UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

LUMMY MARIA OLIVEIRA MONTEIRO

**Estudo bioquímico de β -glucosidases de
Malbranchea pulchella e aplicações na hidrólise de
resíduos agroindustriais e de antocianinas**

RIBEIRÃO PRETO

2016

LUMMY MARIA OLIVEIRA MONTEIRO

**Estudo bioquímico de β -glucosidases de
Malbranchea pulchella e aplicações na hidrólise de
resíduos agroindustriais e de antocianinas**

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.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

RIBEIRÃO PRETO

2016

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.

Monteiro, Lummy Maria Oliveira

Estudo bioquímico de β -glucosidases de *Malbranchea pulchella* e aplicações na hidrólise de resíduos agroindustriais e de antocianinas. Ribeirão Preto, 2016.

116 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. β -glucosidases. 2. *M. pulchella*. 3. Imobilização. 4. Purificação. 5. Aplicações biotecnológicas.

Monteiro, L.M.O. **Estudo bioquímico de β -glucosidases de *Malbranchea pulchella* e aplicações na hidrólise de resíduos agroindustriais e de antocianinas.** 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. Ribeirão Preto, 2016.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

À professora Maria de Lourdes T. M. Polizeli, minha orientadora, por acreditar em mim, por apoiar minhas decisões, por todo o conhecimento e aprendizado transmitido e principalmente por ter me recebido em seu laboratório.

Aos Professores Dr. João Atílio Jorge, Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira, Dr. Richard John Ward, Dr. Rolf A. Prade e Dra. Carem Gledes Vargas Rechia pelos ensinamentos e pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

À Mariana Cereia, Maurício de Oliveira e Ricardo Alarcon, pelo auxílio técnico.

Aos amigos e companheiros de laboratório Ana C. Vici, Ana Silvia, Caio, Enrico, Juliana Infante, Jorge, Luciana, Marita, Monica, Vanessa, Paula, Paulo, Rosy e pela ajuda em diversas ocasiões e principalmente pelos momentos de descontração. Tive o privilégio de conhecer pessoas incríveis, exemplos de profissionais e grandes amigos.

Agradeço em especial à Ana Vici e Marita, que tiraram minhas dúvidas do dia-a-dia, e que colaboraram diretamente para a realização deste trabalho.

Também agradeço à caravana bandex: Vanessa, Paulinha, Paulo, Enrico e Ju!!! Meus almoços foram sempre mais felizes com vocês!!!

À minha mãe Cassiana, ao meu tio Alessandro, aos meus avós Maria Helena e Ocacílio e aos meus amados irmãos Alexandre Filho e Felipe, meus exemplos de vida, pelo amor e apoio, que me tornaram capaz de suportar todos os desafios até a conclusão deste trabalho, principalmente à distância. Vocês não sabem a falta que fazem na minha vida!

Ao meu namorado e companheiro Lucas, pelo amor e carinho, por contribuir com alegrias diárias, mas principalmente por me incentivar a crescer, encorajando-me nos momentos mais difíceis. Obrigada por compartilhar sonhos comigo.

Às amigas: Camila, Dayene, Lais, Guta, Patrícia e Zilmara por todo apoio transmitido ainda que distante.

À Ivone pela disponibilidade em todos os momentos, paciência em responder a todas as minhas dúvidas e desesperos por várias vezes.

Ao departamento de Bioquímica e Imunologia juntamente com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP por propiciar minha formação científica, pelo apoio e oportunidade de pós-graduação.

À CAPES, pelo auxílio financeiro no Brasil.

E, finalmente, a todos de maneira geral que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho se realizasse, meus sinceros agradecimentos.

“If we knew what it was we were doing,
it would not be called research, would it?”

Albert Einstein

Resumo

Monteiro, L.M.O. **Estudo bioquímico de β -glucosidases de *Malbranchea pulchella* e aplicações na hidrólise de resíduos agroindustriais e de antocianinas.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2016.

β -glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glucosídicas β -1,4, β -1,3 e β -1,6 a partir da extremidade não redutora de oligossacarídeos de cadeias pequenas, alquil e aril β -D-glucosídeos e dissacarídeos. Além de serem enzimas chave do complexo celulolítico, apresentam funções importantes como o melhoramento de aromas de vinhos e a hidrólise de antocianinas. *Malbranchea pulchella* usualmente é encontrado em fragmentos vegetais em decomposição ou material rico em celulose, podendo ser considerado promissor à produção de enzimas de interesse biotecnológico. Neste contexto, o objetivo desse projeto foi a caracterização funcional de uma β -glucosidase de *M. pulchella* e sua aplicação na hidrólise de resíduos agroindustriais e de antocianinas. Uma BGL da família GH3 foi purificada com um fator de purificação 6,32 e recuperação de aproximadamente 35 %. A sua massa molecular aproximado foi de 100 kDa, e o K_m , $V_{m\acute{a}x}$ e K_{cat} foram calculadas em 0,33 mM, 13,67 U/mg, 26,5 s⁻¹ respectivamente. O dicroísmo circular revelou uma estrutura composta por aproximadamente 25% de α -hélices e 20% de β -folhas. A BGL apresentou pH e temperatura ótimos igual a 6,0 e 50 °C; e foi estável a 40 °C e apresentou boa estabilidade nos pH 5,0 a 8,0, por 24 horas. Nenhum dos sais de íons metálicos ativou a enzima e apenas o HgCl₂ inibiu a atividade em 90%. A enzima não apresentou inibição em presença de glucose (0,1-1M) por até 24 horas. Além disso, a GH3 mostrou-se glicosilada e a proporção de açúcar corresponde a 15% massa da enzima. O efeito da celobiose (C) e do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BCAN) na produção das BGLs foram avaliados em um DCCR, que indicou um modelo reduzido com influência das duas variáveis. A melhor condição de cultivo para a produção de BGLs foi 0,6% de C (p/v) e 4% de BCAN (p/v). Por meio de um planejamento de mistura, os resíduos BCAN, a casca de soja moída (CS) e o bagaço de cevada (BCev), foram avaliados quanto ao potencial de hidrólise a partir das enzimas presentes no extrato enzimático, resultando no maior potencial de hidrólise sobre o BCev, com a produção de aproximadamente 2 mg/mL de açúcares redutores em 48 horas. As BGLs presentes no extrato enzimático otimizado foram imobilizadas em suporte MANAE-agarose, Concanavalina A-Sepharose e BrCN-Sepharose. Os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA foram ativados aproximadamente 10 e 3 vezes, respectivamente. BGL-MANAE e BGL-ConA foram mais estáveis que o controle BGL-BrCN em todos os pH testados em 24 horas e, além disso, BGL-ConA permaneceu com 100% de sua atividade em temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, já o BGL-MANAE mostrou-se estável a 40 °C permanecendo com 83% de sua atividade, ambos em 24 horas. BGL-MANAE e BGL-ConA apresentaram menor efeito inibitório em presença de diferentes concentrações de glucose e etanol quando comparados ao BGL-BrCN, e esses resultados indicaram que a imobilização de alguma forma colaborou para uma maior estabilidade ao pH e à temperatura, bem como ao aumento da tolerância por glucose e etanol. Os derivados puderam ser reutilizados por até 20 vezes e quando avaliados quanto à capacidade de clarificar vinhos e sucos de uva (hidrólise de antocianinas), BGL-MANAE clarificou 52% o vinho, 71% o vinho diluído, 77% o suco de uva e 56% o suco de uva diluído, e BGL-ConA em contrapartida clarificou 41% o vinho, 46% o vinho diluído, 63% o suco de uva e 23% o suco de uva diluído. BGL-MANAE foi mais eficiente que BGL-ConA na clarificação de vinhos e sucos de uva podendo ser considerado um biocatalisador promissor na hidrólise de antocianinas e, conseqüentemente, para a produção de vinhos brancos e rose a partir de diferentes variedades de uvas. Este trabalho pelo que sabemos, é o primeiro a usar BGLs imobilizadas com aplicação na clarificação de sucos de uva e vinhos, podendo ser considerado um trabalho inovador, e de grande importância para a indústria de alimentos e bebidas.

Palavras chaves: β -glucosidases, *M. pulchella*, Imobilização, Purificação, Aplicações biotecnológicas.

Abstract

Monteiro, L.M.O. **Biochemical study of β -glucosidases from *Malbranchea pulchella* and applications in agroindustrial residues and anthocyanins hydrolysis.** Master dissertation. Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, 2016.

β -glucosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of β -1,4, β -1,3 and β -1,6 glucosidic linkages, from the non-reducing end of short chain oligosaccharides, alkyl and aryl β -D-glucosides and disaccharides. Besides being complex key cellulolytic enzymes, they have important functions such as the improvement of wine flavors and anthocyanins hydrolysis. *Malbranchea pulchella* is usually found in decaying plant debris or in material rich in cellulose, for this reason it can be considered promising for the production of enzymes of biotechnological interest. In this context, the aim of this project was the functional characterization of a β -glucosidase from *M. pulchella* and its application in the organic residues and anthocyanins hydrolysis. A BGL GH3 family produced by *M. pulchella* was purified with a purification factor and recovery of about 6.32 and 35 times. Its approximate molecular mass was 100 kDa, and K_m , V_{max} and k_{cat} were 0.33 mM, 13.67 U/mg, 26.5 s⁻¹, respectively. The circular dichroism revealed a structure composed of approximately 25% of α -helix and 20% of β -sheets. BGL presented optimum pH and temperature at 6.0 and 50 °C; and it was stable at 40 °C. It also showed good stability at pH 5.0 to 8.0, for 24 hours. None of the metal ions salts activated the enzyme and HgCl₂ inhibited the activity by 90%. The enzyme showed no inhibition in the presence of glucose (0,1-1M) for 24 hours. Furthermore, it is glycosylated and the sugar proportion correspondsto 15% of the enzyme mass. The effect of cellobiose (C) and sugarcane bagasse *in natura* (BCAN) in the production of BGLs were evaluated in a CCRD, which indicated a reduced model of influence of the two variables. The best culture condition for BGLs production was 0.6% of C (w/v) and 4% (w/v) of BCAN. Through a mixture design, using the BCAN, ground soybean hulls (CS) and barley bagasse (BCev) were used to evaluate the potential of hydrolysis of these residues in the presence of enzymes present in the enzymatic extract, resulting in a greater efficiency of (BCev) hydrolysis, producing approximately 2 mg/mL of reducing sugars in 48 hours. The BGLs present in the optimized enzyme extract were also used in the immobilization on ionic support MANAE-agarose and affinity support Concanavalin A-Sepharose (ConA-Sepharose). The BGL-MANAE and BGL-ConA derivatives were activated approximately 10 and 3 times, respectively. BGL-MANAE and BGL-ConA were more stable than BGL-BrCN control in all pH tested within 24 hours. In addition, BGL-ConA remained 100% of its activity at 40 °C, 50 °C and 60 °C , and BGL-MANAE was stable at 40 °C and remained 83% of its activity, both in 24 hours. BGL-MANAE and BGL-ConA showed lower inhibitory effect in the presence of different glucose and ethanol concentrations when compared to BGL-BrCN and these results indicate that the immobilization, somehow, cooperated to a greater pH and temperature stability, as well as to increased tolerance by glucose and ethanol. The derivatives could be reused up to 20 times and when they were tested for their capacity to clarify wine and grape juice (anthocyanins hydrolysis), BGL-MANAE clarified 52% wine, 71% diluted wine, 77% grape juice and 56% diluted grape juice. On the other hand, BGL-ConA clarified 41% wine, 46% diluted wine, 63% grape juice and 23% diluted grape juice. BGL-MANAE was more efficient than BGL-ConA in clarifying wines and grape juices and it may be considered a promising biocatalyst in the anthocyanins hydrolysis, and consequently in the production of white and rose wines from different varieties of grapes. This work as we know, is the first to use immobilized BGLs applied in the clarification of grape juice and wine, for this reason, it can be considered an innovative work, and of great importance to the food and beverage industry.

Key words: β -glucosidase, *M. pulchella*, Immobilization, Purification, Biotechnological applications.

Sumário

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Sumário.....	xii
Índice de figuras	xvii
Índice de tabela.....	xx
Lista de abreviaturas	xx
1. Introdução	1
1.1. Etanol de segunda geração	2
1.2. Composição da biomassa lignocelulósica	3
1.3. Biodegradação da biomassa lignocelulósica	5
1.4. β -glucosidases (EC 3.2.1.21).....	7
1.4.1. β -glucosidases (BGLs)	7
1.4.2. Classificação das β -glucosidases	8
1.4.3. Produção de β -glucosidases por microrganismos	10
1.5. Outras aplicações biotecnológicas de β -glucosidases	10
1.5.1. Otimização de aromas em sucos e vinhos	11
1.5.2. Hidrólise de antocianinas.....	13
1.6. O microrganismo - <i>Malbranchea pulchella</i>	14
1.7. Imobilização enzimática	15
1.7.1. Imobilização irreversível por ligação covalente unipontual.....	16
1.7.3. Imobilização reversível.....	17
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. Material e Métodos	21
3.1. Cultivo e manutenção de <i>Malbranchea pulchella</i>	22
3.2. Otimização da produção enzimática.....	22
3.2.1. Screening entre os meios de cultivo Emerson e Lummy	22
3.2.2 Screening entre diferentes fontes de carbono	22
3.2.3. Otimização por delineamento composto central rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta.....	23
3.3. Dosagem de β -glucosidases utilizando p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG) como substrato.....	23
3.3.1. Dosagem de enzimas do complexo lignocelulolítico	24

