.; Purification and characterization of three alpha-arabinosidases from *Aspergillus terreus*. **Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 279-291, 1995.

MAEHARA, T.; FUJIMOTO, Z.; ICHINOSE, H.; MICHIKAWA, M.; HARAZONO, K.; KANEKO, S. Crystal structure and characterization of the glycoside hydrolase family 62  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces coelicolor*. **The Journal of Biology and Chemistry**, v. 289, n. 11, p. 7962-7972, 2014. doi:10.1074/jbc.M113.540542.

MAKKONEN, H.P.; NAKAS, J.P. Use of xylanase and arabinofuranosidase for arabinose removal from unbleached kraft pulp. **Biotechnology Letters** v. 27, n. 21, p. 1675-1679, 2005.

MARGOLLES, A., DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G. Purification and functional characterization of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5096-5103, 2003.

MATHIAS, T. R. S.; ALEXANDRE; V. M. F.; CAMMAROTA, M. C.; MELLO, P. P. M.; SÉRVULO, E. F. C. Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. **Journal of the Institute of Brewing - Institute of Brewing and Distilling**, v. 121, p. 400–404, 2015.

MATSUMURA, K.; OBATA, H.; HATA, Y.; KAWATO, A.; ABE, Y.; AKITA, O. Isolation and characterization of a novel gene encoding alpha-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 2, p. 77–84, 2004. doi:10.1016/S1389-1723(04)70246-7.

MATSUO, N.; KANEKO, S.; KUNO, A.; KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I. Purification, characterization and gene cloning of two alpha-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. **Biochemistry Journal**, v. 346, p. 9-15, 2000.

MATSUZAWA, T.; KANEKO, S.; YAOI, K. Screening, identification, and characterization of a GH43 family  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinofuranosidase from a compost microbial metagenome. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 8943–8954, 2015. doi: 10.1007/s00253-015-6647-5.

McCARTER, J. D.; WITHERS, G. S. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885-892, 1994.

MESQUITA, J. F.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 3, p. 441-448, 2016. doi: 10.1007/s00449-015-1527-z.

MICHLMAYR, H.; SCHÜMANN, C.; KULBE, K.D.; DEL HIERRO, A.M. Heterologously Expressed Family 51  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases from *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus brevis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1528-1531, 2011. doi:10.1128/AEM.01385-10.

MIYANAGA, A.; KOSEKI, T.; MATSUZAWA, H.; WAKAGI, T.; SHOUN, H.; FUSHINOBU, S. Crystal structure of a family 54 alpha-L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44907- 44914, 2004. doi:10.1074/jbc.M405390200

MIYAZAKI, K. Hyperthermophilic alpha-L: -arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima* MSB8: molecular cloning, gene expression, and characterization of the recombinant protein. **Extremophiles**, v. 9, n. 5, p. 399-406, 2005.

MOHNEN D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, 2008. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.

MÓNICO, A.; MARTÍNEZ-SENRA, E.; CAÑADA, F. J.; ZORRILLA, S.; PÉREZ-SALA, D.; PERMYAKOV, E A. Drawbacks of Dialysis Procedures for Removal of EDTA. **PLoS One**, v. 12, n. 1, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0169843.

MORANA, A.; PARIS, O.; MAURELLI, L.; ROSSI, M.; CANNIO, R. Gene cloning and expression in *Escherichia coli* of a bi-functional beta-D-xylosidase/alpha-L-arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* involved in xylan degradation. **Extremophiles**, v. 11, n. 1, p.123-132, 2007.

MUTHUSAMY, N. Chemical composition of brewer's spent grain – a review. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 3, n. 6, p. 2109-2112, 2014. ISSN 2278-3687.

NASCIMENTO, J. M. F. **Produção, purificação, propriedades bioquímicas e aplicação de xilanases de *Aspergillus hortae***. 2017. 120 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.

NOGAWA, M.; YATSUI, K.; TOMIOKA, A.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. An alpha-L-arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* containing a noncatalytic xylan-binding domain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3964-3968, 1999.

NUMAN, M.T.; BHOSLE, N.B.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006.

