**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**Imobilização e caracterização bioquímica da enzima β -glicosidase
(BG-Lfa2) em polímero de alginato de sódio.**

MARIANA TAÍSE ZERBINI

Ribeirão Preto

2020

MARIANA TAÍSE ZERBINI

Versão Corrigida

Imobilização e caracterização bioquímica da enzima β -glicosidase (BG-Lfa2) em polímero de alginato de sódio.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Nascimento Silva

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zerbini, Mariana Taíse

Imobilização e caracterização bioquímica da enzima β -glicosidase (BG-Lfa2) em polímero de alginato de sódio.

101 p. II, 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Silva, Roberto Nascimento

1. β -glicosidase. 2. BG-Lfa2. 3. Imobilização enzimática. 4. Alginato de sódio.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA TAÍSE ZERBINI

Imobilização e caracterização bioquímica da enzima β -glicosidase (BG-Lfa2) em polímero de alginato de sódio.

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Bioquímica.**

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

***Aos meus pais, Valdir e Elisabeth e minha irmã Fernanda.
Nada seria possível sem vocês.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela força e perseverança para concluir essa etapa tão importante de minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Nascimento Silva por ter me recebido em seu laboratório, pela amizade, ajuda e apoio em momentos difíceis da minha vida, tanto profissional como pessoal. Pela paciência, pela compreensão, pela força e incentivo a concluir esse sonho. Você é muito especial e um exemplo a ser seguido. De coração, muito obrigada!

À Prof. Dra. Maria Eugênia Guazzaroni e a sua aluna a Luana Alves por ceder a enzima utilizada nesse trabalho.

Aos meus pais, Valdir e Elisabeth, que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por estarem comigo sempre e por serem meu porto seguro. Vocês são meus exemplos de garra e perseverança! Amo vocês de todo coração.

À minha querida irmã, Fernanda, que sempre tem o abraço mais reconfortante e o amor mais puro para me oferecer em qualquer circunstância. Você sempre foi meu exemplo de superação, me mostrando que tudo é possível e toda dificuldade pode ser superada. Você é o amor da minha vida.

Agradeço a família LBM: Amanda, Alinne, Cláudia, Karol, Mari Costa, Vanessa, Claudinha, David, Iasmin, Letícia e também aos integrantes que já não estão presentes, mas sempre serão parte dessa família: Renatinho, Lili, Douglas e Wellington. Obrigada por sempre estarem presentes e dispostos a me ajudar em tudo. Obrigada pelas conversas, pelas risadas, pelo carinho, pela amizade, pelos conselhos, pelas discussões científicas, pela ajuda em experimentos, pela força em momentos difíceis. Não tenho palavras para agradecer e dizer o quanto cada um de vocês tocou minha vida e o quanto são especiais para mim. Amo vocês e levo cada um em meu coração.

Às técnicas Zuleica e Sílvia, obrigada pela ajuda e disponibilidade sempre que precisei. Obrigada pela gentileza, atenção e amizade.

Aos meus amigos de departamento Matheus, Diego, Jhonatan, Sarah, Aninha, Andrezinho, Karine e Gláucia. Obrigada pelos estudos em grupo, pela ajuda nas aulas e trabalhos, pelas risadas e conversas no corredor. Vocês são especiais demais e presentes que o mestrado me deu.

Às minhas amigas de anos e anos Camila, Geise, Marília, Ariane, Bruna e Naiara por todo apoio, amizade, amor e companheirismo mesmo estando cada uma em uma cidade e vivendo suas vidas. A vida com vocês se torna muito melhor.

Às minhas amigas de Ribeirão Aline, Christiane e Regina por estarem comigo nos bons e maus momentos e nunca deixarem de acreditar em mim.

Ao meu amigo Vinícius por estar presente em todos os momentos de minha vida, bons e ruins, pelo apoio, pelas conversas, pela amizade e carinho. Você é essencial em minha vida.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Imunologia por todo conhecimento compartilhado e por disponibilizarem seus laboratórios para a utilização dos aparelhos imprescindíveis para realização deste trabalho.

Um agradecimento especial à Ivone, pelo apoio e pela ajuda eficiente em tudo que era necessário, e por aguentar meu chororô (kkk).

À CAPES pela bolsa concedida a mim na execução desse projeto.

À CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

ZERBINI, M.T. **Imobilização e caracterização bioquímica da enzima β -glicosidase (BG-Lfa2) em polímero de alginato de sódio.** 2020. 101 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A biomassa lignocelulósica necessita de enzimas do complexo celulolítico para ser degradada e entre elas estão as β -glicosidases que agem sinergicamente com as outras sobre o polímero de celulose para tornar os açúcares susceptíveis à fermentação e posterior produção de etanol. Embora a β -glicosidase não tenha ação direta sobre o polímero de celulose, ela possui extrema importância para o funcionamento desse mecanismo sinérgico, pois são capazes de hidrolisar moléculas de celobiose, que quando presentes acarretam na inibição da ação das enzimas do complexo, sendo a enzima chave do processo de hidrólise com grande valor industrial. Entretanto, a quantidade de β -glicosidase produzida é muito baixa acarretando no encarecimento dos processos aos quais estão envolvidas. Assim, a utilização da tecnologia de imobilização enzimática, capaz de aumentar a estabilidade e proporcionar separação da enzima do meio para posterior reutilização, vem sendo cada vez mais estudadas com a finalidade de viabilizar sua utilização. O tipo de imobilização utilizada nesse estudo foi a imobilização por aprisionamento, no qual há a mistura da enzima com o alginato de sódio seguida da polimerização dessa solução por meio de uma reação química. A imobilização enzimática da BG-Lfa2 foi realizada em três concentrações de alginato e diferentes valores de pH. Assim, a concentração de 3% apresentaram melhores aspectos físicos, como partículas mais esféricas e tamanhos mais homogêneos e regulares. Além disso, o melhor pH para imobilização foi de 7,4. A imobilização não alterou a temperatura ótima e pH ótimo observado para a enzima livre, mas acarretou no aumento no tempo de conversão do substrato em produto, aumento do K_m e V_{max} da enzima. Nesse trabalho também foi relatado que BG-Lfa2 possui baixo poder de hidrólise da celobiose, mas esta é capaz de realizar reações de transglicosilação com o substrato pNPG, além da atividade enzimática ser beneficiada com a presença de etanol no meio. Com a técnica de imobilização a enzima adquiriu maior estabilidade e mostrou-se eficiente para ser reutilizada nos processos de hidrólise por 16 vezes, aspecto muito importante para viabilizar sua utilização em processos industriais.

Palavras-chave: 1. β -glicosidase. 2. BG-Lfa2. 3. Imobilização enzimática. 4. Alginato de sódio.

ABSTRACT

ZERBINI, M.T. **Immobilization and biochemical characterization of the enzyme β -glycosidase (BG-Lfa2) in sodium alginate polymer.** 2020. 101 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Lignocellulosic biomass requires enzymes from the cellulolytic complex to be degraded. Among the cellulolytic complex enzymes there are the β -glucosidases, which act synergistically with the other enzymes in the cellulose polymer to make free glucose molecules susceptible to fermentation and ethanol production. Although β -glucosidase has no direct action in the cellulose polymer, it plays an important role in the synergistic mechanism, since they are capable of hydrolyzing cellobiose molecules. When cellobiose molecules are present they can cause action inhibition of complex enzymes, being the key enzyme in the hydrolysis process with great industrial value. However, the amount of β -glucosidase produced is extremely low that result in an increase costs in the processes to which they are involved. The enzyme immobilization technology can increase stability and providing separation of the enzyme from the medium for your reuse. Then, this technology has been studied to facilitate the β -glucosidase uses. The immobilization type used in this study was immobilization by entrapment, in which there is a mixture of the enzyme with sodium alginate and polymerization this solution by means of a chemical reaction. The enzymatic immobilization of BG-Lfa2 was carried out in three concentrations of alginate and different pH values. The 3% of alginate concentration showed better physical aspects, such as particles more spherical and more homogeneous and regular sizes. In addition, the best pH for immobilization was 7.4. The immobilization technic did not alter the optimum temperature and optimum pH observed for the free enzyme, but it increased the time for converting the substrate into product, increasing the K_m and V_{max} . In this work, it was also reported that BG-Lfa2 has a low hydrolysis power of cellobiose, but it can carry out transglycosylation reactions with the substrate pNPG. In addition, the presence of ethanol in the medium can benefit the enzymatic activity. The immobilization technique provided to enzyme a greater stability and an efficient reuse in the hydrolysis processes (16 times), an important aspect to enable its use in industrial processes.

Keywords: 1. β -glucosidase. 2. BG-Lfa2. 3. Enzymatic immobilization. 4. Sodium alginate

LISTA DE ABREVIATURAS

BG – Enzima β -glicosidase

BSA – do inglês, Bovine Serum Albumin

CEL6A – Enzima celobiohidrolase da família 6A

CEL7A – Enzima celobiohidrolase da família 7A

D.O – Densidade ótica

EDTA – do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EG – Enzima endoglicanase

FPLC – do inglês, *Fast Protein Liquid Chromatography*

GOD – Glicose oxidase

GH – Enzima glicosil-hidrolase

G – Resíduo α -L-gulurônico (ácido gulurônico)

HPLC – do inglês, *High performance liquid chromatography*

kDa – do inglês, *Kilodalton*

K_{cat} – Constante catalítica

K_m – Constante cinética de Michaelis-Menten

LB – Meio Luria-Bertani

LPMO – do inglês, *Lytic polysaccharide monooxygenases*

M – Resíduo β -D-manurônico (ácido manurônico)

NRS – Espectroscopia de ressonância nuclear magnética

PMSF – do inglês, *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

pNP-G – p-nitrofenol- β -glicopiranosídeo

POD – Peroxidase

SDS – do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate

SWO – Proteína *swollenin*

U – Unidade de atividade enzimática

$V_{m\acute{a}x}$ – Velocidade máxima

2G – Etanol de segunda geração

1G – Etanol de primeira geração

3G – Etanol de terceira geração

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Apresentação da atividade enzimática, concentração de proteína, atividade enzimática específica e rendimento obtidos no processo de imobilização utilizando alginato de sódio nas concentrações de 2 e 3%.	63
Tabela 2. Quantificação da atividade enzimática, proteína, atividade específica e rendimento de imobilização obtidas na imobilização em diferentes pHs.....	64
Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para a enzima livre e para a imobilizada com 3% alginato.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da lignocelulose. A celulose, principal componente da lignocelulose, consiste em um polissacarídeo formado por unidades de glicose repetidas unidas por ligações do tipo β (1,4). A hemicelulose, segundo componente mais abundante da lignocelulose, é constituído por açúcares de 5 e 6 carbonos como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é constituída de três componentes fenólicos principais denominados álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Juntas, essas três estruturas formam as microfibrilas, que estão organizadas em macrofibrilas que garantem a estabilidade estrutural da parede celular vegetal (Adaptação de <i>Genome Management Information System</i> , 2005).	25
Figura 2. Ação das celulasas tradicionais e das recém descritas sobre o polímero de celulose. Enzimas endoglicanases (EG), celobiohidrolases (CEL6A e CEL7A), β -glicosidase (BG), LPMO (AA9) e proteínas <i>swollenin</i> (SWO) (DE PAULA et al., 2018).	31
Figura 3. Reações possíveis da enzima β-glicosidase. A. Hidrólise. B. Transglicosilação (SRIVASTAVA et al., 2019)	34
Figura 4. Tipos de imobilizações enzimáticas. Imobilização por adsorção, por ligação covalente, encapsulamento e/ou aprisionamento e ligação cruzada (cross-link) (NGUYEN; KIM, 2017).	37
Figura 5. Estrutura química dos resíduos M e G constituintes do polímero do ácido algínico que originam o polímero alginato. (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; DA SILVA, 2008).	38
Figura 6. Mecanismo de gelificação chamado de modelo “caixa de ovos”. (PAQUES et al., 2014)	40
Figura 7. Método de gelificação externa. Formação do gel de alginato no método de gotejamento.....	41
Figura 8. Figura ilustrativa do método de preparo das <i>beads</i>. A seringa foi posicionada a uma distância de 6 cm do início da solução de CaCl_2 0,2M enquanto essa se mantinha em agitação lenta, a temperatura ambiente.	48
Figura 9. Esquema da reação de transglicosilação	56
Figura 10. Expressão β-glicosidase Lfa2. As frações da produção e expressão da enzima BG-Lfa2 foram analisadas em SDS-Page. M. Marcador de peso molecular; t0. Lisado celular antes da indução por IPTG. 1. Sobrenadante do cultivo celular. 2. Lisado celular (extrato enzimático).	59
Figura 11. Vizualização das <i>beads</i> imobilizadas com diferentes concentrações de alginato de sódio. A enzima BG-Lfa2 livre foi imobilizada com 1, 2 e 3% de alginato de sódio. A. Alginato de sódio 1%; B. Alginato de sódio 2%; C. Alginato de sódio 3%.	60

Figura 12. Diferentes formatos e tamanhos das beads. Visualização mais detalha das beads imobilizadas com diferentes concentrações de alginato. A. Alginato de sódio 1%; B. Alginato de sódio 2%; C. Alginato de sódio 3%.61

Figura 13. Microscopia de Varredura das beads. A. Alginato de sódio 1%, aumento de 30x; B. Alginato de sódio 1%, aumento de 100x; C. Alginato de sódio 1%, aumento 200x. D. Alginato de sódio 2%, aumento de 30x; E. Alginato de sódio 2%, aumento de 100x; F. Alginato de sódio 2%, aumento 200x; G. Alginato de sódio 3%, aumento de 30x; H. Alginato de sódio 3%, aumento de 100x; I. Alginato de sódio 3%, aumento 200x.....62

Figura 14. Efeito da temperatura na atividade enzimática. A atividade da enzima livre e imobilizada foi testada nas temperaturas de incubação de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.66

Figura 15. Efeito do pH na atividade enzimática. A atividade foi avaliada em resposta a variação do pH do meio. Os pHs testados foram: 2,0, 3,0, 3,5, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.67

Figura 16. Efeito do tempo de incubação na atividade enzimática. Para avaliar tal parâmetro variou-se o tempo de incubação da BG-Lfa2 livre e imobilizada com o substrato entre 5 e 35 minutos. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.68

Figura 17. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação de K_M , K_{cat} e $V_{máx}$. Diferentes concentrações do substrato pNP-G foram usadas para avaliar sua influência na atividade de BG-Lfa2 livre e imobilizada. As concentrações utilizadas foram 0,5, 1, 3, 6, 9, 12 e 15 mM. Os parâmetros cinéticos e o gráfico foram confeccionados no programa GraphPad Prism (versão 8.0.2). **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.69

Figura 18. Influência da concentração de etanol na atividade enzimática da enzima BG-Lfa2. Concentração de etanol testadas de 0 a 40%. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.70

Figura 19. Hidrólise enzimática da celobiose pela BG-Lfa2 livre e imobilizada com 2 e 3% de alginato. A capacidade hidrolítica da enzima BG-Lfa2 imobilizada e livre foi avaliada sobre o substrato celobiose na concentração de 150 mM A. Concentração de glicose produzida pelas enzimas livre e imobilizada 2% (**em verde**). B. Concentração de glicose produzida pelas enzimas livre e imobilizada 3% (**em azul**).72

Figura 20. Perfis cromatográficos da reação de hidrólise da celobiose pela BG-Lfa2. A. Enzima livre. B. Enzima imobilizada 2%. C. Enzima imobilizada 3%.74

Figura 21. Avaliação do reuso enzimático. A possibilidade de reuso das *beads* foi avaliada realizando-se repetidas atividade enzimáticas utilizando as mesma *beads* até que não fosse mais possível a observação de atividade enzimática75

Figura 22. Perfil cromatográfico de purificação por FPLC. A. Perfil obtido através das atividades enzimáticas de cada fração (tubo) da purificação. Os números das frações correspondem aos números dos tubos os quais foram realizados a atividade enzimática. B. Perfil apresentado pelo programa.....76

Figura 23. Eletroforese SDS-Page da purificação por FPLC. A. M. Marcador de peso molecular; ExE. Lisado celular; Fl. *Flow through*; L. Lavagem; 1. Eluição fração 1; 2. Eluição fração 2; 3. Eluição fração 3; 4. Eluição fração 4; 5. Eluição fração 8; 8. Eluição fração 8. B. M. Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); 9. Eluição fração 9; 18. Eluição fração 18; 19. Eluição fração 19; 20. Eluição fração 20; 21. Eluição fração 21; 22. Eluição fração 22; 23. Eluição fração 23; 24. Eluição fração 24; 25. Eluição fração 25.....77

Figura 24. Reação de transglicosilação da BG-Lfa2 livre. A capacidade de transglicosilação da enzima BG-Lfa2 imobilizada e livre foi avaliada utilizando-se 0, 10, 20, 50, 60, 70 e 80% de metanol na reação. **Em rosa:** transglicosilação da BG-Lfa2 imobilizada. **Em verde:** transglicosilação da BG-Lfa2 livre.78

Figura 25. Avaliação da estabilidade enzimática. A estabilidade enzimática da BG-Lfa2 livre e imobilizada 2 e 3% foram analisadas durante 80 dias mantidas em solução de cálcio com e sem etanol. **Em azul:** enzima imobilizada 2% em solução cálcio 0,03 M. **Em amarelo:** enzima imobilizada 2% em solução cálcio 0,005 M com etanol 30%. **Em rosa:** enzima imobilizada 3% em solução cálcio 0,03 M. **Em verde:** enzima imobilizada 3% em solução cálcio 0,005 M com etanol 30%. **Em laranja:** enzima livre.80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Bioetanol	23
2.1.1. Biomassa lignocelulósica	25
2.1.1.1. Celulose	26
2.1.1.2. Lignina	26
2.1.1.3. Hemicelulose	27
2.2. Hidrólise enzimática e celulases	28
2.2.1. β -glicosidase (BG)	31
2.3. Imobilização enzimática	35
2.3.1. Alginato	37
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.1.1. Objetivos Específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. Obtenção e manutenção da enzima β -glicosidase	46
4.2. Expressão da enzima β -glicosidase	46
4.3. Rompimento celular	47
4.4. Imobilização enzimática	47
4.5. Determinação da concentração de proteína	48
4.6. Determinação de atividade enzimática	48
4.7. Determinação da eficiência de imobilização e da atividade específica	49
4.8. Caracterização das <i>beads</i> produzidas	50
4.9. Influência do pH na imobilização enzimática	51
4.10. Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada	51
4.10.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática	51
4.10.2. Efeito do pH na atividade enzimática	52
4.10.3. Efeito do tempo de incubação na atividade enzimática	52
4.10.4. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática	52
4.10.5. Determinação dos parâmetros cinéticos	52
4.10.6. Efeito da concentração de etanol na atividade enzimática	52

4.10.7. Hidrólise enzimática da celobiose	53
4.10.7.1. Dosagem dos produtos da hidrólise pelo método High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	53
4.10.7.2. Dosagem de glicose produzida na hidrólise pelo método enzimático	54
4.11. Avaliação da estabilidade enzimática	54
4.12. Avaliação do reuso enzimático.....	54
4.13. Purificação da enzima BG-Lfa2 pelo método FPLC	55
4.13.1. Ensaios de transglicosilação	55
5. RESULTADOS.....	59
5.1. Expressão da BG-Lfa2	59
5.2. Caracterização das <i>beads</i> produzidas	60
5.2.1. Análise visual	60
5.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
5.3. Efeito da porcentagem de alginato na imobilização enzimática	62
5.4. Efeito do pH na imobilização enzimática.....	64
5.5. Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada	65
5.5.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática	65
5.5.2. Efeito do pH na atividade enzimática	66
5.5.3. Efeito do tempo de incubação na atividade enzimática	67
5.5.4. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação dos parâmetros cinéticos.....	68
5.5.5. Efeito da concentração de etanol na atividade enzimática	70
5.5.6. Hidrólise enzimática da celobiose	71
5.6. Reuso da enzima imobilizada	74
5.7. Purificação da BG-Lfa2 para a imobilização	75
5.7.1. Reação de transglicosilação	77
5.8. Avaliação da estabilidade enzimática.....	79
1. DISCUSSÃO	82
2. CONCLUSÕES.....	91
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A economia mundial é altamente dependente de fontes de energia fósseis, como o petróleo, carvão e gás natural, os quais são utilizados para produção de combustíveis, eletricidade e outros bens. Essas fontes de energia, chamadas de não renováveis, são originadas por meio de processos que ocorrem naturalmente ao longo de milhares de anos, como a decomposição de animais e vegetais que são depositados em camadas profundas da crosta terrestre ou do fundo dos mares. Nas últimas décadas, com o constante crescimento populacional, deu-se o excessivo consumo desses combustíveis fósseis, principalmente nas grandes áreas urbanas, aumentando a dependência e a preocupação com a escala de preço do petróleo que tende a subir devido à existência de quantidades limitadas na natureza e pela possibilidade de esgotamento de suas reservas. Portanto, é essencial a utilização de produtos de base biológica para reduzir a dependência e o consumo de combustíveis fósseis como fonte de energia (BHATTARAI et al., 2011; DODD, D.; CANN, 2009; MOHD AZHAR et al., 2017; SARKAR et al., 2012; THOMAS, 2009).