3.4. Dosagem de proteínas.....	26
3.5. Purificação da BGL	26
3.5.1. Ultrafiltração tangencial	26
3.5.2. DEAE-fractogel	26
3.5.3. Gel de eletroforese SDS-PAGE e Zimograma para BGL	27
3.5.4. Identificação por espectrometria de massas	27
3.5.5. Dicroísmo circular	28
3.5.6. Modelagem	28
3.5.7. Análise do grau de glicosilação da BGL	28
3.5.8. Determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a BGL purificada	29
3.6. Imobilização de BGLs em diferentes suportes	29
3.6.1. Imobilização em suporte BrCN-Sepharose (BrCN-Seph) ativado	29
3.6.2. Preparo do suporte MANAE agarose	30
3.6.3. Imobilização reversível de BGL em MANAE agarose (suporte de interação iônica)	30
3.6.4. Imobilização reversível de BGL em Con A-Sepharose TM 4B (afinidade) ..	31
3.6.5. Teste de reuso dos derivados em diferentes suportes de imobilização.....	31
3.7. Caracterização enzimática	32
3.7.1. Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática ou derivado	32
3.7.2. Inativação térmica e estabilidade ao pH da atividade enzimática ou derivado	32
3.7.3. Influência de compostos iônicos, EDTA e β -mercaptoetanol na atividade enzimática.....	33
3.7.4. Efeito de glucose e etanol na atividade enzimática ou derivado	33
3.8. Aplicação do extrato bruto e da BGL imobilizada	33
3.8.1. Planejamento de mistura.....	34
3.8.2. Clarificação do suco de uva e de vinho tinto.....	36
3.9. Reprodutibilidade dos experimentos	37
4. Resultados.....	38
Capítulo I.....	40
Produção, purificação e caracterização de uma β -glucosidase da família GH3 de <i>Malbranchea pulchella</i>	40
4.1.1. Purificação da BGL	41
4.1.1.1. SDS-PAGE e Zimograma da BGL purificada.....	42

4.1.1.2. Identificação por espectrometria de massas	43
4.1.1.3. Dicroísmo circular	44
4.1.1.4. Modelagem da BGL purificada	44
4.1.1.5. Análise do grau de glicosilação da BGL	47
4.1.1.6. Determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ e k_{cat} da BGL purificada	48
4.1.1.7. Efeito da temperatura de reação da BGL purificada	50
4.1.1.8. Efeito do pH na reação da BGL purificada	50
4.1.1.9. Influência de compostos iônicos, EDTA e β -mercaptoetanol na atividade enzimática	51
4.1.1.10. Inativação térmica da BGL purificada	52
4.1.1.11. Estabilidade ao pH na atividade da BGL purificada	53
4.1.1.12. Efeito da glucose na atividade da BGL purificada	55
Capítulo II	56
Otimização da produção de β -glucosidases de <i>Malbranchea pulchella</i> por DCCR e aplicação na hidrólise de resíduos industriais por meio de um planejamento de mistura	56
4.2.1. Otimização da produção de BGLs	57
4.2.1.1. Screening entre os meios de cultivo Emerson e Lummy	57
4.2.1.2. Screening entre diferentes fontes de carbono	58
4.2.1.3. Otimização do meio de cultivo por delineamento composto central rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta	59
4.2.2. Dosagem de enzimas do complexo lignocelulolítico	62
4.2.3. Planejamento de mistura	63
4.2.3.1. TLC do produto de hidrólise	66
Capítulo III	67
Imobilização, caracterização dos derivados e aplicação biotecnológica de β -glucosidases imobilizadas	67
4.3.1. Imobilização	68
4.3.2. Caracterização enzimática dos derivados	68
4.3.2.1. Efeito da temperatura de reação dos derivados	69
4.3.2.2. Efeito do pH na reação dos derivados	70
4.3.2.1. Estabilidade ao pH dos derivados	70
4.3.2.2. Inativação térmica dos derivados	74
4.3.2.3. Efeito da glucose sobre os derivados	76

4.3.2.4. Efeito do etanol sobre os derivados	76
4.3.3. Dessorção de BGLs dos suportes MANAE-agarose e Concanavalina A-Sepharose	79
4.3.4. Teste de reuso dos derivados	80
4.3.5. Aplicação biotecnológica dos derivados – clarificação do suco de uva e de vinho tinto através da hidrólise de antocianinas	80
Discussão	83
Conclusões	96
Referências bibliográficas	99
Anexos	110

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura da biomassa vegetal lignocelulósica.....	4
Figura 2. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose e xilana	6
Figura 3. Domínio barril (α/β) ₈ presentes nas famílias GH1, GH3, GH5 e GH30 e barril (α/α) ₆ presente na família GH9	9
Figura 4. Mecanismo sequencial de β -glucosidases para a liberação de terpenos presentes em vinhos e sucos.	12
Figura 5. Esquema do mecanismo de ação das BGLs sobre as antocianinas.....	13
Figura 6. Culturas do microrganismo <i>M. pulchella</i>	15
Figura 7. Imobilização em suporte ativado com brometo de cianogênio.....	16
Figura 8. Representação esquemática da imobilização reversível de uma enzima em suporte carregado positivamente e negativamente.	18
Figura 9. Representação esquemática da imobilização reversível de uma enzima em suporte de afinidade Concanavalina A	18
Figura 10. Uva e Vinho utilizados no experimento de clarificação	37
Figura 11. Perfil cromatográfico da purificação de BGLs <i>M. pulchella</i> em Fractogel® EMD DEAE.....	42
Figura 12. Eletroforese em condições desnaturantes da BGL purificada e Zimograma em condições semi-desnaturante para a BGL produzida por <i>M. pulchella</i>	43
Figura 13. Espectro de dicroísmo circular de <i>Far-UV</i> da BGL purificada.	44
Figura 14. Modelo computacional para a beta-glucosidase 1 de <i>Aspergillus aculeatus</i> . 45	
Figura 15. Alinhamento da beta-glucosidase 1 de <i>Aspergillus aculeatus</i> com a BGL de <i>M. pulchella</i>	46
Figura 16. Efeito da deglicosilação na massa molecular de BGL	47
Figura 17. Predição dos sítios de glicosilação presentes na BGL	48
Figura 18. Representação gráfica das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da BGL purificada.....	49
Figura 19. Efeito da temperatura de reação da BGL purificada produzida por <i>M. pulchella</i>	50
Figura 20. Efeito do pH na reação da BGL purificada produzida por <i>M. pulchella</i>	51
Figura 21. Influência de íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da BGL purificada de <i>M. pulchella</i>	52
Figura 22. Inativação térmica da BGL purificada produzida por <i>M. pulchella</i>	53
Figura 23. Estabilidade ao pH da BGL purificada nos pH ácidos (2,0-6,0).....	54
Figura 24. Estabilidade ao pH da BGL purificada em pH neutro e básicos (7,0-10,0)..	54
Figura 25. Influência de Glucose sobre a atividade da BGL purificada de <i>M. pulchella</i>	55
Figura 26. Atividade de BGLs relativa frente aos meios de cultivo Emerson e Lummy.	57
Figura 27. Atividade de BGLs relativa quando induzida por diferentes fontes de carbono	58
Figura 28. Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis celobiose e bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (BCAN) sobre a atividade de BGLs	60

Figura 29. Superfície de resposta obtida através do modelo reduzido, calculado a partir de um DCCR, para o efeito da celobiose e do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (BCAN) na produção de BGLs de <i>M. pulchella</i>	61
Figura 30. Representação gráfica das proporções das atividades enzimáticas presentes no extrato bruto.....	63
Figura 31. Superfície de resposta da ação do extrato bruto em diferentes tempos de hidrólise sob o bagaço de cana, casca de soja moída e bagaço de cevada	64
Figura 32. TLC com os produtos de hidrólise do BCev pelas enzimas presentes no extrato bruto produzido por <i>M. pulchella</i> nas condições encontradas pelo DCCR.....	66
Figura 33. Efeito da temperatura de reação dos derivados BGL-MANAE, BGL-ConA e BGL-BrCN.	69
Figura 34. Efeito do pH na reação dos derivados BGL-MANAE, BGL-ConA e BGL-BrCN.....	70
Figura 35. Estabilidade ao pH dos diferentes derivados nos pH ácidos (2,0-6,0) para BGL-BrCN, BGL-MANAE e BGL-ConA.....	72
Figura 36. Estabilidade ao pH dos derivados nos pH neutro e básicos (7,0-11,0) para BGL-BrCN, BGL-MANAE e BGL-ConA.....	73
Figura 37. Inativação térmica dos derivados a 40 °C, 50 °C e 60 °C para BGL-BrCN, BGL-MANAE e BGL-ConA.....	75
Figura 38. Efeito de diferentes concentrações de glucose na atividade de BGLs imobilizadas.....	77
Figura 39. Efeito de diferentes concentrações de etanol na atividade de BGLs imobilizadas.....	78
Figura 40. Representação gráfica da dessorção de BGLs dos derivados BGL-MANAE e BGL-ConA	79
Figura 41. Representação gráfica do reuso dos derivados BGL-MANAE e BGL-ConA.	80
Figura 42. Clarificação do vinho tinto e do suco de uva por BGLs de <i>M. pulchella</i> imobilizadas em MANAE-agarose e em Concanavalina A-Sepharose.....	81
Figura 43. Clarificação do vinho tinto e do suco de uva por BGLs de <i>M. pulchella</i> imobilizadas em MANAE-agarose e em Con A-sepharose..	82

Índice de tabela

Tabela 1. Resumo das dosagens enzimáticas.	25
Tabela 2. Ensaio utilizados na construção do planejamento de mistura.....	35
Tabela 3. Composição dos resíduos utilizados no planejamento de mistura.....	36
Tabela 4. Purificação de uma BGL de <i>M. pulchella</i>	41
Tabela 5. Parâmetros cinéticos encontrados por meio dos diferentes <i>softwares</i>	49
Tabela 6. DCCR 2 ² para avaliar o efeito da celobiose e do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> sobre a atividade de BGL.....	59
Tabela 7. ANOVA calculada para o DCCR sobre o efeito da celobiose e do Bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> sobre a atividade de BGL.	61
Tabela 8. Quantificação das enzimas que hidrolisam celulose, hemicelulose e lignina	62
Tabela 9. ANOVA para o rendimento da hidrólise enzimática (mg/mL de açúcar redutor) em diferentes resíduos vegetais: 3, 6, 24 e 48 horas e equações de cada modelo de mistura.	65
Tabela 10. Imobilização das BGLs de <i>M. pulchella</i> em diferentes suportes, em pH 7,0.	69
Tabela 11. Porcentagem de clarificação dos vinhos e sucos utilizando os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA na hidrólise da antocianina.....	82

Lista de abreviaturas

BCA: Bagaço de cana-de-açúcar
BCAN: Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*
BCev: Bagaço de cevada
BrCN: brometo de cianogênio
DCCR: delineamento composto central rotacional
DEAE: dietilaminoetil
DO: densidade óptica
EDTA: etilenodiaminotetraacetato
Fr: fator de retenção
g: Grama
g: gravidade
kDa: kiloDaltons
k_{cat}: constante catalítica
K_m: constante de Michaelis-Menten
L: litros
M: molar
MANAE: monoamino-N-aminoetil
mg: miligramas
min.: minutos
mL: mililitros
mM: milimolar
MM: massa molecular
N: normal
nm: nanômetros
p/v: peso por volume
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
pH: Potencial hidrogeniônico
pI: ponto isoeletrico
q.s.p.: quantidade suficiente para
rpm: rotações por minuto
s: segundos
SDS: dodecil sulfato de sódio
TEMED: tetrametiletenodiamina
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
v/v: volume por volume
V: Volts
V_{máx}: velocidade máxima
α: alfa
β: beta
p: para
pNPG: p-Nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo
μg: Microgramas
μL: Microlitros
°C: grau Celsius
%: por cento

1. Introdução

1.1. Etanol de segunda geração

Os esforços atuais para atender ao aumento da demanda por combustíveis como o etanol no Brasil e em outros lugares estão fundamentados principalmente na construção de novas usinas e no aumento da área de plantio para o cultivo da cana-de-açúcar (Goldemberg & Guardabassi, 2009; Soccol *et al.*, 2010); no entanto, o aumento da produção também pode se basear na melhoria do cultivo da cana-de-açúcar permitindo, assim, o aumento da produção de etanol por hectare. O desenvolvimento de novas tecnologias e melhorias nos processos já existentes também são necessários para que se obtenha mais etanol por tonelada de cana-de-açúcar. A produtividade agrícola pode ser melhorada por meio de práticas como a mecanização de baixo impacto para o plantio direto, o uso de novas variedades de cana e de cana transgênica (CTBE, 2010). Além disso, a produção também pode ser intensificada pela utilização de toda a cana-de-açúcar como matéria-prima (Soccol *et al.*, 2010), através da hidrólise química e bioquímica de resíduos de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) ou pela produção de outros combustíveis renováveis (BTL – *biomass to liquid thermochemical route*) (Naik *et al.*, 2010; Walter & Ensinas, 2010) ou de produtos químicos (Fu & Holtzapple, 2010).

A utilização de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração seria preferível em relação à utilização de açúcar e amido para a produção de etanol de primeira geração devido à concorrência com a produção de alimentos, além de acarretar menor alteração na utilização do solo e menor desmatamento (Fu & Holtzapple, 2010; Nigam & Singh, 2011; Sánchez & Cardona, 2008). O uso de materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração ainda não é uma realidade industrial, principalmente devido à falta de tecnologias eficientes e de baixo custo, e ao pouco investimento na produção (Cardona *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2010). A estrutura da parede celular da planta, e as dificuldades em hidrolisar seus principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) limita a aplicação da biomassa vegetal (Rodrigues *et al.*, 2010).

O BCA é um resíduo lignocelulósico obtido durante o plantio e o processamento da cana-de-açúcar durante a sua queima, que pode ter como destino sustentável a produção de energia.

O Brasil é um dos principais produtores agrícolas do mundo e, dessa forma, os resíduos lignocelulósicos acumulados são, conseqüentemente, abundantes. Uma de suas principais culturas é cana-de-açúcar, com uma produção esperada para a safra 2015/2016 de 663 milhões de toneladas (Oliveira *et al.*, 2015). Para cada tonelada de cana-de-açúcar são produzidos 260 kg de BCA (considerando 50% de umidade) (Seabra *et al.*, 2010). Como a sua composição é principalmente de polímeros de açúcares, este resíduo pode ser reciclado para a produção de compostos de alto valor, tais como etanol segunda geração, aditivos alimentares, ácidos orgânicos e enzimas (Maitan-Alfenas, 2015).

A parede celular vegetal tem diferentes composições de acordo com a espécie, idade e tipo de tecido celular (Carpita, 2000). A cana-de-açúcar, por exemplo, é composta por aproximadamente 39% de celulose, 27% de hemicelulose e 28% de lignina (Lima *et al.*, 2014).