OREN, A. **Properties of Halophilic Proteins** (capítulo 7) *in*: Halophilic Microorganisms and their Environments, vol. 5 de Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Berlim: Springer Science & Business Media, 2002, p. 233-278. p 233 - 278

- PANAGIOTOU, G.; TOPAKAS, E.; ECONOMOU, L.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Induction, purification, and characterization of two extracellular alpha-L-arabinofuranosidases from *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 639-644, 2003.
- PAREDES, R. S.; BARROS, R. R. O.; INOUE, H.; YANO, S.; BOM, E. P. S. Production of xylanase, a-l-arabinofuranosidase, b-xylosidase, and b-glucosidase by *Aspergillus awamori* using the liquid stream from hot-compressed water treatment of sugarcane bagasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 5, n. 3, p. 299–307, 2015. doi: 10.1007/s13399-015-0159-5.
- PATEL, H.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; SHAH, A. Improved yield of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase by newly isolated *Aspergillus niger* ADH-11 and synergistic effect of crude enzyme on saccharification of maize stover. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n.11, 2015. doi: 10.1186/s40643-015-0039-7.
- PÉREZ, R.; EYZAGUIRRE, J. *Aspergillus fumigatus* produces two arabinofuranosidases from glycosyl hydrolase family 62: comparative properties of the recombinant enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n.1, p. 143–154, 2016. doi: 10.1007/s12010-016-1984-0.
- POUTANEN, K. Rye bread: Added value in the world's bread basket. **Cereal Foods World**, v. 42, p. 682-683, 1997.
- POLIZELI, M.L.T.M., RIZZATTI, A.C.S., MONTI, R., TERENCEZI, H.F., JORGE, J.A., AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 100-131, 1995.
- PROCTOR, M.R.; TAYLOR, E.J.; NURIZZO, D.; TURKENBURG, J.P.; LLOYD, R.M.; VARDAKOU, M.; DAVIES, G.J.; GILBERT, H.J. Tailored catalysts for plant cell-wall degradation: redesigning the exo/endo preference of *Cellvibrio japonicus* arabinanase 43A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2697-2702, 2005.
- PRONYK, C.; MAZZA, G. Fractionation of triticale, wheat, barley, oats, canola, and mustard straws for the production of carbohydrates and lignins. **Bioresource Technology**, v. 106, p 117-124, 2012. ISSN 0960-8524. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.071.
- QIU, Z., AITA, G. M., WALKER, M. W. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 251-256, 2012. ISSN 0960-8524. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.070.

QUISTGAARD, E. M.; THIRUP, S. S. Sequence and structural analysis of the Asp-box motif and Asp-box beta-propellers; a widespread propeller-type characteristic of the Vps10 domain family and several glycoside hydrolase families **BMC Structural Biology**, v. 9, p.46, 2009. doi: 10.1186/1472-6807-9-46

RANJAN, A.; MOHOLKAR V.S. Comparative study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels. **Fuel**, v. 112, p. 567-571, 2013. ISSN 0016-2361. doi: 10.1016/j.fuel.2011.03.030.

RAVANAL, C. M.; CALLEGARI, E.; EYZAGUIRRE, J. Novel bifunctional  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/xylobiohydrolase (ABF3) from *Penicillium purpurogenum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5247–5253, 2010. doi:10.1128/AEM.00214-10.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 54, 2011.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on Orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2380-2387, 2008. doi: 10.1021/jf073388r.

ROMERO, A.M.; MATEO, J.J.; MAICAS, S. Characterization of an ethanol-tolerant 1,4- $\beta$ -xylosidase produced by *Pichia membranifaciens*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p. 354–361, 2012. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03297.x.

RYE, C. S. & WITHERS, S. G. Glycosidase mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 573–580, 2000.

SAHA, B C.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: Biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, n. 5, p. 403–423, 2000. doi: 10.1016/S0734-9750(00)00044-6.

SAMSON, R. A.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J. C.; VARGA, J. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 39–55, 2011. doi: 10.3114/sim.2011.69.04.

SANTOS, G. B. **Origem do sistema lacustre da região do Médio São Francisco:** bacia do Rio Grande - Bahia. 2016. 159 p. Tese (Doutorado em Evolução Crustal e Recursos Naturais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

SATHISHKUMAR, T.; NAIR, D. M.; NITHYA, R.; PRIYADHARSHINI, Y.; SUPRABHA, S.; BASKAR, R. Media Optimization by Central Composite Design Based Response Surface Methodology of Crude  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Penicillium* Species. **International Journal of BioSciences & Technology (IJBST)**, v. 6, n. 1, 2013.

SCHWARZ, W.H.; BRONNENMEIER, K.; KRAUSE, B.; LOTTSPEICH, F.; STAUDENBAUER, W.L. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 856-860, 1995.

SCOPE, R. K. **Protein Purification – principles and practice**. 3. ed. New York: Springer, 1994. 380 p.

SERI, K.; SANAI, K.; MATSUO, N.; KAWAKUBO, K.; XUE, C. Y.; INOUE, S. L-Arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and reduces glycaemic response after sucrose ingestion in animals. **Metabolism**, v. 45, p. 1368–1374 1996.