Além do esgotamento das reservas naturais, outro impacto negativo associado à utilização dos combustíveis fósseis é o uso indiscriminado dessa fonte de energia, o qual ocasiona consequências drásticas que afetam o meio ambiente, tais como a intensificação do aquecimento global pelo aumento da emissão de gases que provocam o efeito estufa e acarretam mudanças climáticas significativas no planeta, derramamentos de óleo e geração de resíduos tóxicos que contribuem para a poluição e destruição de faunas e floras. Esses impactos vêm despertando o interesse pela busca de alternativas energéticas sustentáveis como solução para o uso de fontes não renováveis de energia (HEAD; GRAY, 2016).

Neste cenário, fontes renováveis como o uso da água, do vento, do sol e do calor geotérmico podem ser alternativas para o setor de geração de energia, enquanto que a biomassa pode ser empregada na produção de combustíveis e na indústria química em um futuro próximo (SARKAR et al., 2012). Assim, o desenvolvimento de biocombustíveis passou a ser um interesse mundial.

Foi neste contexto que, em meados da década de 70 com a crise mundial do petróleo, o governo brasileiro lançou o programa PROÁLCOOL, programa de estímulo à produção de biocombustíveis, o qual estabeleceu a adição de uma porcentagem de etanol na gasolina para reduzir a emissão de gases de efeito estufa e também a

dependência da importação do petróleo. Isso porque o etanol possui algumas características particulares como, sua massa ser constituída por 35% de oxigênio, o que possibilita uma combustão mais limpa e um melhor desempenho dos motores, contribuindo para reduzir a emissão de poluidores (DA CRUZ; GUERREIRO; RAIHER, 2012)). Portanto, o bioetanol possui algumas vantagens frente a gasolina como maior número de octanos (108), limites mais amplos de inflamabilidade, maiores velocidades de chamas e aumento do calor de vaporização, menor toxicidade, facilmente biodegradável e produção de menos poluentes no ar (MOHD AZHAR et al., 2017).

O Centro Nacional de Informações Energéticas (NEIC), situado em Washington, estima que o consumo global de gasolina deve atingir em torno de 1,7 trilhão de litros em 2025, sendo necessários 54 bilhões de galões de etanol para substituir 10% desse consumo. No entanto, a produção mundial atualmente é de cerca de 24 bilhões de galões, sendo os EUA o maior contribuinte com 14 bilhões de galões, seguido pelo Brasil com uma produção de 5,6 bilhões de galões (GLODEMBERG, 2007).

A conversão de carboidratos derivados de plantas em bioetanol consta uma das principais fontes de energia renovável para os biocombustíveis. O bioetanol pode ser produzido a partir de diversas plantas cultivadas como trigo, beterraba, milho, mandioca, sendo que o caldo extraído da cana-de-açúcar apresenta o rendimento mais vantajoso (Raízen, 2018). Portanto, para produzir o bioetanol, indústrias brasileiras e americanas desenvolveram processos que fazem uso da sacarose da cana-de-açúcar e do amido de milho, tornando-se atualmente os dois principais países do mundo que produzem este biocombustível, detendo juntos 84% da produção mundial (LOPES et al., 2016a; SOUZA; LEITE; BUCKERIDGE, 2013).

A utilização do etanol como combustível tem gerado um debate mundial pela utilização do terreno destinado ao plantio da matéria-prima utilizada para sua produção ser o mesmo empregado para o plantio de alimentos. Desse maneira, tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção ganham destaque como, aperfeiçoamento da produção do etanol de primeira geração (1G) a partir da sacarose, desenvolvimento científico e tecnológico da produção do etanol de segunda geração (2G) a partir de celulose e hemicelulose (PACHECO, 2011).

Esses processos de produção do etanol podem ocorrer por duas vias, a química e a biológica. A via química é baseada na hidratação do etileno, enquanto a biológica

consiste na utilização de alguns tipos de microrganismos (LOPES et al., 2016b). Esses microrganismos são responsáveis pela produção de enzimas utilizadas na hidrólise da biomassa. A hidrólise enzimática oferece alguns benefícios como, uma maior conversão da holocelulose em açúcares fermentescíveis e reduzida formação de subprodutos que acarretam prejuízos para o processo. Entretanto, o alto custo dessas enzimas é o principal desafio da sua utilização, sendo necessária a busca por fontes mais acessíveis, como os microrganismos lignocelulolíticos (LEU; ZHU, 2013; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

Os microrganismos celulolíticos são produtores de enzimas capazes de degradar a biomassa lignocelulósica, chamadas celulasas. As celulasas formam um complexo enzimático constituído por endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidades que, agindo sinergicamente sobre o polímero de celulose são capazes de degradá-lo e tornar os açúcares susceptíveis à fermentação. Embora a β -glicosidase não tenha ação direta sobre o polímero de celulose, ela possui extrema importância para o funcionamento desse mecanismo sinérgico, pois são capazes de hidrolisar moléculas de celobiose, produto da ação das endo e exoglicanases sobre o polímero de celulose, que quando presentes acarretam na inibição da ação dessas enzimas do complexo, sendo a enzima chave do processo de hidrólise (AHMED et al., 2017; ALVES et al., 2018).

Nesse contexto, para alcançar uma conversão mais eficiente de celobiose em glicose é fundamental explorar novas β -glicosidases provenientes de diversos microrganismos diferentes, assim como novas técnicas capazes de um melhor aproveitamento do potencial dessa enzima. Assim, neste trabalho foi realizada a imobilização da enzima BG-Lfa2, proveniente de uma metagenômica, no polímero alginato de sódio a fim de viabilizar sua utilização na produção de etanol 2G por ser uma técnica que permite a reutilização da enzima várias vezes, melhora da estabilidade e proteção enzimática, gerando uma queda nos custos de produção (FERREIRA et al., 2018; WU et al., 2018).

Revisão
Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bioetanol

O caldo da cana, o melaço ou a mistura dos dois são usados como base na fermentação para produção de bioetanol, gerando um produto com um teor alcoólico entre 6 e 8%, chamado de mosto fermentado. Esse teor aumenta após a fermentação, onde é feita a separação das células de levedura pela centrifugação, a destilação do meio fermentado e retificação do destilado originando um produto com teor alcoólico de 94-95% (HENRIQUE; COSTA; ANTONIA, 2001; ROGERS; JEON; SVENSON, 2005; RYAN; JOHNSON, 2001).

Em usinas produtoras de açúcar com destilarias anexas, para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são produzidos em torno de 150 kg de açúcar e 70 litros de etanol, e geram aproximadamente 300 kg de bagaço e 980 litros de vinhoto, entre outros resíduos (NANDY; SHASTRY; KAUL, 2002). Os subprodutos do processo de produção do etanol podem ser utilizados para outras finalidades como, o vinhoto pode ser aproveitado como fertilizantes e produção de biogás; a torta de filtro, composto orgânico oriundo do processo de clarificação do açúcar, é composta por bagaço de cana moído e pelo lodo de decantação e pode ser empregada como fertilizante (DOS SANTOS, 2012); a indústria alimentícia se utiliza da biomassa microbiana para produção de ração animal, por apresentar 40% de proteína em sua composição, e além disso, o CO₂ produzido pode ser utilizado pelas fábricas de refrigerantes e indústria química (ROGERS; JEON; SVENSON, 2005). As chamadas “biorrefinarias” têm o mesmo princípio das refinarias. Entretanto, as biorrefinarias utilizam material biológico, em vez de fontes fósseis, para a produção de combustíveis, substâncias químicas e energia (DOS SANTOS, 2012).

O etanol de primeira geração (1G) é obtido pelo processo convencional de produção, ou seja, pela moagem da cana e fermentação dos açúcares prontamente disponíveis presentes no caldo. Já o etanol de segunda geração (2G), também conhecido como etanol celulósico, necessita de um processo mais complexo, no qual requer uma série de etapas como o pré-tratamento do material lignocelulósico para a quebra da matriz estrutural, hidrólise dos açúcares poliméricos em monoméricos e fermentação, assim como etapas de separação e purificação. Assim, sua produção envolve o aproveitamento de todo o açúcar existente na planta e não somente no caldo, necessitando da disponibilização do açúcar por processos químicos e

enzimáticos, tornando o processo mais caro e dispendioso (GUSAKOV, 2011; MACRELLI; GALBE; WALLBERG, 2014; MOHANRAM et al., 2013). Recentemente também já é possível a obtenção do etanol de terceira geração (3G), o qual é produzido a partir da biomassa de algas, incluindo as micro e as macroalgas (MOHD AZHAR et al., 2017).

Existem maiores vantagens quando os processos de obtenção de etanol de 1G e 2G são compartilhados dentro da mesma planta e os principais desafios encontrados neste processo são maximizar a conversão de lignocelulose e minimizar a perda de açúcares, o que é difícil utilizando condições operacionais suaves (MACRELLI; GALBE; WALLBERG, 2014). O etanol 2G pode ser considerado o mais importante por ser proveniente de biomassa lignocelulósica, como palha de milho e de trigo, resíduos de madeira e bagaço de cana, as quais são abundantes e de baixo valor comercial, além de não competirem com os cultivos destinados a alimentação (MARIA et al., 2010; MOHANRAM et al., 2013).

Vale ressaltar que o sucesso para obtenção de biocombustíveis 2G depende muito do investimento em pesquisas e da aplicação dos conhecimentos adquiridos na produção dos biocombustíveis 1G (AMORIM et al., 2011). A eficiência da produção de bioetanol em escala industrial é muito dependente de microrganismos que possuam características como, tolerância à altas temperaturas, à altas concentrações de glicose e à altas concentrações de etanol, as quais na maioria das vezes são alcançadas através da modificação genética desses microrganismos. Além disso, diferentes técnicas como a imobilização enzimática e de células oferecem benefícios para a produção como maior densidade celular por volume de reator, fácil separação do meio reacional e a possibilidade de reuso, maior conversão do substrato, menor inibição do produto e menor tempo de reação (MOHD AZHAR et al., 2017). Portanto, a biotecnologia é uma ferramenta fundamental que pode ajudar a reduzir drasticamente os custos da produção de etanol 2G que, por sua vez, é muito promissor por ser proveniente de uma fonte abundante, de baixo custo, podendo atingir altos rendimentos, ser ambientalmente vantajoso e ter propriedades combustíveis desejáveis (WYMAN, 2007).

2.1.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica pode ser definida como qualquer matéria de origem vegetal com capacidade de fornecer bioenergia pelo processamento dos componentes energéticos que as compõem (POPPER, 2008). São as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza, sendo compreendida, majoritariamente, pelas matérias agroindustriais, resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas (DE CASTRO; PEREIRA, 2010). A composição precisa da biomassa lignocelulósica é dependente da espécie vegetal, tipos de tecidos que a compõem, época e localização geográfica que ocorrem (BENOCCI et al., 2017).

Lignocelulose é o material fibroso que forma a estrutura e as paredes celulares das plantas. Contudo, a parede celular compreende a maior parte do peso seco da planta, sendo composta, principalmente, por cerca de 40 a 50% de celulose, 20 a 25% de lignina e 15 a 25% de hemicelulose, e 5 a 10% consiste de outros componentes (LANGE, 2007; ZENG; HIMMEL; DING, 2017). A figura abaixo representa a estrutura da biomassa lignocelulósica.

Figura 1. Estrutura da lignocelulose. A celulose, principal componente da lignocelulose, consiste em um polissacarídeo formado por unidades de glicose repetidas unidas por ligações do tipo β (1,4). A hemicelulose, segundo componente mais abundante da lignocelulose, é constituído por açúcares de 5 e 6 carbonos como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é constituída de três componentes fenólicos principais denominados álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Juntas, essas três estruturas formam as microfibrilas, que estão organizadas em

macrofibrilas que garantem a estabilidade estrutural da parede celular vegetal (Adaptação de *Genome Management Information System*, 2005).

2.1.1.1. Celulose

A celulose é o componente encontrado em maior abundância na parede celular vegetal e sua estrutura é formada por anéis β -D-glicopirranose, sendo representada empiricamente pela fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ (POPPER, 2008). É um homopolímero, resistente e insolúvel a água. Sua rigidez vem do fato de suas longas cadeias serem constituídas por subunidades de D-glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo β (1,4) e não apresentarem ramificações. Devido à configuração espacial alternada das ligações glicosídicas, a unidade de repetição de duas glicoses gera uma celobiose, um dissacarídeo (FARINAS, 2011; LEE; HAMID; ZAIN, 2014; BERG et al., 2014; NELSON e COX, 2014).

As moléculas de glicose são ligadas umas às outras por ligações de hidrogênio, enquanto suas cadeias se mantêm ligadas por forças de van der Waals. Há uma inversão na ligação das moléculas de glicose de 180° em relação umas às outras e são essas orientações e as quantidades de ligações de hidrogênio presentes entre as moléculas que definem a forma cristalina ou amorfa da estrutura da celulose (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992). As cadeias planares se ligam umas às outras por ligações intramoleculares, permitindo sua organização em microfibrilas. Contudo, a celulose se torna insolúvel em água com seus grupos hidroxilas ligados uns aos outros, dando caráter hidrofóbico a molécula (FARINAS, 2011; LEE; HAMID; ZAIN, 2014). As regiões amorfas, por apresentarem maior área superficial e maior facilidade de penetração das moléculas de água no interior das fibras, são mais suscetíveis à hidrólise. A junção dessas duas regiões dão a estrutura um caráter hidrofílico e muito resistente (DAVID N.-S, 1994; BERG et al, 2014).

2.1.1.2. Lignina

A lignina é um polímero aromático complexo depositado predominantemente na parede secundária das plantas e, juntamente com polímeros de carboidratos, como a celulose e a hemicelulose, constitui a maior parte dos materiais lignocelulósicos. Assim, a lignina que se encontra reticulada com esses outros componentes da parede celular fornece força para tecidos e fibras vegetais e rigidez para a parede celular.

Além da função estrutural, a lignina também apresenta função na defesa contra estresses abióticos e bióticos, como patógenos e insetos (FREI, 2013).

Esse polímero pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e é encontrada em tecidos que estão relacionados com a condução de solutos e suporte mecânico (FARINAS, 2011). A unidade formadora da molécula de lignina é o fenilpropano, que tem como principais precursores o ácido cumarílico, coniferílico e sinapílico, originando uma macromolécula tridimensional e amorfa. As ligações presentes na lignina são do tipo éter, formando uma estrutura mais aberta e as ligações entre os carbonos fazem com que os monômeros fiquem mais próximos uns dos outros, tornando a estrutura da lignina mais condensada. Esse grau de condensação altera a reatividade da lignina (VANHOLME et al., 2010).

A produção de etanol oriundo da biomassa lignocelulósica apresenta um alto custo devido à dificuldade de liberação dos monossacarídeos durante a hidrólise enzimática da parede vegetal pela lignina se encontrar atrelada à holocelulose, tornando-a resistente à ação das enzimas. Então, para que esse processo ocorra, diferentes tipos de pré-tratamentos, mecânicos, químicos e térmicos, tem sido desenvolvidos a fim de promoverem esse rompimento da parede celular tornando o material lignocelulósico acessível a ação das enzimas holocelulolíticas (VANHOLME et al., 2012).

2.1.1.3. Hemicelulose

A hemicelulose é outro componente essencial que faz parte da constituição da parede celular das plantas, sendo responsável por um terço da parede celular. É um heteropolissacarídeo solúvel em água composto por diferentes tipos de açúcares como pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácido galacturônico e 4-O-metilglicurônico), as quais estão ligadas à celulose intrinsecamente, conferindo propriedades específicas à parede celular e regulando o crescimento e desenvolvimento da planta. Esses açúcares são ligados entre si por ligações $\beta(1,4)$ glicosídicas, formando uma estrutura principal a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas (FARINAS, 2011; PEREIRA RAMOS, 2003; YUAN, 2016).

Geralmente, as hemiceluloses são classificadas de acordo com o principal resíduo de açúcar que apresentam em seu esqueleto, tais como xilanas, glicanas ou

mananas. Além disso, variadas subclasses de hemiceluloses podem ser encontradas, como glucuronoxilanas, xiloglucanas, arabinoxilanas, glicomananas, mananas lineares galactomananas, galactoglicomananas e β -glucanas, as quais são dependentes da espécie da planta, tipo de tecido apresentado e estágio de desenvolvimento em que se encontram (OGEDA; PETRI, 2010). A hemicelulose possui uma estrutura diversificada que a permite interagir por meio de interações de hidrogênio entre si e com as microfibrilas da celulose. Além disso, há algumas evidências de que a hemicelulose seja capaz de se ligar covalentemente à lignina e à outros polissacarídeos, como a pectina (PAULY et al., 2013).

O principal polissacarídeo encontrado na molécula de hemicelulose é o xilano. O xilano é um heteropolissacarídeo constituído por resíduos D-xilopiranosil, os quais são unidos por ligações do tipo β (1,4) e podem representar até 20% do peso seco da parede celular de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas. A estrutura da hemicelulose é uma cadeia curta, com alto grau de ramificação pelas pentoses e hexoses, e devido a presença dessas ramificações e de grupos acetil, a hemicelulose não apresenta forma cristalina fazendo-a mais suscetível a hidrólise química (DODD; CANN, 2009; SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005).