1.2. Composição da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de parede celular de plantas, com os carboidratos estruturais, celulose, hemicelulose e a lignina, caracterizados por serem polímeros fenólicos heterogêneos, como seus componentes primários (**Figura 1**). No entanto, as suas proporções podem variar substancialmente, dependendo do tipo, da espécie, e até mesmo da fonte da biomassa (Pauly *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2002).

Celulose, o principal componente da parede celular da planta, é um polissacarídeo composto por cadeias lineares de glucano ligadas em conjunto por ligações β -1,4-glucosídicas com resíduos de celobiose como unidade de repetição. As cadeias de celulose são agrupadas para formar as microfibrilas, que são incorporadas para formar as fibras de celulose. A ultraestrutura de celulose é formada em grande parte devido à presença de ligações covalentes, de ligações de hidrogênio e de Van der Waals. A ligação de hidrogênio dentro de uma microfibrila de celulose determina a 'linearidade' dos elos de uma cadeia (Klemm *et al.*, 2005). Na natureza, a celulose parece estar associada a outros componentes da planta e esta associação pode interferir na sua biodegradação (Pérez *et al.*, 2002).

Figura 1. Estrutura da biomassa vegetal lignocelulósica (adaptado de Ratanakhanokchai *et al.*, 2013).

Hemicelulose é o segundo polímero mais abundante e diferencia-se da celulose por não ser quimicamente homogêneo. A hemicelulose possui ramificações e é um polímero heterogêneo de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glucose, galactose) e açúcares acetilados. Ela tem uma massa molecular mais baixa quando comparada à celulose e cadeias laterais com ramos curtos que podem ser facilmente hidrolisadas (Saha, 2003; Scheller & Ulvskov, 2010). As hemiceluloses podem ser diferentes em composição. A hemicelulose da biomassa agrícola como palhas e gramíneas são compostas principalmente de xilana, enquanto hemiceluloses de madeira macia são compostas principalmente por glucomanana. Em diversas plantas, xilanas são heteropolissacarídeos com unidades β -D-xilopirranose 1,4-ligadas. Além da xilose, a xilana pode conter arabinose, ácido glucurônico, ácido acético, ácidos ferúlico e p-cumárico. As hemiceluloses são ligadas via ligações de hidrogênio às microfibrilas de celulose na parede celular vegetal, formando ligações cruzadas. As hemiceluloses são também ligadas covalentemente à lignina, formando com a celulose uma estrutura complexa (Ratanakhanokchai *et al.*, 2013).

Lignina é o terceiro polímero mais abundante na natureza. Ela está presente na parede celular vegetal, conferindo rigidez, impermeabilidade, e resistência ao ataque microbiano e ao stress oxidativo. A lignina é uma complexa rede formada pela polimerização de unidades de fenil propano e constitui a mais abundante fração não-

polissacarídica em lignoceluloses (Pérez *et al.*, 2002; Sánchez, 2009). Os três monômeros da lignina são álcool p-cumaril, álcool coniferílico e álcool sinapílico; eles são unidos por ligações éter alquil-arilo, alquil-alquilo e aril-arilo. A lignina incorpora celulose proporcionando proteção contra a degradação microbiana e enzimática. Além disso, a lignina é capaz de formar ligações covalentes com a hemicelulose como, por exemplo, ligações éster de benzila com o grupo carboxila do ácido 4-O-metil-D-galacturônico em xilana. Ligações ésteres mais estáveis, também conhecidas como complexos de carboidratos de lignina, podem ser formadas entre a lignina e a arabinose, ou entre os grupos laterais de galactose em xilanas e mananas (Ratanakhanokchai *et al.*, 2013).

1.3. Biodegradação da biomassa lignocelulósica

Vários métodos biológicos para o reaproveitamento da biomassa lignocelulósica com base na degradação enzimática de celulose, hemicelulose, lignina foram desenvolvidos. Até o momento, os processos que utilizam enzimas e microrganismos lignocelulolíticos poderiam levar a tecnologias promissoras ambientalmente viáveis. A relação entre a celulose e a hemicelulose nas paredes celulares de plantas superiores é muito mais interligada do que se pensava anteriormente. Possivelmente, as moléculas nos limites de celulose-hemicelulose, e aquelas dentro da celulose cristalina, requeiram diferentes enzimas para realizar uma hidrólise eficiente (Ratanakhanokchai *et al.*, 2013).

As celulasas responsáveis pela hidrólise da celulose são compostas de uma mistura complexa de enzimas com especificidades diferentes para hidrolisar as ligações β -1,4-glucosídicas (**Figura 2A**). As celulasas podem ser divididas em três grandes classes baseadas na atividade da enzima (Goyal *et al.*, 1991; Rabinovich *et al.*, 2002). Estas são as endoglucanases ou endo-1-4- β -glucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (EC 3.2.1.21). Endoglucanases iniciam o ataque aleatoriamente em vários locais internos nas regiões amorfas da fibra de celulose, que abrem regiões para o ataque posterior pelas celobiohidrolases. Celobiohidrolases do tipo I (CBH I) removem celobiose da extremidade redutora da cadeia do glucano e celobiohidrolases do tipo II (CBH II) da extremidade não redutora. Além disso, celobiohidrolases podem hidrolisar celulose altamente cristalina. β -glucosidases hidrolisam celobiose e, em alguns casos celooligossacarídeos de cadeia

curta em glucose (Goyal *et al.*, 1991; Rabinovich *et al.*, 2002; Ratanakhanokchai, *et al.*, 2013).

Figura 2. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose (A) e xilana (B). (adaptado de Ratanakhanokchai *et al.*, 2013).

A xilana é o principal carboidrato encontrado em hemiceluloses. A sua degradação completa requer a ação cooperativa de uma variedade de enzimas hidrolíticas (**Figura 2B**). Xilanases são frequentemente classificadas de acordo com a sua ação em diferentes substratos: endo-1,4- β -xilanases (endoxilanases) (EC 3.2.1.8) geram xilooligossacarídeos a partir da clivagem da xilana, enquanto 1,4- β -xilosidases (β -xilosidases) (EC 3.2.1.37) produzem xilose a partir de xilobiose e xilooligossacarídeos de cadeia curta. Além disso, a degradação da xilana requer enzimas acessórias, tais como α -L-Arabinofuranosidase (Arabinofuranosidase) (EC 3.2.1.55), α -4-O-metil-D-glucuronidase (glucuronidase) (EC 3.2.1.39), acetil xilano esterase (EC

3.1.1.72), feruloil esterase (EC 3.1.1.73), e ácido p-cumárico esterase (EC 3.1.1.-), agindo sinergicamente.

No caso de acetil-4-O-metilglucuronoxilana, que é uma das mais comuns hemiceluloses, quatro diferentes enzimas são necessárias para a degradação: endo-1,4- β -xilanase, acetil esterase (EC 3.1.1.6), α -glucuronidase, e β -xilosidase. A degradação de O-acetil galactoglucomanana começa com a ruptura do polímero por endo-mananases (EC 3.2.1.78). Acetilglucomanana esterases (EC 3.1.1.-) removem grupos acetil, e as α -galactosidases (EC 3.2.1.22) eliminam os resíduos de galactose. Finalmente, β -manosidases (EC 3.2.1.25) fazem a hidrólise do terminal não redutor de resíduos β -D-manose em β -D-manosídeos (Li *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2002; Thomson, 1993).

A lignina é o polímero aromático renovável mais abundante da Terra, e é composto por estruturas fenólicas (80-90%) e não fenólicas (Wang, 2008). Os fungos possuem a capacidade de degradar lignina por meio da secreção de enzimas chamadas coletivamente de “ligninases”. As ligninases possuem duas famílias, as fenol oxidases (lacases) e as peroxidases [lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidase (MnP)] (Guillén *et al.*, 2005). Basidiomicetos como o *Coriolus versicolor* (Wang, 2008), *Phanerochaete chrysosporium* e *Tinea versicolor* (Moredo, 2003) foram descritos como os microrganismos produtores mais eficientes de enzimas capazes de degradar a lignina. LiP é capaz de oxidar a parte não fenólica da lignina, em contrapartida não foi detectada em muitos fungos que degradam lignina (Srebotnik, 1988; Tanaka, 1999).

1.4. β -glucosidases (EC 3.2.1.21)

1.4.1. β -glucosidases (BGLs)

A β -glucosidase (EC 3.2.1.21) foi descoberta e amplamente estudada devido à sua distribuição universal e da natureza simples do ensaio enzimático (Shewale, 1982). BGLs são enzimas de grande importância biológica que normalmente catalisam a hidrólise de ligações glucosídicas β -1,4, β -1,3 e β -1,6 a partir da extremidade não redutora de oligossacarídeos de cadeias pequenas, alquil e aril β -D-glucosídeos e dissacarídeos (Bhatia *et al.*, 2002).

Variações de BGLs estão distribuídas em todos os tipos de organismos e possuem papéis importantes em diversos processos biológicos, dependendo da

localização e do sistema biológico em que essas reações ocorrem (Harnpicharnchai *et al.*, 2009). Em microrganismos celulolíticos, por exemplo, elas são membros da família de enzimas celulolíticas que agem de maneira sinérgica convertendo celulose à glucose – a qual pode ser convertida a etanol. Neste caso, as BGLs convertem resíduos de celobiose à glucose.

1.4.2. Classificação das β -glucosidases

As BGLs são um grupo heterogêneo de enzimas hidrolíticas e podem ser classificadas de acordo com vários critérios. Não existe um método definido único para a classificação dessas versáteis enzimas, mas em geral dois métodos de classificação aparecem na literatura. Um método de classificação está baseado na especificidade pelo substrato, e o segundo baseia-se na identidade da sequência dos nucleotídeos (NSI) (Henrissat & Bairoch, 1996).

Com base na especificidade do substrato, estas enzimas têm sido classificadas como (1) aril β -glucosidases, que atuam sobre aril-glucosídeos, (2) celobiasas verdadeiras, que hidrolisam a celobiose para liberar a glucose e (3) enzimas com ampla especificidade ao substrato, que atuam em um amplo espectro de substratos. A maioria das BGLs pertence à última categoria (Henrissat & Bairoch, 1996).

Pouco se sabe sobre a interação das BGLs com os seus substratos. As atividades das BGLs são medidas utilizando substratos artificiais tais como pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo) ou metil umbeliferil- β -D-glucopiranosídeo (MUG) e em alguns casos as atividades das BGLs são medidas por meio do substrato celobiose. A maioria das BGLs mostra alta atividade catalítica e baixo K_m para os substratos artificiais como o pNPG e o MUG, mas não para a celobiose. A cinética da BGL depende da configuração do substrato e a celobiose requer uma mudança conformacional para que ocorra a catálise. Essa mudança conformacional não é necessária para que ocorra a catálise dos substratos artificiais por BGLs (Nam *et al.*, 2010).

O método de classificação mais aceito é o baseado na identidade de sequência dos nucleotídeos, proposto por Henrissat e Bairoch (1996) e com base na sequência e dobramento (análise de grupamentos hidrofóbicos) destas enzimas.

Os grupamentos hidrofóbicos de uma grande variedade dessas enzimas sugerem que as α -hélices e as folhas- β estão localizadas em posições conservadas na conformação enovelada. Além disso, um grande número de aminoácidos conservados é encontrado próximo do sítio ativo das BGLs (Singhania *et al.*, 2012). A classificação baseada na sequência é muito útil na caracterização das enzimas do ponto de vista estrutural, porém a especificidade ao substrato serve como uma caracterização primária. Em alguns casos a especificidade ao substrato serve como a única forma de identificação e caracterização de BGLs desconhecidas ou estruturalmente indefinidas. A maior parte das BGLs está inseridas nas famílias glucosil-hidrolase 1 (GH1) ou glucosil-hidrolase 3 (GH3) embora estas enzimas também sejam encontrados em famílias glucosil-hidrolase 5 (GH5), 9 (GH9) e 30 (GH30) (Cantarel *et al.*, 2009; Henrissat, 1991; Opassiri *et al.*, 2007).

BGLs têm várias estruturas, mas o dobramento geral do domínio catalítico é semelhante em cada família de glucosil hidrolase. As famílias GH1, GH5 e GH30 pertencem ao grupo GH-A, e todos eles têm em comum o domínio barril (β/α)₈ representado na **figura 3**, que contém seu sítio ativo. Em contraste, as GH3 têm dois domínios barril (β/α)₈ que contribuem para o seu sítio ativo e as GH9 têm o barril (α/α)₆ (**Figura 3**) (Cairns *et al.*, 2010).

Figura 3. Domínio barril (α/β)₈ presentes nas famílias GH1, GH3, GH5 e GH30 e barril (α/α)₆ presente na família GH9. (Adaptado de Wertz *et al.*, 2010)

1.4.3. Produção de β -glucosidases por microrganismos

A produção de BGLs por microrganismos têm sido amplamente explorada, tanto por fermentação em estado sólido quanto por fermentação submersa. Há diversos relatos quanto a produção de BGLs por fungos filamentosos, tais como o *Aspergillus niger* (Gunata e Vallier, 1999), *A. oryzae* (Riou *et al.*, 1998), *Penicillium brasilianum* (Krogh *et al.*, 2010), *Penicillium decumbens* (Chen *et al.*, 2010), *Phanerochaete chrysosporium* (Tsukada *et al.*, 2006) e *Paecilomyces sp.* (Yang *et al.*, 2009), embora existam também vários relatos da produção dessa enzima por algumas bactérias. Para a hidrólise da biomassa celulósica, as BGLs produzidas por fungos filamentosos são promissoras, por oferecerem a vantagem da produção através de fermentação em estado sólido com títulos elevados, quando comparados à fermentação submersa (Singhania *et al.*, 2012).

Existem diversos estudos comparando as atividades enzimáticas de celulasas, mas poucos são os relatos que comparam as atividades de BGLs e suas propriedades. Em 2009 Korotkova *et al.* estudaram as propriedades de BGLs produzidas por *Penicillium verruculosum*, *Aspergillus japonicus* e *Trichoderma reesei*, objetivando seu possível papel na sacarificação de biomassa, e para todos esses fungos produtores a atividade ótima aparente encontrada para BLGs foi no pH 5,0 e temperatura de 40° C.