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  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from the two GH62 glycoside hydrolase subfamilies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 8, p. 5261-5273, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.528133.

SHALLOM, D.; BELAKHOV, V.; SOLOMON, D.; GILEAD-GROPPER, S.; BAASOV, T.; SHOHAM, G.; SHOHAM, Y. The identification of the acid-base catalyst of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a family 51 glycoside hydrolase. **FEBS Letters**, v. 514, n. 2-3, p. 163-167, 2002.

SHI, H.; ZHANG, Y.; XU, B.; TU, M.; WANG, F. Characterization of a novel GH2 family  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga thermarum*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 1321-1328, 2014. doi: 10.1007/s10529-014-1493-6.

SHINOZAKI, A.; KAWAKAMI, T.; HOSOKAWA, S.; SAKAMOTO, T. A novel GH43  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Penicillium chrysogenum* that preferentially degrades single-

substituted arabinosyl side chains in arabinan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58-59, p. 80-86, 2014. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.03.005.

SHINOZAKI, A.; HOSOKAWA, S.; NAKAZAWA, M.; UEDA, M.; SAKAMOTO, T. Identification and characterization of three *Penicillium chrysogenum*  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (PcABF43B, PcABF51C, and AFQ1) with different specificities toward arabino-oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 73-74, p. 65-71, 2015. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.04.003

SLUTTER, J. B.; CHUM, H.; GOMES, A.C.; TAVARES, R. P.A.; AZEVEDO, V.; PIMENTA, M.T.B.; RABELO, S.C.; MARABEZZI, K.; CURVELO, A.A.S.; ALVES, A.R.; GARCIA, W.T.; CARVALHO, W.; ESTEVES, P. J.; MENDONCA, S.; OLIVEIRA, P. A.; RIBEIRO, J. A.A.; MENDES, T. D.; VICENTIN, M. P.; DUARTE, C. L.; MORI, M.N.. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 3, p. 579-585, 2016. doi: 10.5740/jaoacint.15-0063

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016. ISSN 0960-8524. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.061.

TATEISHI, A.; KAMIYOSHIHARA, Y.; MATSUNO, J.; MIYOHASHI, F.; SHIBA, H.; KANAYAMA, Y.; WATANABE, K.; NOMURA, K.; INOUE, H. Heterologous expression of tomato glycoside hydrolase family 3  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/ $\beta$ -xylosidases in tobacco suspension cultured cells and synergic action of a family 51 isozyme under antisense suppression of the enzyme. **Physiologia Plantarum**, v. 150, n. 2, p. 238-251, 2013. doi: 10.1111/ppl.12079.

TAYLOR, E. J.; SMITH, N. L.; TURKENBURG, J. P.; D'SOUZA, S.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. Structural insight into the ligand specificity of a thermostable family 51 arabinofuranosidase, Araf51, from *Clostridium thermocellum*. **Biochemistry Journal**, v. 395, n. 1, p. 31-37, 2006. doi:10.1042/BJ20051780.

TEMER, B.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, C. C.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Penicillium janczewskii*: Production with brewers spent grain and orange waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 17, p. 1796–1806, 2014. doi:10.5897/AJB2013.13361.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4139–4143, 2010. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.011.

TJERNBERG, A.; MARKOVA, N.; GRIFFITHS, W.J.; HALLÉN, D. DMSO-related effects in protein characterization. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 2, p. 131-137, 2006.

TUNCER, M.; BALL AS. Purification and partial characterization of alpha-L-arabinofuranosidase produced by *Thermomonospora fusca*. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 48, n. 2, p. 168-172, 2003.

UESAKA, E.; SATO, M.; RAIJU, M.; KAJI, A. alpha-L-Arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*. **Journal of Bacteriology**, v. 133, p. 1073-1077, 1978.

U.S. DOE. 2006. Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda, DOE/SC - 0095, U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. Disponível em: <[www.doegenomestolife.org/biofuels/](http://www.doegenomestolife.org/biofuels/)>.

VALLS, A.; DIAZ, P.; PASTOR, F.I.; VALENZUELA, S.V. A newly discovered arabinoxylan-specific arabinofuranohydrolase. Synergistic action with xylanases from different glycosyl hydrolase families. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1743-1745, 2016.

VAN DEN BROEK, L.A. M.; LLOYD, R.M.; BELDMAN, G.; VERDOES, J.C.; MCCLEARY, B.V.; VORAGEN, A. G. Cloning and characterization of arabinoxylan arabinofuranohydrolase-D3 (AXHd3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 641-647, 2005. doi:10.1007/s00253-004-1850-9.