2.2. Hidrólise enzimática e celulasas

De maneira geral, pode-se dizer que a obtenção de etanol à partir da biomassa se dá, primeiramente, pela hidrólise de polissacarídeos gerando mono e dissacarídeos e depois pela fermentação desses em etanol. A hidrólise de celulose gera produtos como glicose e dímeros de glicose que são as celobioses, enquanto que a hidrólise da lignina e hemicelulose gera açúcar e outros subprodutos como, difenóis, cetonas, furfural e ácido acético, produtos que inibem a fermentação microbiana (OGEDA; PETRI, 2010).

A hidrólise enzimática é considerada um método apropriado para a conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol, por proporcionar inúmeras vantagens ao processo, como condições de reação moderadas e elevado rendimento, sem produzir subprodutos tóxicos (BEN TAHER et al., 2017). Assim, a hidrólise enzimática da celulose em glicose é realizada por um grupo de enzimas denominadas celulasas (DOS SANTOS, 2012).

Além de serem empregadas na hidrólise de celulose para produção de etanol, as celulasas também apresentam aplicação em vários processos industriais, tais como, podem ser adicionadas aos detergentes para preservar a cor e a suavidade de tecidos, melhorar a remoção de partículas, aumentar valor nutricional de materiais celulósicos que servirão de alimento ao gado e aumentar a digestibilidade dessa matéria orgânica com alto teor de fibras, branqueamento de polpa de papel, processamento de amido e fabricação de cervejas (AHAMED; VERMETTE, 2008; XIAO; STORMS; TSANG, 2004). Essas enzimas começaram a ser estudadas durante a segunda Guerra Mundial, na ilha Salomon, no Pacífico Sul, quando os soldados norte-americanos notaram que suas fardas, bolsas, barracas e demais materiais, que eram fabricados de algodão, sofriam deteriorização (DE CASTRO; PEREIRA, 2010).

As celulasas podem ser produzidas por uma grande variedade de microrganismos (fungos e bactérias), no entanto, os fungos aeróbios são conhecidos por suas maiores taxas de crescimento e secreção de proteínas (VITCOSQUE et al., 2012). As bactérias anaeróbias *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens* são capazes de produzir celulasas com alta atividade específica, entretanto, a concentração de enzima produzida é baixa. Por essa razão, a maioria das pesquisas aplicadas a produção de celulasas são concentradas em celulasas provenientes de fungos, principalmente pelos filamentosos (DUFF; MURRAYH, 1996). Alguns fungos produtores de celulasas são *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochete chrysosporium*, espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium*, sendo os gêneros *Trichoderma* e o *Aspergillus* produtores da maioria das celulasas comerciais. A espécie *Trichoderma reesei* é o fungo alvo de pesquisas e o mais descritos na literatura por ser produtor de, pelo menos, duas celobiohidrolases, cinco endoglucanases e três endoxilanases (DUFF; MURRAYH, 1996; SARKAR et al., 2012; VITCOSQUE et al., 2012).

O sistema celulolítico do fungo *Trichoderma reesei* possui 60 a 80% de celobiohidrolases ou exoglicanases, 20 a 36% de endoglicanases e apenas 1% de glicosidases que atuam em sinergia para a conversão de celulose em glicose, sendo esse sistema deficiente em celobiasas, o que ocasiona um acúmulo de celobiose, o que pode reprimir e inibir a ação da enzima (AHAMED; VERMETTE, 2008). As celulasas formam um complexo enzimático no qual as enzimas agem sinergicamente e estão

subdivididas em três classes: endo-1,4- β -D-glicanases ou endoglicanases; exo-1,4- β -D-glicanases ou celobiohidrolases; e 1,4- β -D-glicosidades (OGEDA; PETRI, 2010b).

As endoglicanases são responsáveis por iniciarem a desconstrução da celulose hidrolisando as ligações glicosídicas presentes no meio das cadeia de celulose, de modo aleatório, liberando oligossacarídeos de tamanhos diversos, os quais são mais acessíveis a ação das celobiohidrolases, por fornecer-lhes novas extremidades de cadeias livres para que possam atuar. As endoglicanases fúngicas possuem atuação ótima em uma faixa de pH de 4 e 5, e em uma faixa de temperatura de 50 e 70° C (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009).

O segundo grupo, as exoglicanases ou celobiohidrolases, hidrolisam preferencialmente as ligações β -1-4-glicosídicas presentes nas extremidades das cadeias de celulose e de oligossacarídeos, produzindo celobiose como produto principal. A celobiose atua como um inibidor competitivo, podendo limitar a capacidade das enzimas do complexo na degradação da celulose, enquanto os oligossacarídeos são indutores das enzimas do complexo celulolítico. Essas enzimas são liberadas inicialmente a baixas concentrações, mas são suficientes para a hidrólise da celulose do meio. Essa enzima atua em um pH ótimo de 4 e 5 e em temperatura ótima de 37 e 60° C (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; KUBICEK et al., 2009; STRAKOWSKA; BŁASZCZYK; CHEŁKOWSKI, 2014).

Por fim, as β -glicosidades são responsáveis pela hidrólise de celobiose e oligossacarídeos de cadeias curtas em glicose, sendo então inibida competitivamente pela presença dela. Agem em sinergismo com as endoglicanases e celobiohidrolases e sua temperatura ótima pode variar de 45 a 75°C (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; STRAKOWSKA; BŁASZCZYK; CHEŁKOWSKI, 2014).

Além dessas três enzimas, recentemente tem sido descrito outro grupo de proteínas muito expresso em fungos que atuam no processo de conversão da biomassa lignocelulósica, as chamadas glicosil hidrolases pertencentes à família 61 (GH61/AA9s), recentemente renomeadas para LPMOs (*Lytic polysaccharide monoxygenases*). Tais enzimas agem diretamente sobre a celulose através de um mecanismo oxidativo, tornando-a mais acessível à ação das celulasas tradicionais. Outra proteína participante do processo de desconstrução da celulose é *swollenin*. Essa proteína possui a função de romper as ligações de hidrogênio existentes entre as microfibrilas da celulose sem hidrolisá-las, aumento a hidrólise da biomassa (DE

PAULA et al., 2018). O mecanismo de ação desse grupo de enzimas sobre a celulose pode ser visto na figura 2.

Figura 2. Ação das celulases tradicionais e das recém descritas sobre o polímero de celulose. Enzimas endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CEL6A e CEL7A), β-glicosidase (BG), LPMO (AA9) e proteínas *swollenin* (SWO) (DE PAULA et al., 2018).

2.2.1. β-glicosidase (BG)

A β-glicosidase (β-D-glicosil hidrolases, E.C. 3.2.1.21), conhecida como BG, é uma enzima que pode ser produzida por todos os organismos vivos, tais como fungos, bactérias, plantas, animais e humanos. Em plantas estão envolvidas na defesa, no metabolismo da parede celular, síntese de glucana, lignificação, no metabolismo secundário, amadurecimento e ativação de fito-hormônio; em microrganismos, participa da hidrólise de oligossacarídeos e celobiose, reciclagem do carbono e indução de genes que expressam enzimas celulases.

As β-glicosidase fúngicas tem papel na patogenicidade em fungos fitopatogênicos por serem capazes de hidrolisar a saponina, molécula antifúngica secretada pelo sistema de defesa de muitas plantas; em animais foi mais estudada em insetos onde foi encontrada em seu trato intestinal. Nos mamíferos essa enzima está envolvida na hidrólise de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) e em humanos sua deficiência causa a doença de Gaucher. Nessa doença a célula é incapaz de produzir a enzima, levando a um acúmulo de glicosilceramidas nos lisossomos que acarreta o aumento de órgãos como baço, fígado e glândulas linfáticas. Essa doença

acomete mais comumente o continente indiano (AHMED et al., 2017; AŠIĆ et al., 2015; BHATIA et al., 2008; NAGRAL, 2014; SALGADO et al., 2018).

As β -glicosidases apresentam ampla aplicação na indústria alimentícia por ser utilizada na produção de compostos aromáticos, pelo melhoramento das características organolépticas dos alimentos e pelo seu potencial uso no processamento de vinho e sucos, por apresentar atividade hidrolítica em terpenglicosídeos e antocianinas, as quais são os principais agentes corantes encontrados em alimentos de origem vegetal (AHMED et al., 2013; MARTINO et al., 2002).

Além das indústrias alimentícias, essas enzimas são de grande importância nos processos biotecnológicos, incluindo sua utilização na sacarificação de materiais lignocelulósicos para produção de biocombustíveis, por serem capazes de desconstruir a biomassa pela redução de celobiose ou celoligosacarídeos de cadeia curta em glicose (LIEW et al., 2018). Porém, a difícil separação da enzima do produto final e a impossibilidade de reutilização torna sua utilização limitada e, uma alternativa para solucionar tais problemas é a imobilização enzimática (FERREIRA et al., 2018).

As BGs recebem classificação de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos estruturais. Assim, estão reunidas em 6 famílias de hidrolases de glicosídeos, as GH 1, GH 3, GH 5, GH 9, GH 30 e GH 116, sendo a G1 a família com maior número de β -glicosidases já caracterizada (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). De acordo com a grande variedade de ligações glicosídicas que ocorrem naturalmente, existe uma gama de diferentes enzimas glicosilases, que são capazes de clivar tais ligações. Essa variedade é consequência da diversidade de seus substratos e das diferentes soluções evolutivas para o problema da construção de um sítio ativo capaz de hidrolisar uma ligação glicosídica (WITHERS, 2001).

Embora não haja diretamente na cadeia de celulose, ela desempenha um papel importante na indução das enzimas do complexo celulolítico e evita que a celobiose se acumule no meio. Esse acúmulo de celobiose inibe as endoglicanases e exoglicanases, ocasionando na inibição a hidrólise completa da celulose à glicose (STRAKOWSKA; BŁASZCZYK; CHEŁKOWSKI, 2014).

Essa enzima é capaz de hidrolisar ligações glicosídicas de muitos compostos sendo classificadas em três grupos de acordo com o substrato sobre o qual agem: 1- aril- β -glicosidases, as quais agem no substrato aril- β -D-glicosídeos; 2- celobiasas,

que hidrolisam somente oligossacarídeos; 3- β -glicosidases de ampla faixa, que exibem atividade em vários tipos de substratos (LIEW et al., 2018). Além disso, β -glicosidases agem sobre substratos como, alquil- β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos e dissacarídeos, liberando moléculas de glicose da extremidade não redutora, apresentando papel importante na hidrólise de composto celulolíticos (AHMED et al., 2017, 2013; BHATIA et al., 2008).

A afinidade de cada BG por um substrato específico é dependente da natureza da fonte dessa enzima, como por exemplo, a β -glicosidase produzida pela linhagem *Saccharomyce cerevisiae* possui uma alta atividade em substratos alquil, aril e β -D-glicosídeo, mas não em celobiose, como a β -glicosidase oriunda de *Aspergillus oryzae*, que é mais ativa em celobiose do que em p-nitrofenil β -glicosídeo (pNP-G). Essa afinidade por substratos específicos é compatível com a função fisiológica e localização da enzima (WOODWARD; WISEMAN, 1982).

Na reação de hidrólise realizada pela β -glicosidade, um grupo carboxílico (-COOH) presente no sítio ativo da enzima atua como um nucleófilo realizando ataques no carbono anomérico do substrato, a celobiose, formando um composto intermediário, um complexo entre a enzima-glicose. Enquanto isso, o outro grupo carboxílico do sítio ativo atua como um doador de prótons (ácido) (H^+), que cliva a ligação glicosídica doando um próton (H^+) ao oxigênio da ligação O-glicosídica, o que leva a formação de uma intermediária da enzima chamada de glicosil-enzima com liberação de glicose. Na segunda etapa, um grupo carboxílico atua como um receptor de prótons de um nucleófilo (base), o qual pode ser a água, um monossacarídeo, dissacarídeo e álcool, quebrando o complexo intermediário da enzima-glicose e liberando a enzima para uma nova reação (figura 3.A) (SRIVASTAVA et al., 2019).

O processo inverso da hidrólise, ou seja, a síntese de ligações glicosídicas, pode acontecer sob condições definidas de duas maneiras distintas: através da hidrólise reversa e da transglicosilação. Na transglicosilação (controlada cineticamente), um dissacarídeo é usado como substrato e o produto é formado via autocondensação, na qual a enzima transfere um resíduo glicosídico de um doador de glicosídeo para um aceitor com retenção na configuração anomérica e formação de um composto intermediário, um glicosil-enzima. Este é então preso por um nucleófilo (monossacarídeo, dissacarídeo, álcool arílico, amino ou alquílico ou álcool monoterpreno) para produzir um novo produto alongado (figura 3.B) (AHMED et al.,

2017; BHATIA et al., 2008; MANGAS-SÁNCHEZ; ADLERCREUTZ, 2015 (FRUTUOSO; MARANA, 2012).

(a) Mechanism of Cellobiose Hydrolysis

(b) Mechanism of Simultaneous Hydrolysis and Transglycosylation

Figura 3. Reações possíveis da enzima β -glicosidase. A. Hidrólise. B. Transglicosilação (SRIVASTAVA et al., 2019)

Estudos anteriores apontaram que as enzimas β -glicosidases, oriundas de diversos organismos diferentes, são inibidas por concentrações de glicose, produto da reação de hidrólise. A redução da atividade catalítica devido à essa inibição pode

resultar na limitação das aplicações da enzima, mas promoveu a busca por enzimas que apresentem propriedades cinéticas compatíveis com esse acúmulo de glicose (SALGADO et al., 2018). Além desses mecanismos de classificação das β -glicosidades, existe uma classificação em relação a tolerância à glicose ou a sua estimulação na presença dela. As quatro classes da enzima em relação à glicose são: 1. Forte inibição em baixas concentrações de glicose; 2. Tolerante à glicose; 3. Estimuladas sob baixas concentrações de glicose e inibidas sob alta concentração; 4. Não inibidas sob altas concentrações de glicose. As BG da classe 1 incluem as glicosidades da família GH3, enquanto a classe 2 e 3 compreende BGs da família GH1 (SRIVASTAVA et al., 2019).

2.3. Imobilização enzimática

O termo “imobilização enzimática” é usado para denotar enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região do espaço com a manutenção da sua atividade catalítica, e que pode ser utilizada continuamente e repetidamente (KATCHALSKI-KATZIR, 1993). Consiste em uma importante técnica utilizada para melhoramento da qualidade da enzima sendo um avanço no campo da biotecnologia enzimática. Assim, muitas técnicas têm sido relatadas como, encapsulamento de ligação de superfície, mutação e modificação de engenharia química (IMRAN et al., 2018).

Essa técnica consiste em um processo em que uma enzima é ligada a um suporte com o objetivo de manter sua atividade catalítica. Esse processo traz vantagens para a indústria, como por exemplo, maior resistência das enzimas às condições adversas dos meios reacionais, tornando-a mais estável, a possibilidade de reaproveitamento do catalisador e processamento contínuo, a redução dos custos e a ausência dela no produto final, o que evita possíveis alterações de sabor, odor e textura (FERREIRA et al., 2018; MARTINO et al., 2002; SILVA et al., 2008). Entretanto, há desvantagens como, a aleatoriedade de interação enzima-suporte, a dessorção da enzima com o uso, a redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais, de microambiente e estéreo-conformacionais (SILVA et al., 2008).

Polímeros naturais e sintéticos vem sendo usados como matrizes em técnicas de imobilização para aprisionar proteínas, enzimas, microrganismos, plantas e células animais (BUSTO; ORTEGA, 1905). O processo de imobilização pode ser feito por

meio de quatro diferentes métodos: imobilização por confinamento, por encapsulação, por adsorção ou ligação covalente (figura 4) (FERREIRA et al., 2018).

No método de adsorção a enzima é dissolvida em solução e então colocada em contato com um suporte sólido por um período de tempo fixo, sob condições adequadas, sem que esta perca sua atividade. A ligação da enzima com o suporte se dá através de ligações fracas do tipo van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Esse método é muito simples e econômico, livre de reagentes, de baixo custo e não interferem na atividade enzimática, mas apresenta desvantagens devidos as fracas ligações existentes entre a enzima e o suporte podendo ser quebradas facilmente por mudanças na temperatura, pH ou força iônica (NGUYEN; KIM, 2017; R. A. SHELDON; S. VAN PELT, 2013).

No método de ligação covalente as enzimas contendo um grupo funcional são ligadas ao suporte por ligações fortes do tipo ligações covalentes. O grupo funcional presente na enzima deve ser não essencial à atividade enzimática e na maioria das vezes são grupos carboxílicos, grupos tiol, grupo amino, grupo fenol, grupo imidazol ou grupo sulfidril. Nesse método há um risco alto de desnaturação enzimática, pois a maioria das enzimas precisam passar por modificações químicas para possuírem o grupo funcional, entretanto, aumenta a estabilidade enzimática com redução da atividade, sendo utilizado quando não se requer a presença da enzima no produto (KARTHICK S; NALLATHAMBI; S, 2012; NGUYEN; KIM, 2017).

No encapsulamento e/ou aprisionamento a enzima não é presa diretamente ao suporte, ela é, primeiramente, aprisionada em uma rede polimérica, a qual permite apenas o fluxo de substratos e produtos, restringindo a difusão da enzima. Portanto, primeiro há a mistura da enzima com uma solução monomérica, seguida da polimerização dessa solução monomérica por meio de uma reação química, não ocorrendo interação química entre a enzima e o polímero. Esse método melhora a estabilidade da enzima, diminuindo a difusão e desnaturação da mesma. Entretanto, possui algumas desvantagens como, uma possível dificuldade do substrato atingir o sítio ativo da enzima e um vazamento dela, se os poros da matriz forem muito grandes (NGUYEN; KIM, 2017).

O método de reticulação ou ligação cruzada (cross-link) é um método irreversível no qual ocorrem ligações covalentes entre as moléculas de enzima com auxílio de um reagente que realiza essas ligações, como o glutaraldeído, formando

um agregado tridimensional. Esse reagente realiza a ligação através dos grupos amino livres dos resíduos de lisina localizados em uma molécula da enzima com a molécula de enzima vizinha. Nesse método não ocorre o desprendimento da enzima do suporte, mas o uso de glutaraldeído pode resultar em modificações enzimáticas graves levando a perda da atividade (NGUYEN; KIM, 2017; R. A. SHELDON; S. VAN PELT, 2013).

Figura 4. Tipos de imobilizações enzimáticas. Imobilização por adsorção, por ligação covalente, encapsulamento e/ou aprisionamento e ligação cruzada (cross-link) (NGUYEN; KIM, 2017).