As propriedades desejadas de BGL podem ser obtidas por meio da padronização das condições de fermentação, bem como da escolha da fonte de nutriente (Singhania *et al.*, 2012).

1.5. Outras aplicações biotecnológicas de β -glucosidases

Enzimas são utilizadas em diversas aplicações industriais, e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas vem crescendo (Bhat, 2000). As principais dificuldades encontradas para a exploração comercial de enzimas são seu baixo rendimento, baixa estabilidade, baixa especificidade e alto custo de produção. Portanto, novas enzimas comercialmente importantes, com características bioquímicas, físicas e químicas desejáveis, são um importante foco de pesquisa (Bhat & Bhat, 1997; Iembo *et al.*, 2002; Vernocchi *et al.*, 2015).

A aplicação de BGLs requer uma produção em larga escala, além de um conhecimento dos mecanismos de reação (Bhatia *et al.*, 2002). Para isso, diversas

estratégias químicas e bioquímicas vêm sendo implementadas com o objetivo de melhorar a produção dessas enzimas. Exemplos são a clonagem molecular de genes codificantes para BGLs (Bhatia *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2005; Spiridonov & Wilson, 2001), técnicas de mutagênese (Rajoka, 2005; Solov'eva *et al.*, 2005), e a imobilização em vários suportes dessas enzimas (Gargouri *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2005; Shen & Xia, 2004).

1.5.1. Otimização de aromas em sucos e vinhos

Com o objetivo de melhorar as características aromáticas de vinhos e sucos, BGLs microbianas vêm sendo amplamente estudadas devido ao seu potencial em liberar compostos ricos em aroma de sucos e vinhos (Belancic *et al.*, 2003; Gueguen *et al.*, 1996; Maicas & Mateo, 2005; Mateo & Jiménez, 2000; Matthews *et al.*, 2004; Martino *et al.*, 2000; Sarry & Günata, 2004; Vernocchi *et al.*, 2015), uma vez que além das formas voláteis, existem também diferentes precursores não voláteis de aroma (Günata *et al.*, 1985; Krammer *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1997; Vernocchi *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 1982a). Os terpenos estão entre os principais compostos que contribuem para o aroma de vinhos, além de compostos derivados do benzeno, e álcoois alifáticos (Cabaroğlu *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2003; Sarry & Günata, 2004; Vernocchi *et al.*, 2015). Na forma não volátil, o terpeno encontra-se ligado geralmente a um dissacarídeo (Williams *et al.*, 1982a; Günata *et al.*, 1985; Barbagallo *et al.*, 2007), não contribuindo para o aroma, a não ser que seja liberado (Ferreira *et al.*, 2001; Liu, 2002; Maicas & Mateo, 2005; Barbagallo *et al.*, 2007; Vernocchi *et al.*, 2015). Embora a liberação dos terpenos a partir de seus precursores não voláteis possa ser realizada tanto por enzimas quanto por ácidos (Williams *et al.*, 1982b; Günata *et al.*, 1990; Cabaroğlu *et al.*, 2003), a hidrólise enzimática é considerada um método mais apropriado por não modificar o padrão de distribuição natural do aroma (Mateo & Jiménez, 2000; Belancic *et al.*, 2003; Maicas & Mateo, 2005; Palmeri *et al.*, 2007; Barbagallo *et al.*, 2007).

Pelo mecanismo enzimático de liberação, primeiramente a ligação que mantém o dissacarídeo é clivada por uma enzima específica e, em um segundo estágio, a ligação β -glucosídica entre o terpeno e a molécula de glucose é hidrolisada por BGLs (**Figura 4**) (Günata *et al.*, 1988). Glucose também é formada neste processo, não apresentando efeito no aroma uma vez que as quantidades formadas pela hidrólise (tipicamente

mg/kg) estão abaixo do limiar de gustação (tipicamente g/kg) (Hemingway *et al.*, 1999; Palmeri *et al.*, 2007; Barbagallo *et al.*, 2007; Vernocchi *et al.*, 2015).

Figura 4. Mecanismo sequencial de β-glucosidases para a liberação de terpenos presentes em vinhos e sucos. Ara: α-L-furanosidase; Rha: α-L-piranosidase; Api: β-D-apiofuranosidase; BGLs: β-glucosidase; R: monoterpenos, sesquiterpenos, norisoprenoides, derivados de benzeno, álcoois alifáticos (adaptado de Palmeri *et al.*, 2007)

Além disso, com o amadurecimento do vinho os precursores aromáticos passam por um processo de lenta hidrólise química, onde diversos produtos aromáticos, como linalol, nerol e geraniol, são convertidos em produtos menos aromáticos, como α-terpineol, dióis, óxidos, entre outros. A adição de β-glucosidases ao mosto, ou vinho, permite a otimização do aroma sem esta desvantagem (Martino *et al.*, 2000; Palmeri *et al.*, 2007; Barbagallo *et al.*, 2007). Nas vinícolas, BGLs são geralmente adicionadas ao vinho durante os processos de maturação (Manzanares *et al.*, 2000; Vernocchi *et al.*, 2015).

Entretanto, para que enzimas possam ser utilizadas na liberação de aromas sob as condições restritivas que o vinho oferece, estas devem satisfazer alguns pré-requisitos como especificidade, pH ótimo, e tolerância à glucose e etanol (Günata *et al.*, 1990; Riou *et al.*, 1998; Matthews *et al.*, 2004; Palmeri *et al.*, 2007; Barbagallo *et al.*, 2007).

1.5.2. Hidrólise de antocianinas

As BGLs podem hidrolisar antocianinas, importantes agentes de cor encontrados em alimentos de origem vegetal (Spagna *et al.*, 2000). Em uvas tintas, em mostos e vinhos derivados destas uvas, as antocianinas são os principais pigmentos (Sánchez-Torres *et al.*, 1998; Liu, 2002). Desta forma, a atividade de BGLs podem afetar adversamente estes vinhos, provocando perda da coloração (Manzanares *et al.*, 2000; Liu, 2002; Barbagallo *et al.*, 2004b; Vernocchi *et al.*, 2015).

Antocianinas são pigmentos naturais presentes nos vacúolos de células vegetais, derivadas dos flavonóides, mais especificamente do cátion flavílico (ou flavilium). São glicosídeos, ou seja, compostos formados pela união de uma molécula de açúcar e uma aglicona (parte não glicídica), que neste caso é chamada de antocianidina. No suco de frutas vermelhas/roxas e nos vinhos a atividade de β -glucosidases pode induzir à perda de coloração, pois as antocianinas, responsáveis pela coloração avermelhada nas frutas, são formadas pela adição de um mono ou dissacarídeo às antocianidinas. Normalmente o açúcar das antocianinas é a glucose, e a descoloração é devido à quebra da ligação entre o resíduo de açúcar e a antocianidina que é degradada em compostos incolores (**Figura 5**). Em sucos de uva e vinhos, as principais antocianinas são monoglucosídeos, e BGLs podem induzir à perda de cor através da hidrólise do açúcar (Palmeri *et al.*, 2007; Vernocchi *et al.*, 2015).

Figura 5. Esquema do mecanismo de ação das BGLs sobre as antocianinas. A BGL é capaz de hidrolisar a ligação indicada pela seta presente na antocianina (coloração roxa/avermelhada), liberando uma antocianidina (incolor) e um glucosídeo. No esquema a antocianina representada é a cianidina 3-glucosídeo.

Em indústrias de sucos de frutas, particularmente, BGLs são utilizadas em processos de maceração ou liquefação, participando da degradação da celulose e da liberação de aromas através da hidrólise de precursores glicosilados. Entretanto, a presença destas enzimas em preparações enzimáticas pode induzir a perda da cor de sucos de frutas vermelhas quando da hidrólise de antocianidinas glicosiladas em antocianidinas instáveis (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998). Assim, um dos desafios no melhoramento de preparações enzimáticas utilizadas no processamento de frutas vermelhas, particularmente para produção de vinhos tintos e sucos, é a obtenção de preparações enzimáticas contendo BGLs ativas sobre substratos-alvo, como celobiose e terpenil- β -D-glucosídeos, mas com baixo efeito descorante (Le Traon-Masson & Pellerin, 1998; Manzanares *et al.*, 2000; Palmeri *et al.*, 2007; Barbagallo *et al.*, 2007; Vernocchi *et al.*, 2015).

Por outro lado, BGLs que hidrolisam antocianinas podem ser utilizadas na produção de vinhos brancos com reduzida coloração vermelha, ou na produção de vinhos rosados a partir de variedades de uvas tintas, onde o processo de maceração pode ser prolongado, e o excesso de cor removido através de tratamento enzimático (Sánchez-Torres *et al.*, 1998; Palmeri *et al.*, 2007; Barbagallo *et al.*, 2007; Vernocchi *et al.*, 2015).

1.6. O microrganismo - *Malbranchea pulchella*

Malbranchea pulchella (**Figura 6**) é um fungo frequente como qualquer um dos termófilos mais comuns e foi descrito por volta de 1882. O gênero pertence à classe Ascomycetae e as espécies mesofílicas podem ser patogênicas, mas as espécies termofílicas, como *M. pulchella* var. *sulfurea*, não exibem sinais de patogenicidade (Cooney & Emerson, 1964). Usualmente o fungo é encontrado em fragmento de vegetais em decomposição ou material que tenha celulose, sendo um bom produtor de lipases, trealases (Pereira *et al.*, 2011), xilanases (Masaru Matsuo & Tsuneo Yasui, 1985; Ribeiro *et al.*, 2014), podendo ser considerado promissor para a produção de enzimas de interesse biotecnológico.

Figura 6. Culturas do microrganismo *M. pulchella*. Microrganismo cultivado em meio Emerson sólido, 40 °C por 7 dias. (Fotografia: Lummy Maria Oliveira Monteiro).

1.7. Imobilização enzimática

A catálise enzimática vem ganhando espaço em diversas áreas, como a química fina e farmacêutica, a indústria de alimentos e a produção de bioenergia como, por exemplo, o bioetanol. Para a maioria dessas áreas, a imobilização enzimática pode ser vantajosa, uma vez que permite desde a reutilização de um catalisador relativamente caro através do reuso, até o melhor controle do processo, visto que a reação pode ser interrompida facilmente separando o catalisador do meio reacional (Mateo *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013). Adicionalmente, a imobilização enzimática pode melhorar propriedades, como a atividade, estabilidade, seletividade e diminuição da inibição pelo produto formado (Mateo *et al.*, 2007).

Existem diversas técnicas de imobilização, como a simples adsorção em suportes porosos, interações químicas relativamente fracas, imobilização por ligação covalente unipontual ou multipontual, etc (Guisan, 2006).

A imobilização de proteínas pode produzir de alguma forma, algumas distorções no sítio ativo de enzimas, causado pela redução da mobilidade da proteína. Além disso, em enzimas que sofrem grandes mudanças conformacionais durante a catálise, a imobilização pode gerar biocatalisadores com propriedades catalíticas muito distintas. Nessa perspectiva, diferentes protocolos de imobilização podem ser desenvolvidos para uma mesma enzima, gerando catalisadores mais específicos para a reação desejada, de

modo a modificar ou melhorar a seletividade e as características bioquímicas de uma enzima (Guisan, 2006; Mateo *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013).

1.7.1. Imobilização irreversível por ligação covalente unipontual

A imobilização por ligação covalente é um tipo de imobilização irreversível, na qual as ligações formadas são rígidas e muito estáveis, o que impede completamente a recuperação da enzima na forma nativa (Guisan, 2006; Mateo *et al.*, 2007). A imobilização covalente pode ser do tipo unipontual, como a que ocorre em suporte ativado por brometo de cianogênio (BrCN) ou multipontual, como aquelas que ocorrem em suportes do tipo glioxil agarose e suportes ativados por glutaraldeído. Nesses casos, a ligação ocorre entre os grupos funcionais do suporte e as cadeias laterais dos aminoácidos da superfície da enzima, como os grupos NH_2 das cadeias laterais das lisinas, gerando uma ligação do tipo amida (Srere *et al.*, 1976).

A formação de ligações multipontuais necessita ser realizada em pH muito alcalinos, acima dos pKas dos grupamentos participantes, condição essa muito extrema para muitas enzimas (Guisan *et al.*, 1997), já a imobilização unipontual em suportes ativados com BrCN é comumente usada em condições mais brandas, na qual a imobilização ocorre entre poucos grupos, geralmente apenas entre o grupamento amino terminal da enzima e o suporte (**Figura 7**). Os derivados gerados a partir desse suporte resultam em excelentes modelos para o estudo da enzima uma vez que representam as enzimas em seu estado livre, sem a interferência dos extratos enzimáticos e sem distorções conformacionais (Filice *et al.*, 2011; Guisan *et al.*, 1997).

Figura 7. Imobilização em suporte ativado com brometo de cianogênio. A imobilização ocorre devido à reação da amina terminal da enzima com o suporte ativado. (Adaptado de Hayworth, <<http://www.piercenet.com/method/covalent-immobilization-approaches>> Acesso em: 24/02/2016).

1.7.3. Imobilização reversível

Muitos métodos de imobilização são do tipo reversível. Nesse tipo de imobilização a enzima se liga ao suporte através de ligações fracas, de forma que a enzima pode ser recuperada do suporte por meio de estratégias de dessorção. Existem diversos protocolos de imobilização reversível e o mais antigo e mais utilizado são os ativados com grupos iônicos, como dietilaminoetil (DEAE), carboximetil (CM) e monoamino-N-aminoetil (MANAE), nos quais a enzima se adsorve por interação iônica (Mateo *et al.*, 2006). Na imobilização por interação iônica não é possível prever em qual conformação as enzimas vão prevalecer no derivado, podendo levar a uma ativação na atividade enzimática, por exemplo. Os protocolos de imobilização por interação iônica permitem além da imobilização a purificação, hiperativação e a estabilização da enzima (Mateo *et al.*, 2006; Palomo *et al.*, 2002; Palomo *et al.*, 2006). A **Figura 8** representa um esquema da imobilização por interação iônica em suporte iônico carregado com cargas positivas (**Figura 8A**) e em suporte iônico carregado com cargas negativas (**Figura 8B**).