VEEN P.; FLIPPHI, M.J.; VORAGEN, A.G.; VISSER, J. Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. **Archives of Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 23-28, 1991.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; SANTAS, P.; SANTAS, R.; CORLETI, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 296-301, 2007. doi: 10.1016/j.biortech.2006.01.007.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbiology Gen Bull**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WAN, C. F.; CHEN, W. H.; CHEN, C. T.; CHANG, M. D.; LO, L. C.; LI, Y. K. Mutagenesis and mechanistic study of a glycoside hydrolase family 54 alpha-L-arabinofuranosidase from

*Trichoderma koningii*. **Biochemistry Journal**, v. 401, n. 2, p. 551-558, 2007. doi:10.1042/BJ20060717.

WANG, W.; MAI-GISONDI, G.; STOGIOS, P.J.; KAUR, A.; XU, X.; CUI, H.; TURUNEN, O.; SAVCHENKO, A.; MASTER, E.R. Elucidation of the molecular basis for arabinoxylan-debranching activity of a thermostable family GH62  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase from *Streptomyces thermoviolaceus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5317-5329, 2014. doi:10.1128/AEM.00685-14.

WANG, G., WU, J., YAN, R., LIN, J., & YE, X. A Novel Multi-domain High Molecular, Salt-Stable Alkaline Xylanase from *Alkalibacterium* sp. SL3. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2120, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2016.02120.

WILKENS, C.; ANDERSEN, S.; PETERSEN, B. O.; LI, A.; BUSSE-WICHER, A.; BIRCH, J.; COCKBURN, D.; NAKAI, H.; CHRISTENSEN, H. E. M.; KRAGELUND, B. B.; DUPREE, P.; MCCLEARY, B.; HINDSGAUL, O.; HACHEM, M. A.; SVENSSON, B. An efficient arabinoxylan-debranching  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of family GH62 from *Aspergillus nidulans* contains a secondary carbohydrate binding site. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6265–6277, 2016. doi: 10.1007/s00253-016-7417-8.

WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. **Topics in Enzyme Fermentation and Biotechnology**, v. 8, p. 9-30, 1984.

WU, J.; WANG, Y.; PARK, S. Y.; KIM, S. G.; YOO, J. S.; PARK, S.; KIM, S. T. Secreted Alpha-N-Arabinofuranosidase B Protein Is Required for the Full Virulence of *Magnaporthe oryzae* and Triggers Host Defences. **Plos One**, v. 11, n. 10, e0165149, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0165149.

XIE, J.; ZHAO, D.; ZHAO, L.; PEI, J.; XIAO, W.; DING, G.; WANG, Z.; XU, J. Characterization of a novel arabinose-tolerant  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase with high ginsenoside Rc to ginsenoside Rd bioconversion productivity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 3, p. 647-660, 2016. doi: 10.1111/jam.13040.

YAN, Q.; TANG, L.; YANG, S.; ZHOU, P.; ZHANG, S.; JIANG, Z. Purification and characterization of a novel thermostable  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase ( $\alpha$ -l-AFase) from *Chaetomium* sp. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 472–478, 2012. doi: 10.1016/j.procbio.2011.12.003.

YANAI, T.; SATO M. Purification and characterization of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1181-1188, 2000.

YANG, X.; SHI, P.; MA, R.; LUO, H.; HUANG, H.; YANG, P.; YAO, B. A new GH43  $\alpha$ -arabinofuranosidase from *Humicola insolens* Y1: biochemical characterization and synergistic action with a xylanase on xylan degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, n. 4, p. 1960-1970, 2015. doi: 10.1007/s12010-014-1416-y.

YANG, W.; BAI, Y.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; MENG, K.; YAO, B. A novel bifunctional GH51 exo- $\alpha$ -l-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, n.1, p. 197, 2015. doi:10.1186/s13068-015-0366-0.

ZHANG, J.; CHOI, Y. S.; YOO, C. G.; KIM, T. H.; BROWN, R. C.; SHANKS, B.H. Cellulose–Hemicellulose and Cellulose–Lignin Interactions during Fast Pyrolysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 3, p. 293-301, 2015. doi: 10.1021/sc500664h.

ZHOU, X.; WENJUN, L.; MABON, R.; BROADBELT, L.J. A critical review on hemicellulose pyrolysis. *Energy Technology*, v. 5, p. 52-79, 2017. doi: 10.1002/ente.v5.1

ZIETSMAN, A.J.; DE KLERK, D.; VAN RENSBURG, P. Coexpression of  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase and  $\beta$ -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, v. 11, n. 1, p. 88-103, 2011. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00694.x.