2.3.1. Alginato

Alginato é um polissacarídeo natural extraído da parede celular de diversas espécies de algas marinhas pardas (Phaeophyceae), as quais podem ser encontradas em praias rochosas ou nas áreas de oceano com fundo límpido e rochoso. Algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* também são capazes de produzir alginato (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI, 2008; SUMMA et al., 2017). Embora a estrutura do alginato bacteriano seja semelhante ao alginato proveniente de vegetais, seu papel biológico é diferente, atuando desde como uma película protetora, até como fator de virulência em bactérias patogênicas (MARQUES, 2011).

Os polímeros de alginato possuem propriedades atrativas como: não apresentam toxicidade, possuem caráter hidrofílico, são biodegradáveis e relativamente baratos. Sendo assim, o tornam alvo de pesquisas e aplicações industriais. Na indústria têxtil, cosmética, alimentícia, na qual é usado como

estabilizante de molhos e maionese, espessantes, emulsificantes e produção de imitações de cerejas, na agricultura e indústrias biotecnológicas (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI, 2008; MARQUES, 2011; SUMMA et al., 2017).

A estrutura do alginato consiste de cadeias lineares de resíduos de β -D-manurônicos (M) e α -L-gulurônicos (G) ligados covalentemente com ligações glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 4) em diversas proporções. Na molécula, o arranjo desses resíduos estão na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G) ligados alternadamente, sendo chamados de homopolímeros quando constituídos somente por um tipo de resíduo, G- ou M-, e heteropolímeros quando constituídos por resíduos MG-. Nos blocos G-G as ligações glicosídicas são do tipo α (1 $\rightarrow$ 4), enquanto que nos blocos M-M as ligações são β (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 5) (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI, 2008; GENG et al., 2019; LIAKOS et al., 2014).

Figura 5. Estrutura química dos resíduos M e G constituintes do polímero do ácido alginico que originam o polímero alginato. (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; DA SILVA, 2008).

O alginato, que representa mais de 40% da massa seca de algas marinhas pardas, é extraído como alginato de sódio e é caracterizado determinando-se a taxa

de M/G, com o auxílio da espectroscopia de ressonância nuclear magnética (NRS) (KLEINÜBING et al., 2013).

Estudos realizados por Garcia-Cruz e colaboradores (2008) mostraram que o alginato bacteriano apresenta mais vantagens que o alginato oriundo de algas, pois devido às suas características estruturais, como maior variabilidade na distribuição dos blocos “G” na molécula, possui ampla aplicação industrial. No entanto, o elevado grau de acetilação nesse alginato pode produzir géis muito forte e quebradiço, mas esse problema pode ser resolvido promovendo-se uma desacetilação ou adição controlada de cálcio.

Existem duas maneiras de se formarem os géis de alginato, a primeira por ligação iônica cruzada com cátions (géis iônicos) e a segunda por precipitação ácida (géis ácidos). A primeira é amplamente utilizada pelo encapsulamento de bioativos na indústria farmacêutica, alimentícia e imobilização de células e enzimas em indústrias biotecnológicas. A ligação do cátion divalente ao alginato é um processo altamente seletivo e a afinidade do alginato com o cátion aumenta da ordem de $Mn < Zn < Ni < Co < Fe < Ca < Sr < Ba < Cd < Cu < Pb$. Já os géis ácidos são formados quando o pH da solução é reduzido abaixo da constante de dissociação (pK_a) do polímero (β -D-manurônicos = 3,38 e α -L-gulurônico = 3,65), mas esses são menos estudados em relação aos géis iônicos pela sua limitada aplicação (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017).

A gelificação de alginatos é baseada na afinidade do alginato a alguns íons e a capacidade de ligar esses íons de forma seletiva e cooperativa. Portanto, a técnica de imobilização em alginato ocorre pela reação dos grupos carboxílicos presentes em cadeias adjacentes do polímero de alginato com cátions polivalentes, como o cloreto de cálcio ($CaCl_2$), para a formação de uma rede tridimensional. O alinhamento de duas cadeias forma uma cavidade hidrofílica que liga os íons Ca^{+2} por multicoordenação usando os átomos de oxigênio dos grupos carboxilas (figura 6). Esse mecanismo de gelificação é chamado “caixa de ovos”. Na formação da caixa de ovo, cada cátion se liga a quatro resíduos G para formar uma rede 3D. A utilização de cátions monovalentes e íons Mg^{+2} não são capazes de formar o gel (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017; DRAGET; SKJA; SMIDSRØD, 1997; JESUS, 2018; SOSNIK, 2014).

Figura 6. Mecanismo de gelificação chamado de modelo “caixa de ovos”. (PAQUES et al., 2014)

A ligação iônica mais seletiva está ligada ao conteúdo de resíduos G, ou seja, quanto maior a extensão dos blocos constituídos por resíduos G nas cadeias, maior a estabilidade mecânica e física dos géis, tornando a matriz mais rígida e quebradiça. O número de zonas de junção de cadeias de alginato podem ser alteradas por mudanças na concentração do cátion no processo e pela presença de agentes quelantes de cálcio como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), citratos, fosfatos, carbonatos e lactatos que podem ser usados para desestabilização do gel revertendo o processo de gelificação (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017; DONATI et al., 2005; SOSNIK, 2014).

Estudos realizados por Donati e colaboradores (2005) mostraram que ligações do tipo MG/GG e MG/MG também participam do processo de reticulação, aprimorando a teoria “caixa de ovos”, de modo que esses tipos de ligações também são capazes de gerar cavidades que acomodam íons cálcio, intervindo no comportamento mecânico dos géis.

A produção das matrizes de alginato para imobilização de células, enzimas e bioativos podem ocorrer pelo método de gelificação interna e externa, com cátions polivalentes como o Ca^{+2} . A gelificação externa (figura 7) é o método mais comum para produção de beads de alginato. Também é conhecida como “método de gotejamento” ou “método de difusão”, no qual a solução de alginato contendo as células ou o princípio ativo é gotejada em uma solução de CaCl_2 , com auxílio de uma

seringa, promovendo a reticulação da superfície, aproximando as cadeias do polímero e formando uma superfície menos permeável a difusão dos íons Ca^{+2} . As beads produzidas pelo gotejamento possuem normalmente uma faixa de tamanho entre 1 e 2 mm, mas seu tamanho e esfericidade é dependente da viscosidade do alginato, diâmetro da abertura da agulha, taxa de saída da solução de alginato e a altura que a agulha se encontra da solução de cálcio. Enzimas, células, óleos, aromas e extratos de plantas são exemplos de compostos encapsulados com esse método (CHAN; LEE; HENG, 2006; CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017; PAQUES et al., 2014).

Figura 7. Método de gelificação externa. Formação do gel de alginato no método de gotejamento.

Estudos realizados por Chan e colaboradores (2006) mostraram que as *beads* produzidas pela gelificação externa apresentaram forma esférica e filmes mais firmes, enquanto que as produzidas pela gelificação interna apresentaram forma irregulares e filmes mais flexíveis.

O alginato de sódio apresenta algumas propriedades funcionais como: em solução, a flexibilidade intrínseca de suas moléculas aumentam no sentido $\text{MG} < \text{MM} < \text{GG}$, embora a viscosidade da solução esteja ligada ao tamanho da molécula; as ligações de cátions e as propriedades de formação do gel dependem da sua composição e das sequências dos resíduos (M ou G); cátions divalentes como Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , se ligam preferencialmente e cooperativamente aos blocos G; resíduos G ligados diaxialmente formam cavidades para ligação dos íons, havendo a ligação desses locais com sequências similares presentes em outras cadeias formando essas

zonas, como mencionado anteriormente. Assim, o comprimento dos blocos G é a principal característica estrutural que contribui para a formação do gel (STRAND; MØRCH; SKJÅK-BRÆK, 2000).

O alginato apresenta termoestabilidade em uma faixa de temperatura de 0 a 100°C, mas essa estabilidade é bastante influenciada pela composição do alginato, ou seja, a presença de blocos M o torna menos estável do alginato com maior quantidade de blocos G. Acima de 100 °C ocorre a despolimerização do gel de alginato (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017).

Além da temperatura, o pH também influencia na formação do gel de alginato. Em pH ácidos há uma redução das partículas de gel, acarretando uma diminuição também de seus poros. Ao contrário, em pH básicos, há um inchaço das partículas do gel, levando ao aumento dos poros. Portanto, uma exposição prolongada das partículas de gel em pH altos levam a sua despolimerização (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017). O pH também influencia na solubilidade do alginato, assim quando o pH se encontra abaixo dos valores de pKa do alginato, este sofre precipitação levando a formação de ácidos algínicos, o qual é insolúvel em água. Quando o pH está acima do pKa do alginato, este se torna carregado negativamente, sendo estável em valores de pH 5,0 e 10,0 (LEITE, 2014).

Apesar da adequação do alginato como matriz de aprisionamento/imobilização, essa técnica possui algumas limitações como: baixa estabilidade, por existirem compostos capazes de sequestrarem os íons cálcio, como o citrato e fosfato, devido a alta afinidade resultando na desestabilização do gel; alta porosidade, pela formação de uma rede aberta que leva ao escape de moléculas grandes como proteínas, limitando seu uso. Contudo, na maioria dos casos essa característica é uma vantagem por permitir altas taxas de difusão de substratos e produtos; biocompatibilidade, alguns alginatos podem conter pequenas quantidades de polifenóis e devem estar livres de pirogênios e materiais imunogênicos, como proteínas e carboidratos complexos (STRAND; MØRCH; SKJÅK-BRÆK, 2000).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Imobilizar a enzima β -glicosidase Lfa2 recombinante em suporte de alginato de sódio com a finalidade de melhorar sua utilização na hidrólise da celobiose proveniente da degradação do bagaço de cana-de-açúcar.

3.1.1. Objetivos Específicos

- Testar a melhor concentração de alginato de sódio para a imobilização enzimática e avaliar a eficiência do método;
- Testar o melhor pH de imobilização para a atividade enzimática;
- Caracterizar bioquimicamente (temperatura, pH, concentração de substrato, tempo de reação e parâmetros cinéticos) a forma imobilizada da enzima e compará-la com sua forma livre;
- Verificar a influência do etanol na atividade enzimática;
- Avaliar a hidrólise do substrato celobiose pela enzima;
- Avaliar a estabilidade da enzima armazenada à 4 °C
- Testar a atividade de transglicosilação da enzima;
- Avaliar o reuso enzimático.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e manutenção da enzima β -glicosidase

A enzima β -glicosidase (BG-Lfa2) para esse estudo foi gentilmente cedida pelo laboratório da Prof^a Dr^a Maria Eugênia Guazzaroni do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto. O gene da BG-Lfa2 foi obtido de uma biblioteca metagenômica, na qual o organismo produtor foi isolado do solo da região secundária de floresta Atlântica, situada nos domínios da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 21°09'58.4"S, 47°51'20.1"W). O gene foi inserido na linhagem *E. Coli* Rosetta (DE3) para expressão e purificação (ALVES et al., 2018).

A linhagem foi mantida em placas contendo meio LB com antibiótico kanamicina (50 μ g/mL). Além disso, foi feito um estoque da linhagem incubando-se uma colônia em 10 mL de meio LB contendo kanamicina (50 μ g/mL), overnight (aproximadamente 16 horas), 37°C e 200 rpm de agitação (Incubador shaker – New Brunswick Scientific – Innova 42). No dia seguinte, foi adicionado glicerol à cultura com concentração final de 20%. A cultura foi aliquoteada e armazenada sob uma refrigeração de - 80°C.

4.2. Expressão da enzima β -glicosidase

Para a produção da enzima foi feito um pré-inóculo utilizando uma colônia em 10 mL de meio LB contendo o antibiótico kanamicina (50 μ g/mL). Esse pré-inóculo foi incubado por 16 horas (overnight), a 37°C com uma agitação de 200 rpm (Incubador shaker – New Brunswick Scientific – Innova 42). No dia seguinte, um volume de 3 mL do pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 1L contendo 300 mL de meio LB líquido acrescido de kanamicina 50 μ g/mL. O erlenmeyer foi mantido sob agitação (200 rpm 37°C) até atingir uma densidade ótica (DO) igual a 0,8 no comprimento de onda de 600 nm. Após atingir a DO estipulada, o inóculo foi resfriado a 4°C e a indução da expressão foi feita com 30 μ L de IPTG 1M, atingindo uma concentração final de 0,1 mM. O inóculo foi mantido em shaker sob agitação de 120 rpm a 18°C por aproximadamente 18 horas (ALVES et al., 2018).

4.3. Rompimento celular

O inóculo foi centrifugado a 10.000 rpm, a 4°C por 20 minutos (Centrifuge 5804R – Eppendorf) e o sobrenadante obtido foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em tampão de lise (HEPES 30 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, inibidor de protease (PMSF) 1mM e 1% Triton-x100). A solução foi mantida a 4°C por 20 minutos e então foi sonicada para o rompimento das células (Sonicador Fisher Scientific – FB 120). A sonicação ocorreu por 8 minutos com pulsos de 10 segundos, com descanso de 10 segundos e amplitude de 40%. O extrato resultante da lise foi novamente centrifugado a 10.000 rpm, 4°C e 30 minutos. O sobrenadante obtido foi reservado para os ensaios. Protocolo adaptado de Alves et al (2018).

4.4. Imobilização enzimática

O extrato enzimático obtido foi acrescido de alginato nas concentrações de 1, 2 e 3%. A mistura foi homogeneizada delicadamente, à temperatura ambiente, até que todo alginato se incorporasse ao extrato enzimático. Em seguida, a solução foi coletada com uso de uma seringa de 5 mL de volume acrescida de uma agulha de 0,8 x 25 mm. Posteriormente, realizou-se o gotejamento dessa mistura em 15 mL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,2 M, a qual se mantinha com agitação leve. A distância da ponta da agulha à solução de cloreto de cálcio foi de 6 cm, conforme mostrado na figura 8.

A solução de cloreto de cálcio contendo as *beads* produzidas foram mantidas à temperatura ambiente sem agitação por duas horas para descanso, o chamado “tempo de cura”. Em seguida, a massa total de *beads* produzidas foi pesada.

A massa de *bead* produzida foi lavada com uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,03 M. Para as lavagens, as *beads* foram totalmente submersas por 10 mL dessa solução e uma alíquota foi reservada. Após, a solução foi descartada e outros 10 mL dela foram adicionados a massa de *bead*. Esse procedimento de lavagem foi repetido até que nenhuma atividade enzimática pudesse ser detectada nas alíquotas reservadas. As *beads* foram então armazenadas a 4°C de duas formas diferentes, em solução de cálcio 0,02 M e em solução de cálcio 0,005 M acrescido de etanol 30%. Alíquotas de todas as lavagens foram guardadas para posterior quantificação de

proteína e atividade enzimática, as quais foram fundamentais para determinação da eficiência de imobilização da enzima.

Figura 8. Figura ilustrativa do método de preparo das *beads*. A seringa foi posicionada a uma distância de 6 cm do início da solução de CaCl_2 0,2M enquanto essa se mantinha em agitação lenta, a temperatura ambiente.

4.5. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma) como padrão. O ensaio foi realizado utilizando 160 μL de amostra e 40 μL do reagente de Bradford. A reação foi homogeneizada, incubada a 37 °C por 5 minutos e lida em espectrofotômetro (X-Mark – BioRad) a um comprimento de onda de 595 nm.

4.6. Determinação de atividade enzimática

A atividade da BG-Lfa2 foi determinada utilizando-se o método descrito por (DOS SANTOS CASTRO et al., 2014), adaptado para microtubos, com um volume total de reação de 1mL. A reação foi composta por 250 μL de tampão McIlvaine (tampão citrato-fosfato) pH 5,5 (50 mM), 200 μL de substrato pNP-G (4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo – Sigma-Aldrich) (10 mM) e 50 μL da enzima livre. A reação foi feita sob agitação leve (Shaker Rotisserie – Labquare) a uma temperatura de 50°C por 15 minutos. Posteriormente, a reação foi finalizada pela adição de 500 μL da

solução de carbonato de cálcio (CaCO_3) 1M. Em seguida, um volume de 100 μL dessa reação foi transferido para uma microplaca de 96 poços e lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática (1 U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar 1 μmol de substrato em 1 minuto de reação.

Para a realização dos ensaios enzimáticos a atividade da enzima em sua forma livre foi quantificada. Obtendo-se a quantidade de atividade enzimática (U) contida em 50 μL de enzima livre, volume de enzima livre utilizado em todas as reações enzimáticas, foi possível calcular qual a massa de *bead* que continha a mesma atividade enzimática (U).

4.7. Determinação da eficiência de imobilização e da atividade específica

Para determinar a eficiência de imobilização do extrato enzimático foi realizada a atividade enzimática da enzima livre e de todas as alíquotas obtidas da solução de cloreto de cálcio utilizada na produção das *beads* e nas lavagens. Cada valor de atividade (U) obtida dessas soluções de cálcio foram multiplicadas pelo volume de solução utilizada, 15 mL na solução de produção e 10 mL das soluções de lavagem. A atividade da enzima livre também foi dosada e multiplicada pelo volume de enzima utilizado no processo de imobilização. Assim, o valor da atividade enzimática perdida na produção das *beads* foi subtraído do valor de atividade enzimática encontrado para a enzima livre conforme mostrado na equação abaixo:

$$A_{Im}(U) = [A_L (U/mL) \times V_L(mL)] - A_{Perdida} (U)$$

Na qual,

A_{Im} = Atividade enzimática total imobilizada

A_L = Atividade enzimática da enzima livre

V_L = Volume de enzima livre utilizado para o processo de imobilização

$A_{Perdida}$ = Atividade enzimática total perdida no processo de imobilização (soluções de cloreto de cálcio de produção e lavagem das *beads*)

O valor obtido com essa equação correspondeu à *atividade total imobilizada*,

dada em U (unidades enzimáticas), contida na massa total de *beads* produzidas, que foram pesadas anteriormente. Obtido o valor da atividade enzimática no volume total de enzima livre utilizado para a imobilização, o rendimento de imobilização foi expresso em porcentagem da seguinte maneira,

$$\begin{array}{l} \text{Atividade enzimática total U (livre)} \text{ ----- } 100\% \\ \text{Atividade enzimática total U (imobilizada)} \text{ ----- } x \end{array}$$

Para o cálculo da *atividade específica*, a quantidade total de proteína presente no volume de enzima livre utilizado para imobilização assim como a proteína presente na solução de preparo e soluções de lavagens, foram quantificadas pelo método de Bradford e multiplicadas pelo seu volume, 15 mL de solução de cloreto de cálcio (0,2M) para a produção e 10 mL de solução de cloreto de cálcio (0,03M) para as lavagens. A soma da proteína perdida no preparo e nas lavagens foi subtraída da massa total de proteína da enzima livre, obtendo-se a massa de proteína que foi imobilizada,

$$P_{Im}(mg) = [P_L (mg/mL) \times V_L(mL)] - P_{Perdida} (U)$$

Na qual,

P_{Im} = Concentração de proteína total imobilizada

P_L = Concentração de proteína da enzima livre

V_L = Volume de enzima livre utilizado para o processo de imobilização

$P_{Perdida}$ = Proteína total perdida no processo de imobilização

Com os valores da atividade enzimática total (U) e da proteína total (mg) foi possível calcular a atividade específica:

$$A_{Específica}(U/mg) = \frac{A_{Total}(U)}{P_{Total}(mg)}$$

4.8. Caracterização das *beads* produzidas

As *beads* produzidas utilizando 1, 2 e 3% de alginato foram caracterizadas nos

aspectos macroscópicos e microscópicos. Macroscopicamente, as *beads* com as três porcentagens de alginato foram analisadas conforme tamanho, geometria e coloração. Para isso, as *beads* foram colocadas em placas de Petri e fotografadas com auxílio do Chemidoc (BioRad). Além disso, o diâmetro das partículas também foi mensurado com auxílio de uma régua. Microscopicamente, as *beads* foram analisadas pela técnica de microscopia de varredura (MEV) utilizando o microscópio Jeol JSM - 6610 LV com três aumentos (30, 100 e 200 vezes), os quais auxiliaram na análise das superfícies das partículas produzidas.