Outro tipo de imobilização reversível é a imobilização por afinidade. Um exemplo é a resina Con A-Sepharose™ 4B. A Con A Sepharose é uma resina comercial da GE Healthcare Life Sciences, e trata-se da Concanavalina A acoplada a Sepharose 4B (**Figura 9**). A Concanavalina A (ConA) é uma lectina (proteína ligadora de carboidratos) extraída originalmente do "jack-bean" (ou feijão-de-porco), *Canavalia ensiformis*. É uma metaloproteína tetramérica que se liga especificamente a certas estruturas encontradas em diversos açúcares, glicoproteínas e glicolipídeos, principalmente grupos α -D-manosil e α -D-glicosil internos e não redutores (Goldstein, 2012; Summer, 1938). O açúcar de ligação requer a presença de grupos hidroxil C-3, C-4 e C-5 para que a reação com Con A aconteça.

Apesar das vantagens oferecidas pela técnica de imobilização, não são encontrados muitos trabalhos de BGLs imobilizadas em qualquer suporte químico.

Figura 8. Representação esquemática da imobilização reversível de uma enzima em (A) Suporte carregado positivamente e em (B) negativamente.

Figura 9. Representação esquemática da imobilização reversível de uma enzima em suporte de afinidade Concanavalina A (Con A-SepharoseTM 4B). (A) No esquema, a Concanavalina A, que é uma proteína tetramérica, está representada pela forma em cor vermelho, e em formato de estrela de cor azul está representada uma proteína. (B) Através de interações lectina-carboidrato, a Con A interage com a proteína esquemática, e esse mesmo tipo de interação é responsável por manter a Concanavalina A ligada ao suporte.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do projeto foi a caracterização funcional de uma β -glucosidase do fungo *M. pulchella* e sua aplicação na hidrólise de resíduos agroindustriais e de antocianinas.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Purificar uma BGL da família GH3 do fungo *M. pulchella*;
- ✓ Caracterizar bioquimicamente a BGL purificada, quanto às propriedades intrínsecas e cinéticas;
- ✓ Otimizar a produção de BGLs em fermentação submersa por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR);
- ✓ Aplicar o extrato enzimático otimizado na hidrólise de resíduos industriais por meio de um planejamento de mistura;
- ✓ Imobilizar o extrato enzimático em diferentes suportes químicos;
- ✓ Caracterizar os derivados, e aplicá-los na clarificação de vinhos e sucos de uva por meio da hidrólise de antocianinas;

3. Material e Métodos

3.1. Cultivo e manutenção de *Malbranchea pulchella*

A linhagem de *M. pulchella* utilizada nesse estudo está depositada na Coleção de Fungos Filamentosos de Ribeirão Preto, localizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP).

A cepa de *M. pulchella* foi mantida em sílica gel. Para tanto, 1,2 mL de uma suspensão de esporos preparada em 5 mL de solução de leite Molico desnatado (20g/100 mL de água deionizada) foram misturados a 6 g de sílica gel branca 1-4 mm contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca. Esses tubos foram armazenados em refrigerador a -20 °C.

Repiques periódicos de *M. pulchella* foram feitos a partir dessa sílica em meio Emerson sólido (Anexo I) o qual foi anteriormente autoclavado (1,5 atm, 120 °C, por 20 minutos) e posteriormente vertidos em placas Petri descartáveis. Os repiques foram mantidos a 40 °C por 7 dias para o crescimento micelial.

3.2. Otimização da produção enzimática

Todos os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio de cultivo. Para isto foi inoculado 1 mL de suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ esporos por mL do fungo, e cultivados por 72 horas, 40 °C e 180 rpm.

3.2.1. Screening entre os meios de cultivo Emerson e Lummy

Um *screening* entre dois meios de cultivo foi realizado, com a finalidade de buscar um meio que melhor se adequasse ao crescimento micelial e à produção da enzima de interesse.

A fonte de carbono indutora de BGLs utilizada nesse experimento foi a celobiose (Sigma Aldrich), e a composição dos meios de cultivo Emerson e Lummy se encontram disponíveis no **Anexo I**.

3.2.2 Screening entre diferentes fontes de carbono

Depois de selecionado o meio de cultivo adequado, um *screening* entre as diferentes fontes de carbono promissoras à produção de BGL foi realizado. As fontes de carbono utilizadas nesse experimento foram: celobiose, farelo de trigo, soja moída,

bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BCAN), carboximetilcelulose (CMC) e avicel. Em todos os experimentos foram utilizados 1% (p/v) da fonte de carbono.

3.2.3. Otimização por delineamento composto central rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 e análise de superfície de resposta, avaliando o efeito da concentração de celobiose e BCAN, que foram as fontes de carbono mais significativas para a produção de BGLs. As demais fontes de carbono anteriormente testadas foram descartadas.

Os níveis das variáveis independentes foram definidos de acordo com um planejamento experimental completo e um conjunto de 12 experimentos foi realizado, quatro (4) dos quais foram repetições dos pontos centrais.

A resposta para as variáveis, onde Y é a atividade de BGLs (U/mL) pode ser aproximada pela equação polinomial (**Equação 1**):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Equação 1.

onde β_0 é a intercepção, β_1 e β_2 são os coeficientes de primeira ordem do modelo, β_{12} é o coeficiente entre produtos, X_1 é a variável celobiose e X_2 é a variável BCAN.

Um teste *t* de Student foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão. O software estatístico Statistica v.13.0 foi usado para analisar os dados experimentais.

3.3. Dosagem de β -glucosidases utilizando p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG) como substrato

A atividade enzimática foi determinada cineticamente através do aumento da absorbância a 405 nm, durante 5 minutos, produzida devido à liberação de p -nitrofenol pela hidrólise de pNPG. A reação foi iniciada com 15 μ L de solução enzimática ou suspensão (derivado em tampão) adicionadas em 10 μ L de tampão McIlvaine (fosfato citrato 100 mM) pH 6,0 e 25 μ L de pNPG (4mM em H₂O).

A reação foi incubada em banho termostático a 50 °C durante 5 minutos e foi interrompida pela adição de 50 µL de solução Na₂CO₃ 0,2 M. Controles com a enzima desnaturada por fervura (extratos escuros) foram incluídos em cada experimento.

A unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um µmol do substrato em um minuto por mL, nas condições de ensaio e a atividade específica é unidade por mg de proteína presente no extrato enzimático (U/mg).

3.3.1. Dosagem de enzimas do complexo lignocelulolítico

O extrato bruto otimizado por DCCR foi avaliado quanto à presença das enzimas: CMCase, avicelases, FPases, xilanases, pectinases, amilases, arabinofuranosidases, celobiohidrolases, β-xilosidases, arabinanases, lacases, β-glucosidase, β-glucanases, mananases, lipases. As condições para cada uma das reações estão na **Tabela 1**. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados a 50 °C e em tampão McIlvaine 100 mM, pH 6,0.

As enzimas CMCase, avicelases, FPases, xilanases, pectinases, amilases, arabinanases, β-glucanases e mananases, foram dosadas a partir de seus substratos naturais. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto por mL, nas condições do ensaio. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). As misturas – ensaio enzimático adicionado de DNS – foram fervidas a 100 °C por 5 minutos, após resfriamento dos tubos foi adicionado 1 mL de água destilada a cada mistura e uma alíquota de 100 µL foi retirada para a leitura em leitor de microplacas a λ 540 nm.

A lacase foi dosada a partir do substrato siringaldazina. A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de extrato bruto, 0,1 mL de tampão McIlvaine pH 6,0, 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de siringaldazina (0,1% em etanol). A oxidação da siringaldazina ($\epsilon_{525} = 65.000/\text{Mcm}$) até quinona foi acompanhada durante 10 min a 525 nm (SZKLARZ *et al.*, 1984, modificado).

As enzimas β-glucosidases, β-xilosidases, arabinofuranosidases, lipases e celobiohidrolases, foram dosadas a partir de substratos artificiais. A unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um µmol do substrato

em um minuto por mL. As reações foram incubadas em banho termostático a 50 °C durante 5 minutos e foram interrompidas pela adição de 50 µL de solução Na₂CO₃ 0,2 M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a λ 405 nm.

Controles com as enzimas desnaturadas foram incluídos em cada experimento.

Tabela 1. Resumo das dosagens enzimáticas.

<i>Enzima</i>	<i>Substrato</i>	<i>Concentração de substrato</i>	<i>Volume de substrato (µL)</i>	<i>Tempo de reação (min)</i>	<i>Volume de extrato (µL)</i>	<i>Volume de tampão (µL)</i>
<i>Xilanase</i> ^a	xilana beechwood (madeira de faia)	1%	50	10	50	-
<i>Amilase</i> ^a	amido solúvel de batata Reagen	1 %	50	10	50	-
<i>FPase</i> ^a	papel filtro Whatman n°1 (celulose)	0,044 g/mL	-	60	250	250
<i>CMCase</i> ^a	carboximetilcelulose média viscosidade	1 %	50	60	50	-
<i>Avicelase</i> ^a	avicel (celulose microcristalina)	1 %	50	60	50	-
<i>β-glucanase</i> ^a	β-glucano	1%	25	15	10	-
<i>β-glucosidase</i> ^b	pNPG ¹	4 mM	25	5	10	15
<i>Arabinofuranosidase</i> ^b	pNPA ²	2 mM	25	5	5	20
<i>Celobiohidrolase</i> ^b	pNPC ³	18 mM	25	5	5	20
<i>β-xilosidase</i> ^b	pNPX ⁴	18 mM	25	5	5	20
<i>Arabinanase</i> ^a	Arabinana linear	1%	50	10	50	-
<i>Lipase</i> ^b	pNPP ⁵	8 mM	25	5	10	15
<i>Lacase</i> ^c	Siringaldazina	1% em etanol	100	variado	600	100
<i>Mananase</i> ^a	Locust Bean Gun	0,5%	10	5	5	-
<i>Pectinase</i> ^a	Ácido poligalacturônico	1%	50	10	50	-

^a Enzimas dosadas a partir da metodologia de Miller, 1959

^b Enzimas dosadas a partir de seus substratos artificiais

^c (Szklař et al., 1984)

¹ p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo

² p-nitrofenil-α-L -arabinofuranosídeo

³ p-nitrofenil-β-D-celobiosídeo

⁴ p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo

⁵ p-nitrofenilpalmitato

3.4. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas do extrato enzimático foi quantificada usando *Coomassie Brilliant Blue* G-250 de acordo com a técnica de Bradford (Bradford, 1976). Soroalbumina bovina foi usada como padrão. A absorbância foi obtida em 595 nm e a unidade proteica foi definida como mg de proteína por mL (mg/mL).

3.5. Purificação da BGL

Para a purificação o extrato bruto foi produzido utilizando-se a celobiose 1% (p/v) (Sigma-Aldrich) como fonte de carbono, no meio de cultivo Lummy.

3.5.1. Ultrafiltração tangencial

A primeira etapa de purificação foi uma ultrafiltração tangencial utilizando o Vivaspín™ 20 (GE Healthcare). O extrato bruto (100 mL) foi ultrafiltrado no Vivaspín 20 de 100,000 MWCO, o volume retido foi dosado para a atividade de BGL e para proteínas. O volume que eluiu através do Vivaspín de 100,000 MWCO também foi dosado quanto à atividade de BGL e proteínas, e posteriormente esse volume foi ultrafiltrado no Vivaspín 20 de 50,000 MWCO. Os volumes retidos e eluídos nesta etapa foram dosados para a atividade de BGL e para proteínas.

3.5.2. DEAE-fractogel

A fração que ficou retida no Vivaspín 20 de 50,000 MWCO (10 mL) teve o seu pH ajustado utilizando-se tampão Tris-HCl pH 7,0 100 mM e foi aplicada em DEAE-Fractogel (3x1 cm) que foi previamente equilibrada em tampão Tris-HCl pH 7,0, 25 mM. A resina foi posteriormente lavada com 20 mL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 para a retirada de proteínas que não se ligaram a resina. As proteínas que se ligaram à resina foram desorvidas em um gradiente linear de NaCl (0-1 M) em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e foram coletados 400 µL por fração. As frações coletadas foram dosadas para atividade de BGL e para proteínas a 280 nm. Os tubos que apresentavam atividade foram recolhidos em um único volume.

3.5.3. Gel de eletroforese SDS-PAGE e Zimograma para BGL

O extrato bruto e a proteína purificada foram analisados em géis SDS-PAGE 12% e que foram corados com *Coomassie Blue*. As amostras analisadas foram diluídas em tampão de amostra (glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,002%, Tris 0,12 M, pH 6,75) na presença de 10% de β -mercaptoetanol. As eletroforeses foram realizadas em temperatura ambiente na presença do tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3 sob corrente de 30 mA e 120 V.

Para a confecção dos géis foram utilizadas 100 μ g de proteínas totais de extrato bruto e 20 μ g de proteínas totais para a enzima pura.

Para a confecção do Zimograma uma eletroforese em gel semi-desnaturante foi realizada. O tampão de amostra sem adição de β -mercaptoetanol, foi o glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,002%, Tris 0,12 M, pH 6,75 e a amostra não foi fervida. A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C na presença do tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3 sob corrente de 30 mA e 120 V. Após a eletroforese, o gel foi embebido em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 por 10 minutos a temperatura ambiente, e em seguida, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 0,2 M contendo 0,1% (p/v) de esculina (Sigma) e 0,03% (p/v) de cloreto férrico a 50 °C até o aparecimento de bandas escuras correspondentes à atividade de BGL. A reação foi interrompida pela imersão do gel em uma solução 10% (p/v) de glucose.

3.5.4. Identificação por espectrometria de massas

A banda proteica obtida no gel SDS-PAGE foi recortada, e enviada ao Professor Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), da Universidade de São Paulo (USP), onde foi digerida com adição de 0,5 μ g de tripsina (Promega) + 17 μ L de tampão bicarbonato de amônio 0,1M pH 8,0. Depois da digestão os peptídeos foram aplicados em coluna de fase reversa Poros 50 R2 (PerSeptive Biosystems). Os peptídeos purificados foram hidratados em 6 μ L de solução matriz (5 mg mL⁻¹ α -ciano-4-hidroxicinnaminic acid em 50% de acetronitrila e 0,1% de ácido trifluoracético (v/v)). Desta hidratação 2 μ L de cada amostra foram aplicados na placa de MALDI-TOF/TOF

(Axima Performace, Kratos-Shimadzu, Manchester, UK). Os MS/MS obtidos foram analisados utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e o banco de dados NCBI nr/fungi.