4.9. Influência do pH na imobilização enzimática

Para determinar qual a melhor faixa de pH para imobilização, a enzima foi expressa e obtida conforme descritos nos tópicos 4,2 e 4,3. Em seguida, o volume de extrato enzimático obtido foi dividido em três partes iguais, os quais corresponderam aos pHs 5,5, 7,4 e 8,5. Para o pH 5,5 foi utilizado o tampão acetato de sódio 1,5 M, para o pH 8,5 o tampão utilizado foi o Tris-HCl 1,5 M, enquanto e para o pH 7,4 foi utilizado o mesmo tampão da lise celular, tampão HEPES 1,5 M. Para que cada tampão atingisse uma concentração final de 150 mM e para que cada fração obtivesse o pH desejado, foi realizado o tamponamento desses extratos enzimáticos com adição de 460 µL de cada tampão a 4,6 mL do extrato enzimático. Após, as *beads* foram produzidas e a eficiência de imobilização calculada em cada pH.

4.10. Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada

Para a caracterização bioquímica da BG-Lfa2, foram realizados diversos ensaios enzimáticos, utilizando o extrato enzimático na forma livre e imobilizada 3% de alginato, nos quais suas atividades foram determinadas espectrofotometricamente de acordo com o método de Kusakabe (1980), modificando algumas variantes conforme a característica a ser determinada.

4.10.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A temperatura ótima foi determinada avaliando a atividade da BG-Lfa2 em

diferentes temperaturas. Para as reações foi utilizado tampão Mcllvaine pH 5,5 (50mM), tempo de incubação de 15 minutos e substrato pNP-G (5 mM). As temperaturas avaliadas foram 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C.

4.10.2. Efeito do pH na atividade enzimática

Para determinar o pH ótimo da enzima foi utilizada a solução tampão Mcllvaine na concentração de 50 mM e nos pHs 2, 3, 3,5, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, e 8. Em seguida, realizou-se o ensaio enzimático para determinar a atividade da BG-Lfa2 em cada pH, no qual a temperatura de incubação foi 50 °C, por 15 minutos e utilizando o substrato pNP-G (5 mM).

4.10.3. Efeito do tempo de incubação na atividade enzimática

Para avaliar o efeito do tempo na atividade enzimática, o ensaio foi realizado utilizando-se o tampão Mcllvaine pH 5,5 (50 mM), temperatura de 50°C e uma concentração final de 10 mM do substrato pNP-G (10 mM). Os tempos avaliados foram 5, 10, 15, 30 e 35 minutos de reação.

4.10.4. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

O efeito da concentração de substrato foi avaliado realizando-se a atividade enzimática com tampão Mcllvaine pH 5,5 (50 mM), temperatura 50°C e 15 minutos de reação, como foi estabelecido anteriormente. As concentrações de substrato pNP-G avaliadas foram 0, 1, 3, 6, 9, 12 e 15 mM.

4.10.5. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e constante de especificidade ($V_{m\acute{a}x}/K_m$) foram calculados com o auxílio do software GraphPad Prism (versão 8.0.2).

4.10.6. Efeito da concentração de etanol na atividade enzimática

O efeito da concentração de etanol foi avaliado realizando-se a atividade enzimática com tampão Mcllvaine pH 5,5 (50 mM), temperatura 50°C, 15 minutos de

reação e substrato pNP-G (10 mM), como estabelecido anteriormente. As concentrações de etanol no tampão variaram de 0 a 40%.

4.10.7. Hidrólise enzimática da celobiose

Para a realização da hidrólise utilizou-se a concentração de celobiose de 150 mM (2 vezes o valor de K_m obtido por Alves et al (2018)). Primeiramente, quantificou-se a atividade enzimática (U) contida em 50 μ L de enzima livre utilizados para o ensaio. Obtido esse valor, calculou-se qual a massa de *bead* que continha essa mesma quantidade de atividade enzimática (U). Essa massa foi utilizada para o ensaio. Para a hidrólise fez-se necessário a substituição do tampão McIlvaine pelo tampão acetato de sódio. Assim, para as reações foram utilizados 1,088 mL de celobiose 150 mM como substrato diluído em tampão acetato de sódio pH 5,5 (50 mM) em um microtubo de 2 mL acrescido de 50 μ L de enzima livre e a massa de *bead* correspondente. Os microtubos foram incubados em shaker com rotação moderada, a 50°C, por 4 horas. As reações também foram realizadas em maior escala, em erlens de 25 mL com um volume total de 5 mL de reação. Alíquotas foram coletadas a cada hora para dosagem de glicose pelo kit Liquiform e para observação dos produtos da hidrólise em HPLC.

4.10.7.1. Dosagem dos produtos da hidrólise pelo método High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

O sistema de HPLC foi utilizado para detecção de oligossacarídeos e monossacarídeos provenientes dos ensaios de atividade de hidrólise e transglicosilação da BG-Lfa2. Esse sistema foi equipado com um detector RI e coluna Phenomenex (Allcrom), aplicada para a detecção de carboidratos. A cromatografia teve como fase móvel o H_2SO_4 0,005 N, 0,5 mL/min, temperatura de forno de 80°C. Os mono e oligossacarídeos sofrorose, glicose, celobiose, celotriose e celotetraose foram utilizados como padrões para detecção e quantificação das amostras. Todos os padrões utilizados foram da marca Sigma Aldrich.

4.10.7.2. Dosagem de glicose produzida na hidrólise pelo método enzimático

A dosagem da glicose foi também realizada pelo método enzimático baseado na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOD) (kit Glicose – Liquiform). Essa enzima catalisa a reação (1), a qual forma o produto peróxido de hidrogênio, reagente para reação (2). A reação (2) é catalisada pela enzima peroxidase (POD), a qual tem como produto a antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

A reação, adaptada para microplacas de 96 poços, foi realizada utilizando-se 5 µL de cada amostra acrescida de 200 µL do reagente. Para o padrão foi utilizado 5 µL do reagente padrão (1 mg/mL) com 200 µL do reagente. Para o branco da reação o reagente padrão foi substituído pelo mesmo volume de água. As reações foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 10 minutos. Em seguida, a placa foi lida em espectrofotômetro a 505 nm. Os cálculos das concentrações foram realizados seguindo o protocolo do kit.

4.11. Avaliação da estabilidade enzimática

A avaliação da estabilidade enzimática da enzima purificada e imobilizada com 2 e 3% de alginato frente à enzima livre foi mensurada realizando-se o ensaio de atividade. Para esse experimento, as *beads* produzidas com 2 e 3% de alginato foram separadas em dois grupos, de maneira que um grupo foi mantido em solução de cálcio 0,03 M, enquanto o outro foi mantido em uma solução de cálcio 0,005 M com 20% etanol. A atividade enzimática de cada grupo foi medida em dias aleatórios, por 60 dias totais.

4.12. Avaliação do reuso enzimático

A capacidade de reuso das *beads* foi testada utilizando uma massa de *bead* com valor de atividade (U) imobilizada conhecida. As *beads* foram pesadas e colocadas em um microtubo de 2 mL. A reação enzimática foi feita de acordo com o

item 4.6, mas para esse experimento o tampão MClvaine foi substituído pelo tampão acetato de sódio pH 5,5 (50 mM) e, após a reação enzimática, o conteúdo do microtubo foi transferido para outro microtubo para que a reação pudesse ser parada com a adição da solução de carbonato de cálcio. O produto foi transferido para a micro placa e lido em espectrofotômetro 405 nm. As mesmas *beads* foram lavadas três vezes com tampão e novas reações foram feitas até que fosse observada uma diminuição significativa na atividade enzimática.

4.13. Purificação da enzima BG-Lfa2 pelo método FPLC

Na purificação pelo método de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), o sobrenadante obtido da centrifugação foi inserido em um sistema de cromatografia em coluna empacotada com a resina His-Link Protein Purification Resin (Cat.#V8821 Promega). O sistema foi equilibrado com tampão de ligação (HEPES 30 mM pH 7,4, NaCl 300 mM), as lavagens foram feitas com o tampão de lavagem (HEPES 30 mM pH 7,4, NaCl 300 mM e 20 mM e 40 mM de imidazol). A resina foi incubada com o extrato enzimático por 1 hora. Posteriormente, a enzima foi eluída aplicando-se um gradiente de imidazol com uso do tampão de eluição (HEPES 30 mM pH 7,4, NaCl 300 mM e 300 mM de imidazol), o qual teve início com uma concentração nula até uma concentração final de 300 mM, com um fluxo de 0,5 mL/min. Alíquotas de 2 mL, chamadas frações, foram coletadas durante todo o processo de eluição até que a concentração do tampão atingisse 300 mM de imidazol e ocorresse de fato a eluição da enzima de interesse. Essas frações foram armazenadas à 4°C para posterior quantificação da atividade, proteína e análise por SDS-Page.

4.13.1. Ensaios de transglicosilação

Para determinar a atividade de transglicosilação da enzima BG-Lfa2, a metodologia utilizada foi a relatada por KAUR, 2007. A reação foi composta por duas etapas. Na primeira parte da reação, a mistura da reação foi constituída por 1 µg da enzima BG-Lfa2 purificada (114 µg/mL), diferentes concentrações de metanol (10, 20, 50, 60, 70, 80 e 90%) e tampão acetato de sódio pH 5,5 (50 mM), de modo que o volume dessa mistura atingisse 100 µL. A reação foi iniciada adicionando 50 µL de substrato pNP-G (10mM) e incubada a 50 °C por 1 hora com agitação leve. A reação

foi interrompida por fervura das amostras a 100 °C por 10 minutos. A segunda parte da reação consistiu na quantificação da reação de transglicosilação. Para isso, uma alíquota de 25 µL da reação da primeira etapa foi transferida para um microtubo contendo 20 µL da enzima endoglicanase (14 U/mg) e 55 µL do tampão acetato de sódio pH 5,5 (50 mM). Para controle, outra alíquota de 25 µL da mesma reação foi adicionada em um microtubo contendo 75 µL do mesmo tampão utilizado. A reação foi agitada e incubada a 50 °C por 1 hora. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição 100 µL de CaCO₃ (1M) em cada microtubo. Para a leitura, 100 µL de cada reação foi transferido para uma microplaca de leitura 96 poços e lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm, conforme o esquema abaixo (figura 9).

Figura 9. Esquema da reação de transglicosilação.

A porcentagem de transglicosilação foi obtida subtraindo o valor de absorbância do controle do valor da absorbância da amostra correspondente. Para o ensaio com a enzima imobilizada, primeiramente foi calculada a atividade enzimática (U) contida em 20 µL da enzima livre e em seguida calculou-se a massa de *bead* que possuía essa mesma quantidade de atividade enzimática.

O branco da reação consistiu na adição de metanol nas diferentes concentrações testadas, em tampão acetato de sódio pH 5,5 (50 mM), substrato pNPG (10 mM) e a água pra substituir a enzima. Para o controle geral das reações foram utilizados tampão acetato de sódio pH 5,5 (50 mM), substrato pNPG (10 mM), enzima livre e

imobilizada e o metanol não foi adicionado.

4.14. Avaliação estatística

A análise estatística dos dados foi efetuada por meio de análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, a fim de determinar diferenças significativas entre as médias, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), com auxílio do software Prisma 8.0 (Graphpad Software).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Expressão da BG-Lfa2

Após indução, as células bacterianas foram rompidas e o extrato solúvel submetido à análise por eletroforese SDS-Page.

A figura 10 mostra o perfil protéico do extrato enzimático produzido. O poço 2 de ambos os géis correspondem a BG-Lfa2 produzida (22 µg de proteínas totais). Esta possui um peso molecular de 84 kDa localizada entre as bandas de 116 e 66,2 kDa do marcador de peso molecular, como relatado pelo estudo no qual essa enzima foi expressa e caracterizada (ALVES et al., 2018). No poço 1, da figura 10 (A), no qual foi aplicada uma alíquota do sobrenadante do cultivo celular centrifugado, não foi possível observar nenhuma proteína presente, inferindo que a enzima foi produzida intracelularmente. Já na figura 10 (B), podemos observar que em t0, que corresponde ao extrato celular lisado antes da indução por IPTG, não foi possível a observação da banda referente à BG-Lfa2. Assim, o IPTG é fundamental para a expressão da proteína em estudo.

Figura 10. Expressão β -glicosidase Lfa2. As frações da produção e expressão da enzima BG-Lfa2 foram analisadas em SDS-Page. **M.** Marcador de peso molecular; **t0.** Lisado celular antes da indução por IPTG. **1.** Sobrenadante do cultivo celular. **2.** Lisado celular (extrato enzimático).

5.2. Caracterização das *beads* produzidas

5.2.1. Análise visual

Os testes para caracterização das *beads* foram conduzidos variando-se as concentrações do biopolímero, ou seja, 1, 2 e 3% (m/v) de alginato. Podemos notar que as *beads* produzidas com 1% de alginato (figura 11-A) apresentaram formatos irregulares, achatadas e alongadas, com uma coloração mais translúcida e bastante flexibilidade. Além dessas características, observamos a formação de *beads* com tamanhos variados quando comparadas as produzidas com maiores concentrações de alginato. A utilização de 2% de alginato no preparo das *beads* deram origem à partículas com formatos um pouco mais esféricos, com uma cor mais sólida, textura menos flexível e tamanhos mais uniformes do que as mencionadas anteriormente (figura 11-B). Já a utilização de 3% de alginato deu origem à partículas com formato esférico regular que apresentam uniformidade no tamanho, coloração sólida e textura firme. Além disso, apresentaram maior tamanho em relação às anteriores (figura 11-C).

Figura 11. Visualização das *beads* imobilizadas com diferentes concentrações de alginato de sódio. A enzima BG-Lfa2 livre foi imobilizada com 1, 2 e 3% de alginato de sódio. **A.** Alginato de sódio 1%; **B.** Alginato de sódio 2%; **C.** Alginato de sódio 3%.

A figura 12 abaixo apresenta a diferença observada nos tamanhos e no formato das *beads* produzidas utilizando as diferentes porcentagens de alginato. A utilização

de 1% de alginato produziu *beads* com diâmetros variando de 1 a 3 mm, enquanto que com 2% e 3% o diâmetro observado foi de 3 mm. Nesta figura também é possível observar a diferença nos formatos de *beads* produzidas com diferentes concentrações de alginato, como demonstrado na figura acima.

Figura 12. Diferentes formatos e tamanhos das beads. Visualização mais detalha das beads imobilizadas com diferente concentrações de alginato. **A.** Alginato de sódio 1%; **B.** Alginato de sódio 2%; **C.** Alginato de sódio 3%.

5.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização por microscopia eletrônica de varredura comprovou as características observadas visualmente. As *beads* produzidas com 1% de alginato não resistiram a pressão do vácuo produzido pelo equipamento e sofreram uma grande deformação, não possibilitando a observação da presença dos poros na superfície da estrutura nem seu formato original em nenhum aumento utilizado (figura 13-A, B e C). Nesta mesma figura, podemos observar a presença dos poros das partículas, os quais estavam em maior quantidade nas *beads* produzidas com 2% de alginato (figura 13-D, E e F) quando comparadas com as *beads* com 3% alginato (figura 13-G, H e I). Entretanto, observou-se uma leve deformação ocasionada pelo vácuo do

equipamento enquanto que as *beads* com 3% de alginato foram mais estáveis, revelando uma superfície mais homogênea.

Figura 13. Microscopia de Varredura das *beads*. **A.** Alginato de sódio 1%, aumento de 30x; **B.** Alginato de sódio 1%, aumento de 100x; **C.** Alginato de sódio 1%, aumento 200x. **D.** Alginato de sódio 2%, aumento de 30x; **E.** Alginato de sódio 2%, aumento de 100x; **F.** Alginato de sódio 2%, aumento 200x; **G.** Alginato de sódio 3%, aumento de 30x; **H.** Alginato de sódio 3%, aumento de 100x; **I.** Alginato de sódio 3%, aumento 200x.

5.3. Efeito da porcentagem de alginato na imobilização enzimática

Com o extrato enzimático obtido, nomeado de enzima livre, realizou-se a quantificação da atividade e de proteína presentes antes do processo de imobilização. Em um volume de 30 mL de enzima produzida obteve-se uma concentração de proteína de 4,415 mg/mL com atividade enzimática de 206,78 U/mL.

A partir desse extrato foram produzidas as *beads* adicionando-se o alginato de sódio nas concentrações de 2 e 3%. Para a imobilização a 2% de alginato utilizou-se 7 mL do extrato enzimático com adição de 0,14 g do polímero, o que produziu 6,78 g de *beads*. No preparo das *beads* com 3% de alginato foi utilizado 15 mL do extrato

enzimático acrescido de 0,45 g de alginato de sódio, resultando em 13,3 g de *beads*. A atividade enzimática e a concentração de proteína foram dosadas de cada lavagem e da solução de cálcio utilizada no gotejamento para o cálculo do rendimento de imobilização da enzima. A concentração de 1% de alginato não foi testada devido aos relatos dos estudos anteriores de que essa concentração não apresentou bons resultados de imobilização (KEERTI et al., 2014). A tabela abaixo apresenta os valores de atividade enzimática total, proteína total, assim como a atividade específica e o rendimento obtido em cada imobilização.

Tabela 1. Apresentação da atividade enzimática, concentração de proteína, atividade enzimática específica e rendimento obtidos no processo de imobilização utilizando alginato de sódio nas concentrações de 2 e 3%.

	Atividade enzimática total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento de imobilização (%)
Enzima livre	6203,45	132,461	46,832	NA
Imobilização 2%	816,82	21,722	37,603	56
Imobilização 3%	1679,10	51,161	32,819	54

Analisando a tabela acima, podemos observar que o rendimento de imobilização do extrato enzimático utilizando 2 e 3% de alginato apresentaram valores muito próximos, sendo de 56 e 54% respectivamente, inferindo que nesse estudo as duas concentrações poderiam ser utilizadas para a imobilização enzimática. Além disso, a atividade específica para ambos também apresentaram valores muito próximos. Quando comparada a atividade específica da enzima livre com a imobilizada, nas duas concentrações de alginato, podemos observar que a imobilizada 2% apresentou uma diminuição de 20%, aproximadamente, enquanto na imobilizada 3% essa queda foi de 30%, sugerindo uma imobilização eficiente na qual a proteína de interesse, a BG-Lfa2, foi aprisionada em maior quantidade do que as variadas proteínas presente no extrato.