3.5.5. Dicroísmo circular

Para a análise da estrutura secundária da BGL em estudo, foi utilizado o espectropolarímetro Jasco 810 (JASCO Inc., Tokyo, Japan) nos comprimentos de onda de 190 a 250 nm (UV distante). Uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 mm foi utilizada. A amostra proteica estava em tampão fosfato de sódio pH 7,0, 10 mM, e estava na concentração aproximada de 0,1 mg/mL e foram coletados um total de 12 espectros. O experimento foi realizado e analisado sob orientação do Professor Dr. Richard John Ward, do Departamento de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), no Departamento de Química da Universidade de São Paulo (USP).

3.5.6. Modelagem

Foi realizada a modelagem computacional da BGL purificada de *M. pulchella* de acordo com sua estrutura primária predita utilizando a ferramenta online Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015).

3.5.7. Análise do grau de glicosilação da BGL

A enzima purificada foi deglicosilada utilizando a endoglucanase PNGase F (Sigma Aldrich). Em aproximadamente 5 µg (15 µL) de BGL foram adicionados 5 µL de tampão de reação 5X e 1,25 µL de solução de desnaturação que foram misturados gentilmente e incubados por 5 minutos a 100 °C. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 1,25 µL de solução TRITON X-100 e 0,5 µL da enzima PNGase F, que também foram misturados gentilmente e a mistura foi incubada a 37 °C por 3 horas. O produto dessa reação foi verificado por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12 %, corado com *Coomassie Blue*.

3.5.8. Determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a BGL purificada

Os parâmetros cinéticos da BGL foram avaliados para o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG) nas concentrações finais 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7,5 e 10 mM. K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram analisados através dos softwares SigrafW, GraphPad Prism5 e Origin 8. Foi calculado também o valor de K_{cat} .

3.6. Imobilização de BGLs em diferentes suportes

Todos os experimentos de imobilização foram realizados utilizando o extrato bruto de BGLs produzido a partir do melhor resultado encontrado no DCCR. Esse extrato foi previamente precipitado com sulfato de amônio 70 %, suspenso em 1 mL de tampão Tris-HCl 25 mM e NaCl 100 mM e eluído em Bio-Gel P-100 (20 cm x 2 cm). Posteriormente, os tubos coletados que apresentavam atividade para BGL foram reunidos em um único volume e dialisados em água Milli-Q a 4 °C, para a remoção de interferentes presentes no tampão de eluição. Em seguida, o *pool* foi equilibrado com tampão fosfato de sódio 10 mM e pH 7,0.

3.6.1. Imobilização em suporte BrCN-Sepharose (BrCN-Seph) ativado

O BrCN-Seph (Amersham Biosciences) foi primeiramente ativado, o que é feito com água destilada acidificada com HCl até que fique com pH em torno de 2,0 - 3,0. Para 1 g de BrCN-Seph seco foram adicionados 50 mL de água ácida, incubados durante 90 minutos, a 25 °C, sob agitação constante conforme indicações do fabricante. Em seguida, o BrCN-Seph ativado foi filtrado e imediatamente utilizado.

Para a imobilização foi adicionado 1 g de BrCN-Seph ativado a 10 mL de extrato bruto de BGLs. Essa suspensão foi submetida à agitação suave e constante com agitador mecânico de rolos, por 20 minutos, a 4 °C, pH 7,0, de forma a reduzir a possibilidade de formação de ligação covalente multipontual entre a enzima e o suporte (Mateo *et al.*, 2005). Posteriormente, a amostra foi filtrada, lavada e incubada com solução de etanolamina 1 M, pH 8,0, durante 1 hora para que os grupos ativados remanescentes fossem bloqueados. Em seguida, o derivado foi filtrado e lavado com água destilada.

3.6.2. Preparo do suporte MANAE agarose

O suporte MANAE agarose foi preparado a partir do suporte Glioxil agarose. Para se preparar um suporte glioxil é necessário partir de gel agarose e ativá-lo com grupos aldeído para então formar o gel glioxil agarose. Dessa forma, a preparação se deu em duas partes: ativação do gel e oxidação a aldeídos.

No primeiro passo, para a ativação do gel, 105 g de agarose 4BCL, previamente lavada com água destilada, foram adicionadas a 30 mL de água destilada. A esta mescla, em banho de gelo, foi adicionado NaOH 1,7 N e 1,425 g de NaBH₄. Em seguida, 36 mL de glicidol foram adicionados gota a gota – para que não ocorresse aumento de temperatura. A mistura foi submetida à agitação com agitador de pás durante uma noite e, posteriormente, lavada abundantemente com água. O resultado é a agarose ativada com grupos dióis.

Em seguida, os dióis foram oxidados a aldeído, com periodato de sódio, onde cada 1 μ mol de NaIO₄ oxida 1 μ mol de hidroxila livre do gel. Assim, aos 105 g de gel ativado adicionou-se 150 mL de NaIO₄ 100 mM. A solução foi então suspensa em 1:10 de água destilada e agitada com agitador de pás durante cerca de 2 horas. Após esse período o suporte foi lavado abundantemente com água, filtrado e estocado a 4 °C para uso.

Para a preparação do MANAE agarose, 10 g de glioxil agarose foram adicionados a 140 mL de solução de etilenodiamina 2 M, pH 10,0. Essa mistura foi mantida sob agitação suave em agitador de pás durante 2 horas. Após esse período, adicionou-se 10 mg/mL de NaBH₄ e a agitação foi mantida por mais 2 horas. Em seguida, a suspensão foi lavada abundantemente com solução de NaCl 0,5M para eliminação de NaBH₄ e depois com água destilada.

3.6.3. Imobilização reversível de BGL em MANAE agarose (suporte de interação iônica)

A imobilização em suporte iônico foi realizada em MANAE Agarose, previamente preparado. A cada 1 g de suporte foram adicionados 10 mL de extrato de BGLs em tampão fosfato sódio 10 mM, pH 7,0. A mistura foi mantida a 4 °C, sob agitação suave em agitador mecânico de rolos. Periodicamente, foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante, as quais foram dosadas a atividade

enzimática até estabilização da imobilização. Como controle foi utilizado um branco com solução enzimática sem suporte para avaliar possíveis perdas de atividade com o processo. Uma vez adsorvida a enzima, os suportes foram lavados abundantemente com água destilada, filtrados e estocados a 4 °C. Os derivados obtidos foram avaliados quanto à eficiência de imobilização, estabilidade a temperatura e ao pH e quanto a capacidade de reuso.

3.6.4. Imobilização reversível de BGL em Con A-Sepharose™ 4B (afinidade)

A imobilização em suporte de afinidade foi realizada em Con A-Sepharose™ 4B. A cada 5 g de suporte foram adicionados 10 mL de extrato de BGLs em tampão fosfato sódio 10 mM, pH 7,0. A mistura foi mantida a 4 °C, sob agitação suave em agitador mecânico de rolos por 30 minutos. Como controle foi utilizado um branco com solução enzimática sem suporte para avaliar possíveis perdas de atividade com o processo. Uma vez adsorvida a enzima, os suportes foram lavados abundantemente com água destilada, filtrados e estocados a 4 °C. Os derivados obtidos foram avaliados quanto à eficiência de imobilização, estabilidade a temperatura e ao pH e quanto a capacidade de reuso.

Para manter as características de ligação de Con A, a presença de Mn^{2+} e Ca^{2+} são essenciais. Estes íons já estão presentes em grande excesso na resina fornecida comercialmente.

3.6.5. Teste de reuso dos derivados em diferentes suportes de imobilização

Os derivados foram testados quanto à sua capacidade de reutilização. Eles foram previamente lavados com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7, e utilizado para a reação enzimática com pNPG. Para o teste foram utilizados 100 mg dos derivados MANAE agarose e Concanavalina A (Con A). A reação foi realizada a partir da adição de 250 µL de pNPG 4 mM e 250 µL de tampão McIlvaine pH 6 aos 100 mg de cada derivado, por 5 minutos à 50 °C. Após cada reação de hidrólise de pNPG, os derivados foram lavados com o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7 e o processo de hidrólise reiniciado.

3.7. Caracterização enzimática

3.7.1. Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática ou derivado

Para determinar o efeito das variáveis temperatura e pH sobre a reação enzimática da enzima purificada, a reação de hidrólise do pNPG foi realizada primeiramente utilizando 15 µL de enzima ou suspensão do derivado, 10 µL de tampão McIlvaine pH 6 e 25 µL de pNPG 4 mM, variando a temperatura de reação. As temperaturas de reação utilizadas para a BGL e para os derivados variaram de 30 °C a 80 °C.

Em seguida, o efeito da variável pH na reação enzimática, foi avaliado com diferentes tampões, em diferentes pH, com a temperatura fixa de 50 °C para a reação. O tampão utilizado foi McIlvaine na faixa de pH 2,0 a 8,0.

3.7.2. Inativação térmica e estabilidade ao pH da atividade enzimática ou derivado

A inativação térmica foi avaliada para as temperaturas de 40 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C para a enzima purificada, 40 °C, 50 °C e 60 °C para os derivados BGL-MANAE e BGL-BrCN e para as temperaturas 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C para o derivado BGL-ConA. Os derivados foram mantidos em suspensão em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, e a enzima purificada foi mantida em tampão McIlvaine pH 6,0, livres de substrato e em banhos termostáticos, nas temperaturas e tempos pré-determinados para o processamento da reação. Após o período de incubação, os derivados e a enzima purificada foram utilizadas para a dosagem enzimática.

A estabilidade ao pH foi avaliada a 25 °C, em tempos pré-determinados de incubação em diferentes tampões com pH de 2-11 para os derivados e pH de 2-10 para a enzima purificada. A enzima purificada foi previamente dialisada. Ambos foram mantidos livre de substrato. Após o período de incubação, os derivados e a enzima purificada foram utilizadas para a dosagem enzimática. Os tampões utilizados foram: McIlvaine (pH de 2-8) e glicina 50 mM (pH de 9-11).

Em ambos os experimentos os resultados foram expressos em Atividade Residual (%) e 100 % foi o valor da atividade enzimática antes de iniciado os períodos de incubação.

3.7.3. Influência de compostos iônicos, EDTA e β -mercaptoetanol na atividade enzimática

Com o intuito de avaliar quais compostos iônicos influenciam na atividade enzimática, os diferentes íons metálicos foram testados na BGL purificada: NH_4F , NaH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , CaCl_2 , $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaBr , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , FeCl_3 , HgCl_2 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , KH_2PO_4 , BaCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. O efeito do EDTA e do β -mercaptoetanol também foi avaliado.

A concentração final de cada composto testado foi 10 mM, acrescentados à reação. A amostra controle foi aquela dosada na ausência dos compostos testados. Para esse experimento a enzima foi dialisada. As reações enzimáticas foram realizadas conforme o item 3.3 desta seção.

3.7.4. Efeito de glucose e etanol na atividade enzimática ou derivado

Com o intuito de avaliar a influência de glucose e etanol na atividade enzimática, foram acrescentadas à enzima purificada, bem como os derivados (BGL-MANAE, BGL-ConA, BGL-BrCN), diferentes concentrações de glucose e etanol. As reações enzimáticas foram realizadas conforme o item 3.3 desta seção, em tempos pré-determinados.

As concentrações finais de glucose testadas para a enzima purificada e para o derivado foram de 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M e 1 M. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição da glucose.

As concentrações finais de etanol testadas para a enzima purificada e para o derivado foram de 5 %, 10 % e 15 %. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição do etanol.

3.8. Aplicação do extrato bruto e da BGL imobilizada

O planejamento de mistura para a hidrólise de BCAN, casca de soja moída e bagaço de cevada (BCev) foi realizado com o extrato bruto. Os ensaios de clarificação do vinho tinto e do suco de uva foram realizados com os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA.

3.8.1. Planejamento de mistura

Foi realizado um planejamento de mistura com os resíduos BCAN, casca de soja moída e bagaço de cevada (BCev), com a finalidade de determinar em qual resíduo o extrato enzimático age de forma mais eficiente.

O planejamento de mistura de 3 componentes (BCAN, casca de soja moída e BCev) e duas repetições no ponto central, foram usadas para avaliar o efeito da interação da mistura de três substratos na obtenção de monossacarídeos pela ação do extrato bruto otimizado pelo DCCR. Cada reação foi composta por 50 mg dos resíduos, cuja composição está detalhada na **Tabela 2** e 5 mL de extrato bruto tamponado em McIlvaine, pH 6,0. A cada reação foi acrescentada azida de sódio 15 mM para evitar a contaminação bacteriana. A hidrólise foi realizada a 50 ° C a 700 rpm em banho seco com agitação. Alíquotas de 600 µL foram retiradas no tempo zero, 3, 6, 24 e 48 horas e imediatamente fervidas durante 5 minutos para inativar as enzimas e, em seguida, congeladas para futura dosagem de açúcares redutores. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS (Miller, 1959).

Modelos adequados para o planejamento de mistura constituída por três componentes incluem modelos cúbicos, linear, quadrático e especiais (Moldes *et al.*, 2007). Os modelos para o caso das três variáveis foram:

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3$$

Equação 2. Modelo linear

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

Equação 3. Modelo quadrático

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

Equação 4. Modelo cúbico especial

onde Y é a variável dependente, b_i ($i = 1, 2, 3$) são os coeficientes de regressão (calculados a partir de dados experimentais) e x_i ($i = 1, 2, 3$) são as variáveis independentes.

Cada parâmetro foi apresentado pelo modelo que contribui para explicar a variabilidade. O modelo matemático de melhor ajuste foi selecionado com base nas comparações de parâmetros estatísticos, como o coeficiente de determinação (R^2), e o valor de F , fornecidos por análise da variância. O modelo mais significativo foi usado para traçar a superfície de resposta no gráfico ternário para cada parâmetro. O *software* estatístico Statistica v.13.0 (Statsoft, EUA) foi usado para analisar os dados experimentais de regressão e análise gráfica dos dados obtidos.

As composições dos resíduos utilizados no planejamento de mistura estão detalhadas na **Tabela 3**. O BCAN e o BCev foram analisados, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo, pela Professora Dra. Carem Gledes Vargas Rechia. A análise da composição bromatológica da casca de soja moída foi realizada no Laboratório de Química Tecnológica - DPPG no Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro (Marco, 2014).

Tabela 2. Ensaios utilizados na construção do planejamento de mistura

Ponto	Concentração do resíduo na reação de hidrólise (%)		
	BCAN*	Casca de soja moída*	BCev*
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33,3	33,3	33,3
8	33,3	33,3	33,3
9	33,3	33,3	33,3
10	66,6	33,3	0
11	66,6	33,3	0
12	66,6	33,3	0

*Composição descrita na tabela 3

3.8.1.2. TLC do produto de hidrólise do planejamento de mistura

Os produtos formados pela hidrólise dos resíduos utilizados com o extrato bruto foram analisados em cromatografia de camada delgada (TLC-Merck 25 *aluminium sheets* 20 x 20 cm sílica gel 60). Foram aplicados 10 µL do produto de reação que apresentou maior quantidade de açúcar redutor, nos tempos 0 h, 3 h, 6 h, 24 h e 48 h e também 1 µL de padrão contendo glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose (0,1% p/v) e 1 µL de padrão contendo xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose (0,1% p/v). A placa foi então inserida em uma cuba de vidro contendo solução n-butanol, etanol e água destilada (5:3:2). A corrida foi realizada uma vez. Para a revelação a placa foi borrifada com uma solução contendo 18 mL de metanol, 2 mL de ácido sulfúrico (P.A.) e 0,04 g de orcinol e então foi levada em estufa de 100 °C por aproximadamente 2 minutos (até o aparecimento das bandas).

Tabela 3. Composição dos resíduos utilizados no planejamento de mistura.

Resíduo	Ligno/Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Pectina (%)	Amido (%)
<i>BCAN</i>	28	29,6 ±1,4	11,2	-
<i>Casca de soja moída</i>	61	50,3	-	-
<i>BCev</i>	38,5	39,7	31,7	0,6

3.8.2. Clarificação do suco de uva e de vinho tinto

Para o preparo do suco de uva foram utilizados 100 g de uva orgânica *Vitis labrusca*, conhecida popularmente por uva niagara rosada (**Figura 10A**). As uvas foram esmagadas manualmente, transferidas para um béquer que foi colocado a 70 °C em banho termostático e maceradas com agitador de pás por 10 min. Ao suco obtido foi adicionado o mesmo volume de água destilada. O suco foi então filtrado em papel Whatman nº 2 e submetidos a leituras de absorbância a 520 nm, utilizando um leitor de microplacas (Sánchez-Torres *et al.*, 1998), o pH do suco foi 3,7.

Figura 10. Uva e Vinho utilizados no experimento de clarificação. **(A)** Cultivo caseiro da uva orgânica *Vitis labrusca* utilizada no experimento. (Foto tirada por Juliana da C. Infante de Marco, 2016); **(B)** Vinho Adega Pias Tinto.

O vinho utilizado foi o Adega de Pias Tinto (**Figura 10B**), classificado como vinho regional Alentejano, produzido a partir das castas Aragonez, Trincadeira e Alfrocheiro, com teor alcoólico 13,28% e pH 3,73.

O suco de uva e o vinho tinto foram diluídos em água destilada (1:1) para a realização do teste, além de terem sido utilizados concentrados.

Foram adicionados 50 mg dos derivados BGL-MANAE e BGL-ConA em alíquotas de 2 mL de vinho tinto, vinho tinto diluído (1:1), suco de uva e suco de uva diluído (1:1). As soluções foram colocadas em banho seco a 50 °C com agitação 1000 rpm por 8 horas. Dois controles para o experimento foram realizados. O controle 1 foi realizado sem adição de derivados aos sucos e aos vinhos, porém mantidos a 50 °C e o controle 2 foi realizado com a adição de 50 mg do suporte MANAE agarose e Concanavalina A sem enzimas imobilizadas aos sucos e vinhos, e este controle foi mantido a 50 °C e 1000 rpm. Depois das 8 horas as suspensões (Vinho ou suco de uva mais o derivado testado) foram filtrados e a absorbância do filtrado foi quantificada em leitor de microplacas 520 nm (Sánchez-Torres *et al.*, 1998). O experimento foi realizado em duplicada.

3.9. Reprodutibilidade dos experimentos

Os experimentos, quando possível, foram conduzidos em triplicata e a média e desvio padrão dos valores foram reportados.

4. Resultados

*Os resultados deste trabalho foram subdivididos em três capítulos. Inicialmente, estudou-se uma BGL da família GH3 produzida pelo fungo *M. pulchella*. A enzima foi caracterizada quanto às propriedades estruturais e cinéticas, e estes resultados estão disponíveis no capítulo I. Entretanto, visando uma melhor produção da enzima e possibilitando aplicações industriais, a otimização da produção enzimática se fez necessária, e este resultado pode ser encontrado no capítulo II. Finalmente, visando o aumento da estabilidade enzimática, bem como a capacidade do reuso, imobilizaram-se as BGLs, que foram estudadas e utilizadas na hidrólise de antocianinas. Estes resultados encontram-se nos capítulo III.*

Capítulo I

*Produção, purificação e caracterização de uma
 β -glucosidase da família GH3 de Malbranchea
pulchella*

4.1.1. Purificação da BGL

Para a purificação da BGL o extrato bruto foi produzido utilizando a celobiose 1% como fonte de carbono indutora da produção enzimática, em meio de cultivo Lummy. A primeira etapa de purificação foi uma ultrafiltração tangencial utilizando o Vivaspín™ 20 (GE Healthcare) de 100,000 e 50,000 MWCO, como descrito no item **3.5.1**. A amostra resultante, com volume final de 30 mL, foi aplicada em resina DEAE-Fractogel (3x1 cm), conforme descrito no item **3.5.2**. As proteínas que se ligaram à resina foram dessorvidas em um gradiente linear de NaCl (0-1 M) em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e foram coletados 400 µL por tubo. Os tubos coletados foram dosados para atividade de BGL e para leitura de absorbância em 280 nm. As frações que apresentaram atividade de BGL foram recolhidas em um único volume.

Pode-se observar pela **Figura 11** que em pH 7,0 a BGL se liga a resina DEAE-Fractogel, previamente equilibrada e é eluída com o aumento da força iônica, para uma concentração de NaCl de aproximadamente 0,25 M (**Figura 11**). A BGL após ter sido eluída da resina DEAE-Fractogel foi purificada com um fator de purificação 6,32 e recuperação de aproximadamente 35% (**Tabela 4**).

Apenas a etapa de lavagem e de dessorção estão representadas na **Figura 11**.

Tabela 4. Purificação de uma BGL de *M. pulchella*.

<i>Etapa</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Atividade (U/mL)</i>	<i>Atividade Total (U)</i>	<i>Proteína (mg/mL)</i>	<i>Atividade específica (U/mg)</i>	<i>Fator de Purificação</i>	<i>Recuperação (%)</i>
<i>Extrato bruto extracelular</i>	100	0,2	20,0	0,129	1,55	1	100
<i>Fração menor que 100 kDa e maior que 50 kDa</i> <i>Ultrafiltração tangencial</i>	30	0,5	15	0,089	5,62	3,63	75
<i>DEAE-fractogel</i>	14,4	0,49	7,056	0,05	9,8	6,32	35,28

^a Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio estabelecidas.

Figura 11. Perfil cromatográfico da purificação de BGLs *M. pulchella* em Fractogel® EMD DEAE. A fração menor que 100 kDa e maior que 50 kDa (10 mL) obtida por meio da ultrafiltração tangencial em Vivaspin™ 20 (GE Healthcare) foi aplicada em DEAE-Fractogel. A resina foi posteriormente lavada com 20 mL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 e as proteínas que interagiram com a resina foram dessorvidas em um gradiente linear de NaCl (0-1 M) (Em vermelho). As frações coletadas foram de 400 µL por tubo. Todos os tubos coletados foram dosados para atividade de BGL e para proteínas em 280 nm. Pontos em preto se referem à absorbância a 280 nm, e quadrados em azul se referem à atividade de BGL.

4.1.1.1. SDS-PAGE e Zimograma da BGL purificada

Após o processo cromatográfico, as frações que apresentaram atividade foram reunidas em um único volume, e esse foi submetido à análise eletroforética em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (**Figura 12**), podendo-se observar apenas uma banda proteica de aproximadamente 100 kDa, sugerindo que a enzima estava pura. Além disso, um Zimograma foi realizado segundo o item **3.5.3** comprovando, através da hidrólise da esculina, que a enzima purificada tinha atividade de BGL.

Figura 12. Eletroforese em condições desnaturantes da BGL purificada e Zimograma em condições semi-desnaturante para a BGL produzida por *M. pulchella*. **(A)** Corada com *Coomassie Blue* (gel 12%), em (1) Marcador molecular Dual Color Standards (BIO-RAD), em (2) Extrato bruto produzido por *M. pulchella*, em (3) BGL purificada. **(B)** Zimograma realizado segundo o item 3.5.3. (Gel 12%), em (4) Banda escura referente à atividade de BGL.

4.1.1.2. Identificação por espectrometria de massas

A banda proteica obtida no gel SDS-PAGE foi recortada e identificada por espectrometria de massas, como descrito no item 3.5.4. Os MS/MS obtidos foram analisados utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e o banco de dados NCBI nr/fungi. Os peptídeos **HYILNEQEHR** e **VNDFVNVQR** foram identificados com *score* de 90, para uma BGL da família GH3 de *Aspergillus fumigatus* Af293 (**Anexo III**), com massa 94,7 kDa e pI calculado de 5.01. Podemos concluir portando que a banda proteica identificada, corresponde a uma BGL.

O genoma do fungo *M. pulchella*, ainda não está disponível em bancos de dados. Entretanto as sequências das BGLs extracelulares produzidas pelo mesmo nos foram disponibilizadas cordialmente pelo Professor Dr. Rolf A. Prade, do departamento de Microbiologia e Genética Molecular, Universidade de Oklahoma, USA. Entre as sequências cedidas, uma GH3 de 90,34 kDa e pI teórico de 5.03 foi analisada e o peptídeo **HYILNEQEHR** pode ser identificado na mesma. Desta forma concluímos

que a BGL purificada é uma BGL da família GH3, e essa sequência foi utilizada para a análise do Dicroísmo circular e da modelagem.

4.1.1.3. Dicroísmo circular

O espectro de CD de *Far-UV* da enzima purificada é apresentado na **Figura 13**. A BGL apresenta três picos principais, um positivo a 194 nm e os outros dois negativos em 207 e 222 nm, que são característicos de proteínas que apresentam tanto α -hélice e folhas β , como todas as α/β hidrolases. O Dicroísmo circular estimou em 25% α -hélice, e 20% folha β . Por meio de buscas em bancos de dados, uma GH3 do fungo *A. oryzae* teve 61% de identidade com os resultados encontrados para a GH3 de *M. pulchella*.

Figura 13. Espectro de dicroísmo circular de *Far-UV* da BGL purificada.

4.1.1.4. Modelagem da BGL purificada

A modelagem da enzima foi realizada por homologia a partir da estrutura primária de *M. pulchella*, que foi então baseada na estrutura da beta-glucosidase 1 de *Aspergillus aculeatus* considerada a mais ajustada. Foi possível obter uma cobertura de 95% com 100% de confiabilidade (**Figura 14**).

Figura 14. Modelo computacional para a beta-glucosidase 1 de *Aspergillus aculeatus*.

A beta-glucosidase 1 de *Aspergillus aculeatus* (22% de α -hélice e 19% de folhas β), obteve 47% de identidade com a BGL com a de *M. pulchella* e as sequências foram alinhadas, podendo-se observar a qualidade do alinhamento através das estruturas secundárias conservadas (**Figura 15**). O alinhamento da beta-glucosidase 1 de *Aspergillus aculeatus* com a BGL de *M. pulchella* encontra-se no **Anexo IV**.

Figura 15. Alinhamento da beta-glucosidase 1 de *Aspergillus aculeatus* com a BGL de *M. pulchella*. Em vermelho estão as regiões de inserção relativas ao template, e em laranja estão as regiões de deleções relativas ao template. α -hélices estão representadas em verde, e folhas β em azul.

4.1.1.5. Análise do grau de glicosilação da BGL

Para avaliar a presença de glicosilação e o tamanho aproximado da cadeia de polipeptídeo de BGL, esta foi deglicosilada com a enzima PNGase F. Após a deglicosilação, aplicou-se a amostra em um gel de poliacrilamida, submetendo-a a eletroforese (**Figura 16**). A massa molecular calculada da enzima deglicosilada foi calculada em 87,1 kDa, valor muito próximo ao calculado pelo software Compute *pI/Mw* (90,36 kDa). A enzima glicosilada tem massa molecular estimada em 102 kDa. Dessa forma, a glicosilação corresponde a 15% da massa molecular da enzima.

A análise da sequência da BGL pelas ferramentas NetNGlyc 1.0 e NetOGlyc 3.1 revelou 10 potenciais sítios de N-glicosilação e dois de O-glicosilação (**Figura 17**).

Figura 16. Efeito da deglicosilação na massa molecular de BGL. (A) eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % da BGL glicosilada (BGL g) e deglicosilada (BGL d), corado com *Coomassie* Blue; (B) Determinação das massas moleculares da BGL glicosilada em SDS-PAGE. M-Marcador de massa molecular. A banda abaixo da BGL deglicosilada é referente a enzima PNGase F.

Figura 17. Predição dos sítios de glicosilação presentes na BGL. (A) N-glicosilação; (B) O-glicosilação.

4.1.1.6. Determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ e k_{cat} da BGL purificada

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da BGL purificada foram avaliados para o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG) através dos *softwares* SigrafW (Leone *et al.*, 2005), GraphPad Prism5 – utilizando a plotagem de Michaelis-Menten – e Origin 8 – utilizando a representação gráfica Hanes-Woolf (**Figura 18**). Foi calculado também o valor de K_{cat} .

Figura 18. Representação gráfica das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da BGL purificada a partir dos gráficos obtidos nos *softwares* (A) Origin8; (B) GraphPad Prism5 e (C) SigrafW.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos encontrados por meio dos diferentes *softwares*.