5.4. Efeito do pH na imobilização enzimática

Devido a utilização de 3% de alginato apresentar melhores resultados na caracterização visual e bom rendimento na imobilização enzimática, essa concentração foi utilizada para esse teste. A enzima produzida foi imobilizada em três diferentes pHs: 5,5, 7,4 e 8,5. O pH 5,5 foi selecionado por ser o pH ótimo encontrado nos estudos realizados por Alves et al. (2018), o pH 7,4 por ser o pH do tampão usado na lise celular e o pH 8,5 foi escolhido para testarmos um pH mais básico. O volume de enzima produzido foi dividido em três partes iguais de 4 mL e adicionado em cada uma 0,12 g de alginato de sódio. O processo de imobilização foi realizado conforme descrito na metodologia. Os extratos enzimáticos tamponados em cada pH, chamados de enzima livre, foram quantificados segundo a concentração de proteína e atividade enzimática presente antes e depois do processo de imobilização. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas abaixo.

Tabela 2. Quantificação da atividade enzimática, proteína, atividade específica e rendimento de imobilização obtidas na imobilização em diferentes pHs.

pH		Atividade enzimática total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento de imobilização (%)
5,5	Enzima livre	1645,36	23,723	69,357	NA
	Imobilizada 3%	883,99	10,983	80,487	53,72
7,4	Enzima livre	1345,93	16,553	81,310	NA
	Imobilizada 3%	945,65	5,666	166,899	70,25
8,5	Enzima livre	1285,16	24,246	53,005	NA
	Imobilizada 3%	816,66	11,530	73,431	63,54

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, a imobilização apresentou melhor rendimento em pH 7,4 com 70%, seguido do pH 8,5, que apresentou rendimento de 63% e por último o pH 5,5, com rendimento de 53%. Além disso, em pH 7,4 a enzima livre e imobilizada apresentaram maiores atividades

específicas. No pH 5,5 a imobilização enzimática apresentou menor taxa de rendimento, embora esse pH foi tido como pH ótimo na caracterização enzimática realizada anteriormente. Entretanto, o pH 5,5 apresentou uma atividade específica maior que a obtida no pH 8,5, as quais foram de 80,4 e 73,4 U/mg, respectivamente. Analisando-se a tabela também pode ser observado que em pH 7,4 a concentração total de proteína imobilizada foi a mais baixa quando comparado aos outros pHs, entretanto, apresentou maior atividade total e atividade específica inferindo que nesse pH foi possível imobilizar maior quantidade da enzima de interesse.

5.5. Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada

As *beads* produzidas com 3% de alginato foram selecionadas para realização dos experimentos seguintes. Embora as porcentagens de 2 e 3% tenham apresentado rendimentos de imobilização semelhantes, as de concentração 3% apresentaram-se mais estáveis e com formatos mais regulares. Os resultados referentes aos tópicos seguintes mostraram o comportamento do extrato enzimático imobilizado em 3% de alginato frente a diferentes condições de pH, temperatura, tempo de incubação, concentração de substrato e concentração de etanol no meio reacional.. Os dados obtidos foram comparados com os resultados apresentados pelo extrato enzimático livre.

5.5.1. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A influência da temperatura pode ser visualizada na figura 14, onde se observa a comparação entre o comportamento da enzima imobilizada e da enzima livre. Assim, foi possível observar que a enzima imobilizada apresentou atividade máxima em uma temperatura de 50°C, a mesma apresentada pela enzima livre. Na temperatura de 30°C a atividade da enzima imobilizada foi, aproximadamente, 40% superior a atividade da enzima livre. Além disso, a enzima imobilizada apresentou uma menor variação da atividade com o aumento da temperatura na faixa de 30 a 50°C, sendo esta menos sensível a variação de temperatura. A partir da temperatura de 70°C ocorreu uma queda acentuada na atividade enzimática, tanto da enzima imobilizada como da livre (67%). Nas temperaturas de 80 e 90°C observou-se a dissolução das *beads* durante a reação e a atividade enzimática se manteve por volta de 30%,

diferentemente do observado para a livre que apresentou 15% de atividade em 90 °C.

Figura 14. Efeito da temperatura na atividade enzimática. A atividade a enzima livre e imobilizada foi testada nas temperaturas de incubação de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.

5.5.2. Efeito do pH na atividade enzimática

A influência da mudança de pH do meio na atividade enzimática da enzima livre e da imobilizada pode ser observada na figura 15. Como mostrado no gráfico, o pH ótimo no qual a atividade enzimática da enzima imobilizada corresponde a 100% foi entre 5,5 e 6,0, o que pôde-se observar também para a enzima livre. Tanto a enzima imobilizada quanto a livre apresentaram atividade enzimática próxima de zero em pHs ácidos de 2,0 a 3,5. Em pH de 4,5 a atividade enzimática das enzima imobilizada e livre começou a apresentar um aumento, sendo 20% para a imobilizada e 40% para a livre. A atividade enzimática de ambas as formas voltou a ter uma queda em pHs mais básicos de 7,0 a 8,0. Entretanto, essa queda se mostrou menos acentuada para a imobilizada que apresentou em pH básico de 8 uma atividade enzimática de 50%, ao contrário da livre que teve sua atividade enzimática reduzida a 20%, aproximadamente, sendo a enzima imobilizada mais estável em pHs básicos.

Figura 15. Efeito do pH na atividade enzimática. A atividade foi avaliada em resposta a variação do pH do meio. Os pHs testados foram: 2,0, 3,0, 3,5, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.

5.5.3. Efeito do tempo de incubação na atividade enzimática

Na figura 16 abaixo, podemos observar a influência do tempo de incubação na atividade enzimática. Com 5 minutos de reação a enzima imobilizada apresentou 35% de atividade, enquanto a livre atingiu 85% da atividade enzimática total. No período de 5 a 10 minutos tanto a enzima livre quanto a imobilizada apresentaram um aumento acentuado na atividade, no qual a enzima livre atingiu sua atividade máxima com 10 minutos. Com 15 minutos de reação a enzima livre já tinha atingido seu platô, enquanto a imobilizada ainda apresentava aumento. A partir de 30 minutos de reação o aumento do tempo não influenciou mais na atividade da enzima imobilizada, que apresentou atividade constante. As formas enzimáticas atingiram suas atividades máximas com 20 minutos de diferença.

Figura 16. Efeito do tempo de incubação na atividade enzimática. Para avaliar tal parâmetro variou-se o tempo de incubação da BG-Lfa2 livre e imobilizada com o substrato entre 5 e 35 minutos. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.

5.5.4. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da utilização de diferentes concentrações de substratos na atividade da enzima livre e da imobilizada pode ser observada na figura 17. O gráfico mostra a formação de uma região de platô a partir da presença de uma concentração de 3 mM de substrato na reação para enzima livre, enquanto para a enzima imobilizada o platô foi atingido a partir de uma concentração de 9 mM de substrato. A partir dessas concentrações ocorreu a saturação da enzima com o substrato e o seu aumento não foi mais capaz de influenciar na velocidade da reação. Portanto, podemos observar que a enzima imobilizada necessitou de 3 vezes mais substrato para atingir a saturação quando comparada à enzima livre.

Figura 17. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação de K_m , K_{cat} e $V_{máx}$. Diferentes concentrações do substrato pNP-G foram usadas para avaliar sua influência na atividade de BG-Lfa2 livre e imobilizada. As concentrações utilizadas foram 0,5, 1, 3, 6, 9, 12 e 15 mM. Os parâmetros cinéticos e o gráfico foram confeccionados no programa GraphPad Prism (versão 8.0.2). **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.

Para a enzima livre o valor de K_m encontrado foi de 0,38 mM e o $V_{máx}$ foi de 7,16 U/mL, enquanto para a enzima imobilizada esses valores foram 8,25 mM para o K_m e 11,22 U/mL para o $V_{máx}$. Como esse parâmetro refere-se à concentração de substrato necessária para que a enzima atinja metade da sua velocidade máxima, observa-se que a enzima livre possui maior afinidade pelo substrato por apresentar menor valor de K_m que a imobilizada.

O parâmetro $V_{máx}/K_m$ refere-se à uma constante de especificidade, ou seja, através dele é possível comparar a especificidade de diferentes enzimas pelo mesmo substrato. Desta forma, o valor de $V_{máx}/K_m$ obtido para a enzima livre foi 18,842 e para a enzima imobilizada foi 1,36. Assim, $V_{máx}/K_m$ da enzima livre foi maior que $V_{máx}/K_m$ da enzima imobilizada, mostrando que a enzima livre apresentou maior especificidade pelo substrato do que a imobilizada.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para a enzima livre e para a imobilizada com 3% alginato.

Parâmetros	Enzima livre	Enzima Imobilizada 3%
K_m (mM)	0,38	8,25
$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)	7,16	11,22
$V_{m\acute{a}x}/K_m$	18,842	1,36

5.5.5. Efeito da concentração de etanol na atividade enzimática

A influência de diferentes concentrações de etanol no meio reacional pode ser observada na figura 18. Quando avaliamos o gráfico podemos observar que a presença do etanol acarretou em um aumento na atividade enzimática tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada. O aumento da concentração de etanol levou ao aumento da atividade enzimática nas duas formas da enzima nas menores concentrações de etanol.

Figura 18. Influência da concentração de etanol na atividade enzimática da enzima BG-Lfa2. Concentração de etanol testadas de 0 a 40%. **Em vermelho:** Comportamento da BG-Lfa2 livre. **Em azul:** Comportamento da BG-Lfa2 imobilizada 3%.

A figura 18 mostra a influência de concentrações maiores de etanol no meio

reacional para a atividade enzimática. Podemos observar que em concentrações de 1 e 2% de etanol a enzima livre e imobilizada apresentaram máxima atividade enzimática de 30% e 60%, respectivamente. Com a adição de 10% de etanol, tanto a enzima livre como a imobilizada atingiram a maior atividade enzimática. Na concentração de 15% observou-se uma queda de 25% da atividade nas duas formas, que permaneceu nas concentrações de 20 e 25% de etanol, sendo mais acentuada para a enzima livre. Nas concentrações de 15, 20 e 25% de etanol a enzima imobilizada apresentou uma maior estabilidade e com 40% de etanol, as duas formas da enzima apresentaram uma queda acentuada apresentando apenas 10% da atividade enzimática.

5.5.6. Hidrólise enzimática da celobiose

A reação de hidrólise enzimática de celobiose foi realizada utilizando o extrato bruto da enzima imobilizada 2 e 3% e também na sua forma livre a fim de comparação. As reações constituíram-se do substrato celobiose na concentração de 150 mM e da enzima, em suas duas formas, incubada a 50 °C por 4 horas sob agitação lenta. Alíquotas foram coletadas após 15, 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas de reação gerando os gráficos apresentados na figura 19. De acordo com o gráfico A, podemos observar que nos primeiros 15 minutos de reação, a enzima livre hidrolisou a celobiose e apresentou uma produção de 10 mM de glicose, ao passo que a enzima imobilizada 2% apresentou apenas 2,6 mM de glicose produzida. As mesmas concentrações de glicose foram observadas no gráfico B para a enzima imobilizada 3%.

Quando decorridos 30 minutos de reação a produção de glicose passou a ser de 15 mM para a livre e de 3,2 mM para as duas imobilizadas. Com 120 minutos a concentração de glicose na reação de hidrólise utilizando a enzima livre passou a ser de 18,2 mM glicose. Entretanto, nesse mesmo tempo, as enzimas imobilizadas foram capazes de hidrolisar uma quantidade menor de celobiose acarretando na produção de uma menor quantidade de glicose, as quais foram de 3,7 mM de glicose para ambas. A enzima livre atingiu sua hidrólise máxima com 120 minutos (2 horas) de reação formando um platô a partir desse tempo, enquanto as enzimas imobilizadas atingiram sua hidrólise máxima com 60 minutos (1 hora), permanecendo constante a partir deste ponto.

Figura 19. Hidrólise enzimática da celobiose pela BG-Lfa2 livre e imobilizada com 2 e 3% de alginato. A capacidade hidrolítica da enzima BG-Lfa2 imobilizada e livre foi avaliada sobre o substrato celobiose na concentração de 150 mM **A.** Concentração de glicose produzida pelas enzimas livre e imobilizada 2% (**em verde**). **B.** Concentração de glicose produzida pelas enzimas livre e imobilizada 3% (**em azul**).

Primeiramente, esse experimento foi realizado utilizando-se o tampão McIlvaine, como procedido nas reações de caracterização enzimática. Mas durante a hidrólise, na qual o tempo de reação foi maior, observou-se a degradação das *beads*, necessitando realizar a troca desse tampão pelo tampão acetato de sódio com o mesmo pH e molaridade (pH 5,5 e 50 mM).

A hidrólise enzimática da celobiose também foi analisada pelo método de

HPLC. Para isso, uma concentração de 150 mM de celobiose foi utilizada na reação com a enzima BG-Lfa2 na forma imobilizada e livre. No perfil cromatográfico abaixo (figura 20) pode-se observar a produção de glicose na reação. As reações continham um volume total de 5 mL e foram realizadas em erlenmeyer de 25 mL. O tempo de 3 horas foi utilizado, pois nesse tempo as reações de hidrólise da enzima livre e imobilizadas já não apresentaram mais mudança. Para a enzima livre, após 3 horas de reação, podemos notar que a concentração de glicose obtida pela hidrólise da celobiose foi de 22,4 mM, um pouco maior da observada pela dosagem com o kit, a qual foi de 18,2 (figura 19). Também foi possível observar um pequeno aumento na concentração de celobiose de 150 mM para 157 mM, devido a uma possível evaporação da reação, já que os erlens foram vedados com tampões. Para a enzima imobilizada 2 e 3% a concentração de glicose obtida foi de 16,4 mM para a imobilizada 2% e de 19,5 mM para a imobilizada 3%, em média, com diminuição da concentração de celobiose para 128,6 mM e 127,5 mM. A utilização de erlenmeyrs com maior agitação pode ter aumentado a área de contato da enzima imobilizada com o substrato, beneficiando as reações de hidrólise.

Figura 20. Perfis cromatográficos da reação de hidrólise da celobiose pela BG-Lfa2. A. Enzima livre. B. Enzima imobilizada 2%. C. Enzima imobilizada 3%.

5.6. Reuso da enzima imobilizada

A capacidade de reuso das *beads* imobilizadas 3% foi analisada realizando-se diversas atividades enzimáticas sucessivamente com as mesmas *beads*. Na figura 21, pode-se observar que na segunda vez a atividade enzimática apresentou 70% da atividade inicial e essa porcentagem se manteve relativamente constante até a quarta atividade enzimática consecutiva. A partir da quinta atividade as *beads* apresentaram 50% da atividade inicial e sofreram uma pequena diminuição até a décima segunda vez. Na décima sexta vez as *beads* ainda retiam 25% da atividade enzimática, mas não foi possível continuar com as atividades, pois ocorreu a dissolução das *beads*. Assim, as *beads* puderam ser reutilizadas até 16 reações de hidrólise. As atividades foram realizadas sucessivamente apenas com a lavagem das mesmas com tampão e

sem seu descanso em solução de armazenamento e resfriamento, fato que pode ter influenciado na dissolução das *beads*. Para esse experimento foi necessário a troca do tampão Mcllvaine pelo tampão acetato de sódio pela ocorrência da dissolução das *beads* durante o experimento.

Figura 21. Avaliação do reuso enzimático. A possibilidade de reuso das *beads* foi avaliada realizando-se repetidas atividade enzimáticas utilizando as mesma *beads* até que não fosse mais possível a observação de atividade enzimática

5.7. Purificação da BG-Lfa2 para a imobilização

Com a purificação utilizando o FPLC, obteve-se o perfil cromatográfico apresentado pela figura 22. Neste perfil observou-se que a proteína é eluída em dois momentos diferentes, o primeiro correspondente a fração 19 e posteriormente a partir da fração 21 até a 25, quando a concentração de 300 mM de imidazol é atingida. Com as frações obtidas foram realizados os ensaios de atividade enzimática obtendo-se o perfil apresentado na figura 22 (A). O perfil apresentado na figura 22 (B) é o obtido pelo FPLC. Os picos presentes correspondem a enzima sendo eluída em cada fração. Assim, pode-se observar que os dois perfis são correspondes, embora tenha aparecido alguns picos nas frações de 1 à 5 no gráfico (B) que não apresentaram atividade enzimática no gráfico (A).

Figura 22. Perfil cromatográfico de purificação por FPLC. **A.** Perfil obtido através das atividades enzimáticas de cada fração (tubo) da purificação. Os números das frações correspondem aos números dos tubos os quais foram realizados a atividade enzimática. **B.** Perfil apresentado pelo programa.

As frações que apresentaram maiores valores foram submetidas à análise por eletroforese SDS-Page corado com prata, mostrado na figura 23. Analisando-se os géis obtidos pôde-se notar, na banda referente à BG-Lfa2, a presença de grande quantidade da enzima no extrato enzimático (ExE) e também no flow through (FI). Entretanto, a banda da BG-Lfa2 pode ser notada com baixa intensidade na lavagem (L) e frações eluídas 1, 2 e 3. Nas eluições representadas pelas frações 22 à 25 a

enzima pode ser observada novamente, comprovando os gráficos obtidos com as atividades enzimáticas e perfil de purificação. Porém nessas frações também pôde-se notar a presença de outra banda com peso molecular de aproximadamente 25 kDa, inferindo que a enzima não foi totalmente purificada ou que pode ter ocorrido uma degradação de uma parcela dessa enzima. A fração 19 eluída apresenta atividade enzimática, mas não se pode observar sua presença no gel.

Figura 23. Eletroforese SDS-Page da purificação por FPLC. A. M. Marcador de peso molecular; ExE. Lisado celular; FI. *Flow through*; L. Lavagem; 1. Eluição fração 1; 2. Eluição fração 2; 3. Eluição fração 3; 4. Eluição fração 4; 5. Eluição fração 8; 8. Eluição fração 8. B. M. Marcador de peso molecular (O'GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); 9. Eluição fração 9; 18. Eluição fração 18; 19. Eluição fração 19; 20. Eluição fração 20; 21. Eluição fração 21; 22. Eluição fração 22; 23. Eluição fração 23; 24. Eluição fração 24; 25. Eluição fração 25.

5.7.1. Reação de transglicosilação

A fim de verificar se a enzima em estudo apresentava a função de transglicosilação foi realizado o experimento exibido pela figura 24. Para esse experimento, a enzima purificada foi imobilizada utilizando 3% de alginato e as concentrações de metanol testadas variaram de 0 à 80%. Podemos observar que na presença de 50% de metanol nas reações, ambas as formas, livre e imobilizada, apresentaram a maior porcentagem de transglicosilação, ou seja, nessa concentração de metanol a reação de hidrólise acontece simultaneamente com a reação de transglicosilação com formação de conjugados glicosídicos, no qual ocorre a junção de unidades de glicose que foram liberadas na reação de hidrólise. Nessa reação o substrato pNPG foi utilizado como um doador de prótons enquanto o metanol foi o acceptor. Esses conjugados glicosídicos são hidrolisados pela endoglicanase na segunda fase da reação, liberando o nitrofenol do substrato pNPG.

Analisando o gráfico, podemos observar que as taxas de transglicosilação na enzima livre foram baixas nas concentrações de 10, 20, 60 e 80% de metanol. Esse resultado mostra que a quantidade de reações de hidrólise foram quase similares as quantidades de reações de transglicosilação na primeira etapa do protocolo, restando poucos conjugados glicosídicos para serem hidrolisados pela endoglicanase na segunda etapa. Fato que não aconteceu na presença de 50% de metanol, na qual as reações de transglicosilação foram muito superiores as de hidrólise, resultando em uma concentração maior de conjugado glicosídico para a reação com a endoglicanase. O mesmo resultado foi observado para a enzima imobilizada, que apresentou em 50% de metanol a maior taxa de reações de transglicosilação. Contudo, nas demais concentrações de metanol, a taxa de reações de transglicosilação também superaram a taxa de reações de hidrólise, aumentando a concentração de conjugados glicosídicos para a ação da endoglicanase, sendo a concentração 20% de metanol quase tão boa quanto a de 50%.

Figura 24. Reação de transglicosilação da BG-Lfa2 livre. A capacidade de transglicosilação da enzima BG-Lfa2 imobilizada e livre foi avaliada utilizando-se 0, 10, 20, 50, 60, 70 e 80% de metanol na reação. **Em rosa:** transglicosilação da BG-Lfa2 imobilizada. **Em verde:** transglicosilação da BG-Lfa2 livre.

5.8. Avaliação da estabilidade enzimática

O tempo em que as enzimas purificada imobilizada e livre são capazes de manter sua atividade enzimática pode ser observada na figura 25. Assim, o experimento foi realizado analisando-se 5 grupos: *beads* 2% armazenadas em solução de cálcio, *beads* 2% em solução de cálcio com etanol 30%, *beads* 3% armazenadas em solução de cálcio, *beads* 3% mantidas em solução de cálcio com etanol 30% e a enzima livre.

De acordo com o gráfico, podemos observar que a enzima livre possui atividade específica superior a todos os grupos imobilizados, sendo estatisticamente significativo do tempo de 1 dia até 40 dias de armazenamento. As *beads* armazenada em etanol 30%, tanto com 2% como as com 3% de alginato, são capazes de manter por mais tempo sua atividade enzimática quando comparadas com as mesmas *beads* mantidas somente em solução de cálcio, sendo estatisticamente significativas em todos os tempo analisados. Ao final de 60 dias de armazenamento, a imobilizada 2% em etanol manteve sua atividade específica em 7,06 U/mg, enquanto as *beads* 2% mantida somente em solução de cálcio apresentou atividade específica abaixo de 3 U/mg nesse mesmo período. O mesmo foi observado para a imobilizada 3% na presença de etanol, a qual apresentou atividade específica de 7,37 U/mg com 60 dias de armazenagem, enquanto a 3% sem adição de etanol apresentou uma atividade específica de 3,8 U/mL.

Quando avaliou-se o comportamento de cada condição imobilizada em relação a enzima livre durante o período de 60 dias, observou-se que esta teve sua atividade diminuída de 17 U/mg para 7,5 U/mg, enquanto a 2% imobilizada em EtOH caiu de 9 para 7,06 U/mg e a 3% imobilizada em EtOH de 8,74 para 7,37 U/mg, ou seja, a diferença da atividade específica da livre em relação as imobilizadas 2 e 3% não foram estatisticamente significativas após 60 dias. Contudo, as imobilizadas 2 e 3% sem etanol, apresentaram atividade específica significativamente diferentes quando comparadas a enzima livre neste mesmo tempo. Assim, observou-se que a técnica de imobilização traz benefícios para a enzima, ajudando na manutenção de sua atividade por mais tempo. Além disso, a adição de etanol na solução de cálcio de armazenamento pode ser um recurso para beneficiar ainda mais na manutenção da atividade, visto que a atividade da BG-Lfa2 é estimulada pela presença dele.

Figura 25. Avaliação da estabilidade enzimática. A estabilidade enzimática da BG-Lfa2 livre e imobilizada 2 e 3% foram analisadas durante 80 dias mantidas em solução de cálcio com e sem etanol. **Em azul:** enzima imobilizada 2% em solução cálcio 0,03 M. **Em amarelo:** enzima imobilizada 2% em solução cálcio 0,005 M com etanol 30%. **Em rosa:** enzima imobilizada 3% em solução cálcio 0,03 M. **Em verde:** enzima imobilizada 3% em solução cálcio 0,005 M com etanol 30%. **Em laranja:** enzima livre.

Díscussão

1. DISCUSSÃO

A β -glicosidase, presente em procariotos e eucariotos (AŠIĆ et al., 2015), é considerada a enzima chave no processo de hidrólise convertendo a celobiose em duas moléculas de glicose pela quebra de uma ligação glicosídica. Devido sua ampla aplicação, principalmente na degradação da biomassa lignocelulolítica para a produção de etanol, desperta grande interesse industrial. Entretanto, o complexo celulolítico produz essa enzima em baixa quantidade levando a um encarecimento dos processos aos quais estão envolvidas. Assim, o uso de tecnologias, como a imobilização enzimática, capazes de aumentar sua estabilidade e reuso estão sendo estudadas a fim de viabilizar cada vez mais sua utilização (AHMED et al., 2013).

O método de imobilização enzimática é uma técnica que tem recebido bastante atenção por apresentar vantagens como: o uso repetido de um único lote de enzima, maior estabilidade enzimática, fácil separação da enzima do meio reacional permitindo um melhor controle da reação, possibilitar uma fácil separação da enzima do produto evitando contaminação e diminuição do custo do produto final (BUSTO; ORTEGA, 1905; NGUYEN; KIM, 2017).

O alginato de sódio foi selecionado para esse estudo por se tratar de um método simples de imobilização enzimática, por ser biodegradável, de fácil manuseio, não tóxico ao meio ambiente e ao homem e principalmente por apresentar um baixo custo (DE-BASHAN; BASHAN, 2010).

O método de produção do gel utilizado neste estudo foi o aprisionamento, no qual a solução enzimática de BG-Lfa2 acrescida do alginato em diferentes concentrações foi gotejada em uma solução de cálcio, por este polímero ser mais comumente utilizado nesse processo (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017). Entretanto, os géis de alginato de cálcio são quimicamente instáveis na presença de íons citrato, fosfato e carbonato desestabilizando as ligações com o cálcio podendo ocasionar rupturas e até mesmo dissolução dos géis (COVIZZI et al., 2007), fato observado nesse estudo quando o tampão McIlvaine, rico em íons citrato e fosfato, foi utilizado para realização das atividades de hidrólise da celobiose e também nas reações de transglicosilação, necessitando ser substituído pelo tampão acetato de sódio.

A BG-Lfa2 utilizada nesse trabalho (ALVES et al., 2018) possui 59% de similaridade à uma glicosil hidrolase da família GH3 de *Pyrinomonas*

methylophilatogenes, muito próxima de BGs da família GH3 de bactérias e arqueas, e apresentou peso molecular de 84 kDa, corroborando com o relatado por (ALVES et al., 2018). Como exposto por outros autores, as BGs podem ser produzidas por muitos organismos apresentando pesos moleculares distintos como, *Pichia pastoris* (275 kDa), *Penicillium citrinum* (72 kDa), *Saccharomyces cerevisiae* (100 kDa) (SARITHA MOHANRAM, 2015). BGs também possuem diferentes localizações: intracelularmente, sendo estas pertencentes à família GH2, extracelularmente ou ligada à célula, pertencentes à família GH3 (AHMED et al., 2017). Nesse estudo, assim como no estudo realizado por Alves et al (2018), foi observado que a BG-Lfa2 produzida intracelularmente, foi classificada como sendo pertencente à família GH3.

Em termos de geometria, no presente estudo, as beads produzidas com 1, 2 e 3% de alginato apresentaram similaridade com outros estudos, no qual o uso de 1% do polissacarídeo produziu partículas com formato irregular e alongado e à medida que se aumentou sua concentração na solução enzimática a forma esférica foi obtida, sugerindo que para 1% de alginato a tensão superficial não é forte o suficiente para que a gota de alginato dê origem uma esfera perfeita antes de atingir a superfície da solução de cloreto de cálcio (AL-HAJRY et al., 1999; KEERTI et al., 2014).

O gotejamento lento com agulha da solução enzimática em solução reticulante de cálcio contendo o alginato também foi responsável pela formação das partículas mais esféricas, as quais são mais comumente utilizadas para a imobilização de células e enzimas por minimizarem as limitações difusionais (DE-BASHAN; BASHAN, 2010). Alguns autores relataram que a forma não esférica das partículas reduziu a força do gel, concluindo que a esfericidade possui um notável efeito sobre a estabilidade química e mecânica das partículas, isso porque as partículas com tamanhos e forma bem definidas permitem o desenvolvimento de uma reação reprodutível (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013).

O aumento na concentração de alginato no preparo das *beads* é responsável por aumentar a resistência mecânica, ocasionar uma diminuição do tamanho dos poros (DE-BASHAN; BASHAN, 2010) e também diminuir seu diâmetro médio (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013), como visto nas beads produzidas com alginato 1% que não resistiram ao vácuo do equipamento e no alginato 3%, que apresentaram poros menores e forma mais esférica do que as de 2%. O gel oferece uma resistência adicional que altera o coeficiente de difusão, ou seja, ele dificulta o fluxo do substrato

na rede tridimensional polimérica, limitando a transferência de massa através das *beads* (DE SOUSA MONTEIRO et al., 2015). Por outro lado, a diminuição da concentração de alginato na solução ocasiona a deformação das partículas quando a gotícula colide com a solução de cálcio, como relatado em outro estudo (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). Grandes concentrações de alginato produzem esferas com poros pequenos, dificultando a entrada de substrato e sua reação com a enzima imobilizada. Ao contrário, baixas concentrações de alginato produzem *beads* com poros muito grandes que comprometem o aprisionamento (NAWAZ et al., 2015).

O tamanho máximo de partículas produzidas nesse estudo foi de 3 mm para alginato 3% sendo um pouco menores para alginato 1%, característica importante pois, o tamanho das partículas produzidas também é um fator que controla a taxa de difusão de substratos e produtos. Em geral um tamanho menor da partícula acarreta em um maior rendimento e produtividade do processo devido a tamanhos maiores de partículas limitar a difusão (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013).

Outro fator que influencia no tamanho das partículas é a concentração de cálcio utilizada no preparo das *beads*. Tomando-se como base os trabalhos de Keerti et al (2014), a concentração de cálcio usada nesse estudo também foi de 0,2 M, apontada como sendo mais eficiente para o preparo das *beads*. Geralmente, o aumento na concentração de íons cálcio acarreta na redução do tamanho das partículas produzidas, fato que pode ser explicado pelo estreitamento da rede do gel conforme há o aumento da concentração dos íons cálcio. Além disso, altas concentrações de cálcio proporcionam partículas mais esféricas e de tamanhos uniformes por ocorrer a aceleração da cinética de gelificação (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013). Por outro lado, outros estudos relataram que partículas produzidas com concentrações de 0,5, 0,68 e 1M apresentaram maior diâmetro que as produzidas com concentrações menores (SMRDEL; BOGATAJ; MRHAR, 2008).

A produção e expressão da enzima BG-Lfa2 atingiu uma alta concentração protéica e hidrolítica. Seu extrato imobilizado em alginato 2 e 3% alcançou um rendimento de 56 e 54%, respectivamente, um pouco mais baixo quando comparados à outros estudos que obtiveram 66% de rendimento de imobilização em alginato (3%) (ORTEGA; BUSTO; PEREZ-MATEOS, 1998) e 64,4% em ágar (3%) (AHMED et al., 2013), inferindo que o rendimento pode ser afetado pelo tipo e pela concentração de gel utilizado na imobilização. Portanto, altas concentrações de alginato no preparo das

beads são responsáveis pela diminuição do rendimento de imobilização por produzirem poros muito pequenos que dificultam a interação substrato-proteína, assim como baixas concentrações também interferem, por produzirem grandes poros que facilitam a perda da enzima pelo seu desprendimento do gel (NAWAZ et al., 2015). Além disso, outros estudos relataram que em concentrações de cálcio menores que 0,2 M obtiveram um baixo rendimento de imobilização devido a formação de um gel instável, assim como concentrações maiores também afetaram a imobilização por causarem modificações no pH diminuindo a atividade catalítica da enzima (A. T. JAMEEL, K. Y. MAALIM, 2019; RAHIM et al., 2013).

A comparação entre a enzima BG-Lfa2 livre e imobilizada mostrou que a imobilização nesse trabalho não ocasionou modificação na temperatura ótima, sendo para ambas de 50 °C, resultado também obtido por Yan et al (2010) que observaram a mesma temperatura de 57°C para ambas as formas. Entretanto, em estudos realizados por Keerti et al (2014) a imobilização de uma BG recombinante, proveniente de *Bacillus subtilis*, fez com que a temperatura ótima aumentasse de 60 para 80 °C. O processo de imobilização pode ocasionar interações hidrofóbicas capazes de prejudicar a flexibilidade conformacional da enzima, sendo necessária temperaturas mais elevadas para atingirem sua conformação adequada e manterem sua reatividade (MUNJAL; SAWHNEY, 2002). Já a diminuição da temperatura ótima em enzimas imobilizadas indica que o suporte utilizado pode ser capaz de diminuir a rigidez conformacional da enzima (DE OLIVEIRA et al., 2018). A queda na atividade enzimática da enzima na forma livre e imobilizada, a partir de 60 °C, pode ter ocorrido devido sua desnaturação e degradação do polímero (EMREGUL; SUNGUR; AKBULUT, 2006). A estabilidade enzimática observada na faixa de 30 a 50 °C na enzima imobilizada pode ser atribuída à capacidade que a imobilização possui de protegê-la de mudanças conformacionais ocasionadas pela variação de temperatura. A estabilidade em baixas temperaturas poder trazer vantagem para sua aplicação industrial, uma vez que temperaturas mais baixas são requeridas no processo de fermentação (37°).

A imobilização não acarretou mudança no pH ótimo para a forma livre e imobilizada, apresentando pH de 5,5 para ambas e também perfis de pH muito similares, resultado similar ao obtido por Alves et al (2018), que também observou um pH 5,5 para a mesma enzima. Geralmente, o processo de imobilização ocasiona a

variação do pH ótimo por mudar a superfície e o microambiente das beads tornando-os carregados, podendo afetar a natureza da enzima ativa e alterar o pH da enzima aprisionada (DE OLIVEIRA et al., 2018). Outros autores também não observaram mudança nos valores de pH ótimo com a imobilização da enzima (AHMED et al., 2013; REHMAN et al., 2013; SILVA; ASQUIERI; FERNANDES, 2005).

O impacto do tempo na atividade catalítica da BG-Lfa2 livre e imobilizada também foi analisada nesse estudo. O tempo em que a forma imobilizada e livre atingiram a atividade catalítica máxima apresentaram divergência, ou seja, a enzima imobilizada levou o dobro do tempo da enzima livre para alcançar a atividade máxima, 30 e 15 minutos respectivamente. O aumento do tempo de reação para a enzima imobilizada pode ser devido a técnica de imobilização ocasionar uma limitação da difusão do substrato no microambiente da esfera, levando mais tempo para atingir o sítio ativo da enzima (NAWAZ et al., 2015). Resultados similares foram obtidos para enzima pectinase imobilizada também em alginato (REHMAN et al., 2013).

A análise dos parâmetros cinéticos mostraram que o K_m para a enzima imobilizada foi maior em relação à livre, indicando que a imobilização diminuiu significativamente a afinidade da enzima pelo substrato, possivelmente pelo fato do gel limitar a flexibilidade da enzima na ligação com o substrato, ocasionar modificações estruturais como impedimento estérico do sítio ativo pela matriz, limitar a difusão do substrato pela esfera e diminuir a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada (KEERTI et al., 2014; YAN et al., 2010). Técnicas de imobilização que utilizam ligações covalente entre a enzima e o gel apresentam valores de K_m maiores devido a essa ligação bloquear ainda mais o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (A. T. JAMEEL, K. Y. MAALIM, 2019). Contudo, a enzima imobilizada apresentou $V_{m\acute{a}x}$ maior que a livre, resultado semelhante ao observado em outro estudo (TU et al., 2006). A diminuição de $V_{m\acute{a}x}$ infere que o gel pode oferecer uma resistência ao contato do substrato com o sítio ativo da enzima e a ocorrência de interações entre dos grupos funcionais da enzima e o gel. O aumento de K_m e diminuição de $V_{m\acute{a}x}$ foi reportado por outros autores (AHMED et al., 2013; KEERTI et al., 2014; ORTEGA; BUSTO; PEREZ-MATEOS, 1998; YAN et al., 2010). Resultados diferentes foram obtidos quando variou-se a matriz de aprisionamento e a enzima imobilizada foi a glucoamilase, no qual ocorreu uma diminuição de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (SILVA; ASQUIERI; FERNANDES, 2005). Avaliando-se o parâmetro V/K observamos

que a enzima livre apresentou maior valor que a enzima imobilizada em alginato 3%, sugerindo que a enzima imobilizada possui uma eficiência catalítica menor que a livre, levando mais tempo para converter substrato em produto, possivelmente devido à barreira oferecida pelo gel, a qual dificulta a interação enzima-substrato.

Com a presença de etanol no meio reacional ocorreu um aumento na atividade catalítica da enzima livre e da imobilizada. Assim, podemos inferir que a BG-Lfa2 é uma enzima álcool-tolerante, característica essencial de enzimas utilizadas em processos fermentativos para a produção de etanol, uma vez que essa permite processos simultâneos de sacarificação e fermentação. Os resultados obtidos nesse estudo corroboraram com os obtidos por Alves et al (2018), que também observaram um aumento na atividade enzimática com a mesma enzima na forma livre. Em outro estudo foi relatado que álcoois podem induzir mudança na polaridade do meio o que estabiliza a conformação da enzima (DA SILVA et al., 2019). Outros autores também obtiveram maiores atividades com a presença de etanol, como Yan e Lin (1997) que estudou BG provenientes de *A. Niger*. Além disso, sugerimos que a BG-Lfa2 pode apresentar atividade de transglicosilação, uma vez que enzimas álcool-tolerantes foram relatadas como sendo capazes de realizar esse tipo de reação (WU et al., 2018; YAN; LIN, 1997).

A hidrólise da celobiose tem uma grande relevância industrial, principalmente para a produção de etanol, pois a hidrólise de oligossacarídeo é essencial para geração de glicose livre, substrato da fermentação. Neste estudo verificamos que a BG-Lfa2 hidrolisou a celobiose em baixas taxas, o que torna sua utilização na indústria mais difícil, pois uma grande quantidade de enzima é requerida para o processo, ocasionando um aumento nos custos. Porém, a enzima é eficiente na hidrólise do substrato pNP-G, podendo ser classificada como uma aryl- β -glicosidase (KAUR, 2007; WOODWARD; WISEMAN, 1982; YAN; LIN, 1997), inferindo que essa pode ser utilizada para outros fins além da produção de etanol, como a produção de celotrioses e celotetraoses pela reação de transglicosilação, oligossacarídeos de grande interesse industrial. Muitas BGs glicose-tolerantes possuem preferência por hidrolisar o substrato sintético pNP-G (SALGADO et al., 2018). BG proveniente de *Melanocarpus* sp também possuíam preferência por hidrolisar o substrato pNP-G, como relatado por Kaur (2007).

A purificação da BG-Lfa2 foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel

(Ni²⁺), por ser uma técnica eficiente. Em seus estudos, utilizando esse método, Alves e colaboradores (2018) conseguiram uma purificação na qual observaram o aparecimento de apenas uma banda no gel SDS-PAGE, sugerindo que a enzima é monomérica. Entretanto, nesse estudo, não se obteve a purificação eficiente da enzima, visto o aparecimento de duas bandas no gel, inferindo que tenha ocorrido a degradação de uma quantidade de enzima.

Além da capacidade de hidrólise dos substratos, muitas BG são capazes de realizar reações de transglicosilação. Para verificarmos se a BG-Lfa2 possuía tal capacidade, o substrato pNP-G foi utilizado como doador, o metanol como acceptor e a BG-Lfa2 purificada foi a catalisadora da reação, chamada de reação primária. Na reação secundária a enzima endoglicanase foi utilizada como reveladora, a qual hidrolisou o polissacarídeo formado por transglicosilação liberando o nitrofenol e conferindo à reação uma coloração amarela, indicando que a reação de transglicosilação havia ocorrido (KAUR, 2007). Portanto, as β -glucosidases catalisam a transglicosilação em uma solução aquosa e na presença de um segundo nucleófilo mais forte que a água, como metanol ou etanol. Yang et al (2015) sugeriram que a tolerância à glicose está associada com a atividade de transglicosilação. Várias BG das famílias GH1 e GH3 mostraram ser inibidas por baixas concentrações de glicose e possuir atividade de transglicosilação da celobiose, pNP-Glu e 4-metilumbeliferil glucosídeo (MUG), sugerindo que ocorra uma sobreposição do substrato e do inibidor no sítio ativo da enzima (SALGADO et al., 2018; YANG et al., 2015).

A estabilidade enzimática da BG-Lfa2 livre e imobilizada mantidas a 4°C pelo período de 60 dias em solução de cálcio com e sem etanol foi avaliada. A estabilidade do armazenamento é um parâmetro importante a ser considerado, uma vez que a enzima livre em solução, não está estável durante o armazenamento, tornando a forma imobilizada mais vantajosa (DE OLIVEIRA et al., 2018). Contudo, nesse estudo, a imobilização foi responsável pela manutenção da atividade enzimática por mais tempo, devido ao gel fornecer um microambiente protetor, resultado também obtido por Nawaz et al (2015), que observou a manutenção de 58% da atividade enzimática da maltase imobilizada armazenada por 60 dias a 4°C e De Oliveira et al (2018) que observou uma perda de 32,2% de pectinase em 12 dias. Além disso, a presença do etanol pode ter ajudado na manutenção da integridade das beads, uma vez que o alginato é insolúvel a partir de 30% de etanol, sugerindo uma explicação para o fato

das *beads* armazenadas na solução com etanol apresentarem maiores atividades quando comparadas com as armazenadas somente em solução de cálcio, inferindo que a manutenção da integridade do gel evita o desprendimento da enzima e a perda de atividade, além da BG-Lfa2 ser uma enzima tolerante ao etanol (ALVES et al., 2018).

A BG-Lfa2 imobilizada 3% foram utilizadas repetidas vezes para hidrolisar o substrato pNP-G para verificar sua capacidade de reutilização. A reutilização é uma característica de suma importância para aplicações industriais das enzimas em processos contínuos e descontínuos que pode reduzir efetivamente os custos e viabilizar seu uso. A queda na atividade residual da enzima imobilizada é devido à inativação da enzima causada pela desnaturação da proteína e pelo seu desprendimento da matriz de imobilização ocasionada pelas lavagens ao final de cada ciclo (YE et al., 2006). Entretanto, a enzima imobilizada permite usos repetidos, enquanto a enzima livre pode ser utilizada apenas uma vez (REHMAN et al., 2013). Jameel e Maalim (2019) observaram que após três ciclos a atividade residual da enzima BG imobilizada em alginato 3% passou de 86% para 49,34%. Por outro lado, a atividade residual obtida por Keerti et al (2014) foi de apenas 17,85% após quatro reutilizações da BG em *beads* de alginato 3%. Em outro estudo, utilizando *beads* produzidas com 2% de alginato, uma atividade residual de 20,37% após sete ciclos foi observada (RAHIM et al., 2013). Assim, podemos inferir que a concentração de 3% de alginato e matrizes que possibilitem uma ligação mais forte da enzima com o gel, do tipo ligação covalente, propiciam uma maior estabilidade estrutural resultando na manutenção da atividade enzimática. Porém, a utilização de matrizes com esse tipo de ligação podem elevar os custos no final do processo.

Conclusões

2. CONCLUSÕES

- Como demonstrado por Alves e colaboradores (2018), a enzima BG-Lfa2 é expressa intracelularmente e necessita de IPTG para sua indução. Sua proteína possui peso molecular de 84 kDa;
- A utilização de 3% de alginato na imobilização enzimática produz *beads* com formatos mais esféricos e regulares, tamanhos mais uniformes, coloração sólida e textura mais firme. Em geral, as *beads* com 3% de alginato apresentaram 3 mm de diâmetro, superfície mais homogênea com presença de poros;
- A porcentagem de alginato utilizada para a técnica de imobilização não exerceu influência significativa em seu rendimento, sendo de 56% com 2% de alginato e 54% na utilização de 3% de alginato;
- O melhor valor de pH para a imobilização enzimática foi de 7,4 apresentando um rendimento de 70% e atividade específica de 166,9 U/mg;
- Na caracterização bioquímica, a temperatura ótima apresentada pela enzima imobilizada 3% foi a mesma da enzima livre, 50°C;
- O pH ótimo apresentado pela enzima imobilizada 3% foi de 5,5, o mesmo da enzima livre;
- A enzima imobilizada levou 30 minutos para a conversão total do substrato em produto, enquanto a enzima livre precisou apenas de 10 minutos. A imobilização pode dificultar a interação substrato-sítio ativo, necessitando de mais tempo para que a reação aconteça;
- Os parâmetros cinéticos obtidos pela enzima imobilizada foram: K_m de 8,25 mM, $V_{m\acute{a}x}$ de 11,22 U/mL e K_{cat} de 1,36, enquanto os mesmos parâmetros para a livre forma de 0,38 mM, 7,16 U/mL e 18,84, respectivamente. Processo de imobilização diminuiu a afinidade entre enzima e substrato;

- A presença de 10% de etanol no meio reacional beneficia a atividade enzimática da enzima livre e da imobilizada;
- A BG-Lfa2 imobilizada e livre não apresentou alta taxa de hidrólise da celobiose;
- A adição de 30% de etanol à solução de cálcio influencia positivamente na manutenção da atividade enzimática da enzima imobilizada;
- Enzima imobilizada é capaz de manter sua atividade enzimática por mais tempo quando comparada a enzima livre;
- A BG-Lfa2 imobilizada em 3% de alginato podem ser reutilizadas em até 16 vezes, característica essencial para sua utilização em processos industriais.
- A enzima foi capaz de realizar reação de transglicosilação do substrato pNPG com 60% de metanol;

*Referências
Bibliográficas*

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. T. JAMEEL, K. Y. MAALIM, F. Y. Relative characterization of immobilized beta-glucosidase on calcium-alginate and acid functionalized multiwalled. **Jurnal Teknologi**, v. 3, p. 1–10, 2019.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. v. 40, p. 399–407, 2008.
- AHMED, A. et al. Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications. **J Appl Environ Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 31–46, 2017.
- AHMED, S. A. et al. Biochemical studies on immobilized fungal β -glucosidase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 4, p. 747–758, 2013.
- AL-HAJRY, H. A. et al. Electrostatic encapsulation and growth of plant cell cultures in alginate. **Biotechnology Progress**, 1999.
- ALVES, L. DE F. et al. Novel Ethanol- and 5-Hydroxymethyl Furfural-Stimulated β -Glucosidase Retrieved From a Brazilian Secondary Atlantic Forest Soil Metagenome. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–17, 2018.
- AMORIM, H. V et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, 2011.
- AŠIĆ, A. et al. Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom). **Protein Journal**, 2015.
- BEN TAHER, I. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues. **Biotechnology Progress**, 2017.
- BENOCCI, T. et al. ARA1 regulates not only α -arabinose but also α -galactose catabolism in *Trichoderma reesei*. **FEBS Letters**, 2017.
- BHATIA, Y. et al. Microbial β -Glucosidases : Cloning , Properties , and Applications Microbial β -Glucosidases : Cloning , Properties ,. v. 8551, 2008.
- BHATTARAI, K. et al. Biofuel: An alternative to fossil fuel for alleviating world energy and economic crises. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 46, n. 12, p. 1424–1442, 2011.
- BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. **Proc. Okla. Acad. Sci.**, 1992.
- BUSTO, M. D.; ORTEGA, N. Studies on Microbial P-D-Glucosidase Immobilized in Alginate Gel Beads. v. 30, n. 5, p. 421–426, 1905.
- CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. v. 63, p. 176–187, 2006.

CHING, S. H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 2017.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 2007.

DA CRUZ, M. G.; GUERREIRO, E.; RAIHER, A. P. A Evolução da Produção de Etanol no Brasil, no Período de 1975 a 2009. **Revista Econômica do Nordeste**, p. 141–160, 2012.

DA SILVA, R. R. et al. Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1.2. **Journal of Biotechnology**, v. 294, n. January, p. 73–80, 2019.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International journal of biological sciences**, 2009.

DAVID N.-S, H. Cellulose: a random walk along its historical path. **Cellulose**, 1994.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1611–1627, 2010.

DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais** Química Nova, 2010.

DE OLIVEIRA, R. L. et al. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 9–18, 2018.

DE PAULA, R. G. et al. New genomic approaches to enhance biomass degradation by the industrial fungus *Trichoderma reesei*. **International Journal of Genomics**, 2018.

DE SOUSA MONTEIRO, A. A. et al. Efeito da modificação química na solubilidade e intumescimento de microesferas à base de goma do cajueiro carboximetilada e quitosana. **Polimeros**, v. 25, p. 31–39, 2015.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, 2009.

DONATI, I. et al. New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium - Alginate Gels. p. 1031–1040, 2005.

DOS SANTOS CASTRO, L. et al. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, 2014.

DOS SANTOS, D. DA S. Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica. **Universidade Federal do Rio de Janeiro Escola de Química Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e**

Bioquímicos PRODUÇÃO, 2012.

DRAGET, K. I.; SKJA, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. v. 21, p. 47–55, 1997.

DUFF, S. J. B.; MURRAYH, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulosic stofuel ethanol : a review. v. 55, 1996.

EMREGUL, E.; SUNGUR, S.; AKBULUT, U. Polyacrylamide-gelatine carrier system used for invertase immobilization. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 591–597, 2006.

FARINAS, C. S. A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação. 2011.

FERREIRA, A. C. V. et al. Imobilização de β -glicosidase de soja em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) utilizando trimetafosfato de sódio como ativador. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, 2018.

FREI, M. Lignin: Characterization of a Multifaceted Crop Component. **The Scientific World Journal**, 2013.

FRUTUOSO, M. A.; MARANA, S. R. A Single Amino Acid Residue Determines the Ratio of Hydrolysis to Transglycosylation Catalyzed by β -Glucosidases. **Protein & Peptide Letters**, 2012.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. **Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção** *Química Nova*, 2008.

GENG, C. et al. Preparation of Ion-Exchanged TEMPO-Oxidized Celluloses as Flame Retardant Products. p. 1–10, 2019.

GLODEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. February, p. 808–810, 2007.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419–425, 2011.

HEAD, I. M.; GRAY, N. D. Microbial Biotechnology 2020; microbiology of fossil fuel resources. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 626–634, 2016.

HENRIQUE, F.; COSTA, N.; ANTONIA, M. Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose. Introdução Materiais e Métodos. n. D, p. 2–8, 2001.

IMRAN, M. et al. Immobilization of Fungal Cellulase on Calcium Alginate and Xerogel Matrix. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0123456789, 2018.

JESUS, G. C. DE. Desenvolvimento de matrizes poliméricas de alginato e pectina para o cultivo de células imobilizadas de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar. 2018. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.**

KARTHICK S, A.; NALLATHAMBI, G.; S, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical science review and letters**, 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 471–478, 1993.

KAUR, J. Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp . MTCC 3922. v. 10, n. 2, 2007.

KEERTI et al. Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable β - Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice . **ISRN Biochemistry**, 2014.

KLEINÜBING, S. J. et al. Extraction of alginate biopolymer present in marine alga sargassum filipendula and bioadsorption of metallic ions. **Materials Research**, v. 16, n. 2, p. 481–488, 2013.

KUBICEK, C. P. et al. Biotechnology for Biofuels Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. v. 14, 2009.

LANGE, J. P. Lignocellulose conversion: An introduction to chemistry, process and economics Biofuels. **Bioproducts and Biorefining**, 2007.

LEE, B. B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E. S. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. **Chemical Engineering and Technology**, v. 36, n. 10, p. 1627–1642, 2013.

LEE, H. V.; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **Scientific World Journal**, 2014.

LEITE, M. V. Microcápsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de progesterona. p. 104, 2014.

LEU, S. Y.; ZHU, J. Y. Substrate-Related Factors Affecting Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses: Our Recent Understanding. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 405–415, 2013.

LIAKOS, I. et al. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 137–145, 2014.

LIEW, K. J. et al. Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

LOPES, M. L. et al. Biotechnology and Industry Microbiology Ethanol production in Brazil : a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016a.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil : a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016b.

MACRELLI, S.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. p. 1–16, 2014.

MANGAS-SÁNCHEZ, J.; ADLERCREUTZ, P. Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. **Journal**

of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015.

MARIA, L. et al. Cellulases , xylanases , α -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. v. 51, p. 72–78, 2010.

MARQUES, P. P. Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio. **Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.**, 2011.

MARTINO, A. et al. Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 281–285, 2002.

MOHANRAM, S. et al. Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries. 2013.

MOHD AZHAR, S. H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, 2017.

MUNJAL, N.; SAWHNEY, S. K. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 5, p. 613–619, 2002.

NAGRAL, A. Gaucher Disease. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 4, n. 1, p. 37–50, 2014.

NANDY, T.; SHASTRY, S.; KAUL, S. N. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery. **Journal of Environmental Management**, 2002.

NAWAZ, M. A. et al. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 4, p. 250–256, 2015.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Appl. Sci. Conver. Technol**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 2017.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Biomass enzymatic hydrolysis. **Quimica Nova**, 2010a.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Optimisation of β -glucosidase entrapment in alginate and polyacrylamide gels. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p. 105–111, 1998.

PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **2011**, v. 1, p. 6, 2011.

PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163–171, 2014.

PAULY, M. et al. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, 2013.

PEREIRA RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, 2003.

POPPER, Z. A. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current opinion in plant biology**, 2008.

R. A. SHELDON; S. VAN PELT. enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem Soc Rev**, 2013.

RAHIM, S. N. A. et al. Enzymes encapsulation within calcium alginate-clay beads: Characterization and application for cassava slurry saccharification. **Procedia Engineering**, v. 68, p. 411–417, 2013.

REHMAN, H. U. et al. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 1081–1086, 2013.

ROGERS, P. L.; JEON, Y. J.; SVENSON, C. J. Application of biotechnology to industrial sustainability. **Process Safety and Environmental Protection**, 2005.

RYAN, D.; JOHNSON, R. Dialysis and ultrafiltration of molasses for fermentation enhancement. **Separation and Purification Technology**, 2001.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337–353, 2015.

SALGADO, J. C. S. et al. Glucose tolerant and glucose stimulated B-glucosidases – A review. **Bioresource Technology**, 2018.

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: Improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2005.

SARITHA MOHANRAM, V. R. Beta-Glucosidase: Key Enzyme in Determining Efficiency of Cellulase and Biomass Hydrolysis. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 05, n. 01, 2015.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes : An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SILVA, R. L. DE F. O. B. et al. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008.

SILVA, R. N.; ASQUIERI, E. R.; FERNANDES, K. F. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1155–1159, 2005.

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; MRHAR, A. The influence of selected parameters on the size and shape of alginate beads prepared by ionotropic gelation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, n. 1, p. 77–89, 2008.

SOSNIK, A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–17, 2014.

SOUZA, A. P. DE; LEITE, D. C. C.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides : Implications for Second-Generation

Bioethanol Production. p. 564–579, 2013.

SRIVASTAVA, N. et al. Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversion for biofuels application. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 1–23, 2019.

STRAKOWSKA, J.; BŁASZCZYK, L.; CHEŁKOWSKI, J. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. **Journal of Basic Microbiology**, 2014.

STRAND, B. L.; MØRCH, Y. A.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Minerva Biotechnologica**, 2000.

SUMMA, M. et al. A biocompatible sodium alginate/povidone iodine film enhances wound healing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2017.

THOMAS, D. Biochimie Biorefinery : Toward an industrial metabolism. v. 91, p. 659–664, 2009.

TU, M. et al. Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 3, p. 151–156, 2006.

VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure. **Plant physiology**, 2010.

VANHOLME, R. et al. **Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops** *New Phytologist*, 2012.

VITCOSQUE, G. L. et al. Production of Biomass-Degrading Multienzyme Complexes under Solid-State Fermentation of Soybean Meal Using a Bioreactor. v. 2012, 2012.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, 2001.

WON, K. et al. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2149–2154, 2005.

WOODWARD, J.; WISEMAN, A. Fungal and other β -d-glucosidases - Their properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, 1982.

WU, J. et al. Characterization of cold adapted and ethanol tolerant β -glucosidase from *Bacillus cellulosilyticus* and its application for directed hydrolysis of cellobiose to ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 872–879, 2018.

WYMAN, C. E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, 2007.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-Based Filter Paper Assay to Measure Total Cellulase Activity. n. 2003, 2004.

YAN, J. et al. Kinetic and thermodynamic parameters of β -glucosidase immobilized on various colloidal particles from a paddy soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 298–303, 2010.

YAN, T.-R.; LIN, C.-L. Purification and Characterization of a Glucose-tolerant β -

Glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 965–970, 1997.

YANG, S. et al. Identification of Genetic Targets to Improve Lignocellulosic Hydrocarbon Production in *Trichoderma reesei* Using Public Genomic and Transcri. [s.l.] **Elsevier B.V.**, 2015.

YE, P. et al. Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. **Biomaterials**, v. 27, n. 22, p. 4169–4176, 2006.

YUAN, Z. Sistema Para Pré – Tratamento De Bagaço De Cana-De-Açúcar. p. 1–61, 2016.

ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; DING, S. Y. Visualizing chemical functionality in plant cell walls Mike Himmel. **Biotechnology for Biofuels**, 2017.