Parâmetros cinéticos					
$V_{m\acute{a}x} \text{ (U/mg)}$	$K_m \text{ (mM)}$	$K_m/V_{m\acute{a}x}$	R^2	$K_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Software
13,67	0,33	0,024	0,9992	26,6	SigrafW ^a
14,59	0,36	0,024	0,9682	28,4	GraphPad Prism5 ^b
15,05	0,30	0,020	0,99783	29,3	Origin8 ^c

^a (Leone *et al.*, 2005)

^b plotagem Michaelis-Menten

^c plotagem Hanes-Woolf

4.1.1.7. Efeito da temperatura de reação da BGL purificada

A temperatura ótima da BGL purificada foi determinada por meio de experimentos nos quais as dosagens enzimáticas foram realizadas em diferentes temperaturas variando de 30 à 75°C.

A temperatura ótima da BGL purificada de *M. pulchella* foi de 50°C, nas condições do ensaio, como pode ser observado na **Figura 19**.

Figura 19. Efeito da temperatura de reação da BGL purificada produzida por *M. pulchella*. A atividade de BGL foi determinada conforme descrito no item 3.7.1.

4.1.1.8. Efeito do pH na reação da BGL purificada

Para avaliar o efeito do pH sobre a BGL purificada, foi utilizado o tampão McIlvaine em diferentes pH (pH de 2-8), com a temperatura fixa de 50 °C para a reação enzimática.

A BGL purificada produzida por *M. pulchella* exibiu pH ótimo de 6,0, nas condições do ensaio, como pode ser observado na **Figura 20**.

Figura 20. Efeito do pH na reação da BGL purificada produzida por *M. pulchella*. Os tampões utilizados foram McIlvaine nos pH de 2,0-8,0. A atividade de BGL foi determinada conforme descrito no item 3.7.1.

4.1.1.9. Influência de compostos iônicos, EDTA e β -mercaptoetanol na atividade enzimática

O efeito de alguns íons sobre a atividade da BGL purificada de *M. pulchella* foi investigado, determinando-se a atividade enzimática, em condições de pH e temperatura ótimos.

Pode-se observar pela **Figura 21**, que nenhum desses compostos foi capaz de ativar a BGL purificada, mostrando que essa não deve ser uma metaloenzima. O cloreto de mercúrio inibiu a atividade em aproximadamente 90%, o que pode indicar a presença de sítios tióis próximo ao sítio catalítico.

Figura 21. Influência de íons, EDTA e β-mercaptoetanol sobre a atividade da BGL purificada de *M. pulchella*. A concentração final de cada composto testado foi 10 mM, acrescentados às reações que foram realizadas conforme o item 3.3. A amostra controle foi aquela dosada na ausência dos compostos testados, representada no gráfico como BGL e equivale, portanto aos 100%. Para esse experimento a BGL foi previamente dialisada, e o controle equivale a 0,58 (U/mL).

4.1.1.10. Inativação térmica da BGL purificada

A inativação térmica da BGL purificada foi avaliada para as temperaturas de 40 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C em tempos pré-determinados. Pela **Figura 22** podemos observar que a BGL purificada foi estável por até 24 horas a 40 °C. Na temperatura de 50 °C a enzima permaneceu com aproximadamente 50 % da sua atividade inicial por até 4 horas, entretanto nas temperaturas de 55 °C e 60 °C a BGL perdeu a atividade rapidamente, e em apenas uma hora de incubação, apresentou aproximadamente 35 % e 10 % da sua atividade inicial, respectivamente.

Figura 22. Inativação térmica da BGL purificada produzida por *M. pulchella*. As temperaturas testadas foram 40 °C, 50 °C, 55 °C e 60 °C. A atividade de BGL foi determinada conforme descrito no item 3.3. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0.

4.1.1.11. Estabilidade ao pH na atividade da BGL purificada

A estabilidade ao pH da BGL purificada foi avaliada a 25 °C, em tempos pré-determinados de incubação utilizando diferentes tampões conforme descrito no item 3.7.1. Pela **Figura 23** e **Figura 24** pode-se observar que a BGL purificada manteve os níveis enzimáticos nos pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0, apresentando, respectivamente, 86%, 88%, 97% e 90% da atividade inicial por até 24 horas, respectivamente. Nos pH ácidos 2,0, 3,0 e 4,0 a enzima permaneceu com aproximadamente 80 % da atividade inicial após 1 hora de experimento e nos tempos subsequentes a atividade residual decaiu. Nos pH 9,0 e 10,0 a enzima apresentou 72% e 62% da atividade inicial por até 1 hora, decaindo nos tempos posteriores.

Figura 23. Estabilidade ao pH da BGL purificada nos pH ácidos (2,0-6,0). A atividade de BGL foi determinada conforme descrito no item 3.3. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição dos diferentes tampões.

Figura 24. Estabilidade ao pH da BGL purificada em pH neutro e básicos (7,0-10,0). A atividade de BGL foi determinada conforme descrito no item 3.3. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição dos diferentes tampões.

4.1.1.12. Efeito da glucose na atividade da BGL purificada

Com o intuito de avaliar a influência de glucose na atividade da BGL purificada, foram acrescentadas à reação enzimática, diferentes concentrações de glucose. As reações enzimáticas foram realizadas conforme o item 3.3., em tempos pré-determinados e as concentrações finais de glucose testadas para a enzima purificada foram de 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M e 1 M. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição da glucose.

Na **Figura 25** podemos verificar que a BGL purificada não apresentou inibição em presença de glucose para todas as concentrações testadas, mesmo com 24 horas de incubação.

Figura 25. Influência de Glucose sobre a atividade da BGL purificada de *M. pulchella* com 24 horas de incubação. As concentrações testadas foram 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M e 1 M. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição da glucose. As reações foram realizadas conforme o item 3.3.

Capítulo II

Otimização da produção de β -glucosidases de Malbranchea pulchella por DCCR e aplicação na hidrólise de resíduos industriais por meio de um planejamento de mistura

4.2.1. Otimização da produção de BGLs

4.2.1.1. Screening entre os meios de cultivo Emerson e Lummy

M. pulchella cresceu bem em meio Emerson, porém foi observado que durante o crescimento neste meio o pH inicial variava de 6,0 para 12,0, em 72 horas de cultivo. Desta forma um novo meio tamponado foi formulado, e testado para a produção de BGLs pelo fungo *M. pulchella*. O meio foi intitulado como meio Lummy e a composição está descrita no **Anexo I**. A fonte de carbono indutora utilizada inicialmente foi a celobiose 1% (p/v) e as condições de cultivo foram 40 °C, 180 rpm por 72 horas. O meio Lummy foi proposto, sem que se alterasse demasiadamente a composição do meio Emerson, porém com tamponamento no pH 6,0, a fim de controlar as alterações do pH durante o crescimento do fungo.

O meio Lummy apresentou melhor resultado para a produção de BGLs. O experimento realizado em triplicada mostrou que a produção de BGLs pelo fungo no meio Emerson representou apenas 45% da produção de BGLs no meio Lummy, ambos com 72 horas de cultivo (**Figura 26**). O 100% equivale à maior atividade obtida entre as dosagens.

Figura 26. Atividade de BGLs relativa frente aos meios de cultivo Emerson e Lummy.

4.2.1.2. Screening entre diferentes fontes de carbono

A celobiose mostrou ser um bom indutor da produção de BGLs para o fungo *M. pulchella*, porém, por apresentar um custo elevado, um *screening* entre diferentes fontes de carbono foi realizado. Foram testados o farelo de trigo, a casca de soja moída, o BCAN, o CMC e a avicel, todos na concentração de 1% (p/v) no meio de cultivo Lummy, a 40 °C, 180 rpm por 72 horas.

O resultado está representado na **Figura 27** que mostra a atividade de BGLs relativa tendo como 100% a melhor produção, que foi alcançada quando o cultivo foi induzido por celobiose 1% (p/v). O farelo de trigo produziu 28,4%, a casca de soja moída 21,4%, o BCAN 63,4%, o CMC 22,8% e a avicel 2,4% da atividade enzimática produzida quando a indução foi realizada por celobiose 1% (p/v).

Desta forma, celobiose e BCAN mostraram-se as fontes de carbono mais promissoras para a produção de BGLs no meio de cultivo Lummy nas condições do cultivo.

Figura 27. Atividade de BGLs relativa quando induzida por diferentes fontes de carbono. No gráfico cel = Celobiose, FT = Farelo de trigo, CSM = Casca de soja moída, BCAN = Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, CMC = Carboximetilcelulose, avicel = Avicel. Todas as fontes de carbono foram utilizadas na concentração de 1% (p/v).

4.2.1.3. Otimização do meio de cultivo por delineamento composto central rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta

A celobiose e o BCAN tiveram forte influência na atividade enzimática. Esses dois parâmetros foram investigados de forma conjunta através de planejamentos experimentais. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 . A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos nesse experimento. As análises dos resultados, com p de 0,05, mostraram a celobiose e o BCAN como parâmetros com efeito sobre a atividade enzimática ($R^2=0,9877$). Os melhores resultados podem ser observados nos pontos centrais, com concentrações de 0,6% de celobiose e 4% de BCAN. Observa-se, através do gráfico de Pareto (**Figura 28**), que a celobiose e o BCAN apresentaram apenas efeito quadrático na atividade enzimática.

Tabela 6. DCCR 2^2 para avaliar o efeito da celobiose e do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* sobre a atividade de BGL.

Experimento	Variáveis		Atividade (U/mL)		
	<i>Celobiose</i>	<i>BCAN</i>	<i>Valor experimental</i>	<i>Valor predito</i>	<i>DR</i>
1	0,18 (-1)	2 (-1)	0,25	0,24	0,005
2	1,02 (+1)	2 (-1)	0,17	0,24	0,037
3	0,18 (-1)	6 (+1)	0,24	0,24	0
4	1,02 (+1)	6 (+1)	0,179	0,24	0,030
5	0,0078 (-1,41)	4 (0)	0,27	0,25	0,01
6	1,192 (+1,41)	4 (0)	0,29	0,25	0,02
7	0,6 (0)	1,18 (-1,41)	0,31	0,23	0,04
8	0,6 (0)	6,82 (+1,41)	0,22	0,23	0,005
9	0,6 (0)	4 (0)	0,92	0,91	0,005
10	0,6 (0)	4 (0)	0,91	0,91	0,002
11	0,6 (0)	4 (0)	0,89	0,91	0,009
12	0,6 (0)	4 (0)	0,90	0,91	0,005

Os valores codificados das variáveis estão entre parênteses.

Os melhores resultados obtidos estão em negrito

DR – Desvio Relativo.

Figura 28. Gráfico de Pareto demonstrando o efeito das variáveis celobiose e bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BCAN) sobre a atividade de BGLs. Gráfico obtido por meio do delineamento composto central rotacional.

O modelo reduzido obtido para a atividade enzimática de BGL (U/mL) é expresso na **Equação 5**:

$$Atividade (U/mL) = 0,91 - 0,33 (C)^2 - 0,34 (BC)^2$$

Equação 5.

onde, C e BC correspondem aos valores codificados de celobiose e BCAN, respectivamente. Os valores de atividade preditas através dessa equação estão apresentados na **Tabela 6** e mostram que a equação é preditiva.

A **Tabela 7** apresenta os resultados de ANOVA do modelo reduzido de segunda ordem. O valor de coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9877, e o $F_{calculado}$ foi cerca de 80 vezes maior que o $F_{tabelado}$, o que significa que o modelo é preditivo e estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95%.

Tabela 7. ANOVA calculada para o DCCR sobre o efeito da celobiose e do Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* sobre a atividade de BGL.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F calculado QM_R/QM_r	F tabelado $F_{95\%, GL_R, GL_r}$
Regressão (R)	1,185	2	0,59	347,06	4,26
Resíduo (r)	0,015	9	0,0017		
Total (T)	1,20	11			

$R^2=0,9877$

A **Figura 29** apresenta a superfície de resposta para a atividade de BGL (U/mL) obtida pelo modelo reduzido de segunda ordem. Os resultados demonstram que a maior atividade se dá no centro do gráfico, correspondentes aos pontos centrais 0,6% de celobiose e 4% de BCAN.

Figura 29. Superfície de resposta obtida através do modelo reduzido, calculado a partir de um DCCR, para o efeito da celobiose e do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (BCAN) na produção de BGLs de *M. pulchella*.

4.2.2. Dosagem de enzimas do complexo lignocelulolítico

O fungo *M. pulchella* foi cultivado na condição otimizada encontrada pelo resultado do DCCR 2² para a produção de BGLs, sendo portanto cultivado com 0,6% de celobiose e 4% de BCAN como fontes de carbono indutoras da produção enzimática, em meio de cultivo Lummy a 40 °C, 180 rpm por 72 horas. O extrato bruto obtido foi concentrado de 1 L para 300 mL em cartucho Hollow Fiber de 10.000 kDa. A amostra concentrada foi utilizada na dosagem de enzimas que hidrolisam celulose, hemicelulose e lignina, e o resultado, expresso em U/mL, encontra-se na **Tabela 8**.

Tabela 8. Quantificação das enzimas que hidrolisam celulose, hemicelulose e lignina presentes no extrato bruto de *M. pulchella*.

Enzima	Atividade (U/mL)	Atividade Específica (mg/mL)	Proporção das atividades (%)^a
<i>Xilanase</i>	2,38	11,9	22,69
<i>Amilase</i>	2,05	10,25	19,54
<i>CMCase</i>	0,09	0,45	0,86
<i>FPase</i>	0,07	0,35	0,67
<i>Avicelase</i>	0,03	0,15	0,29
<i>Pectinase</i>	0,15	0,75	1,43
<i>β-glucanase</i>	0,71	3,55	6,77
<i>Arabinanase</i>	0,1	0,5	0,95
<i>Mananase</i>	0	0	0
<i>β-glucosidase</i>	2,9	14,5	27,67
<i>Arabinofuranosidase</i>	0,04	0,2	0,38
<i>Lipase</i>	1,2	6	11,45
<i>Celobiohidrolase</i>	0,4	2	3,82
<i>β-xilosidase</i>	0,4	2	3,82
<i>Lacase</i>	0	0	0

^a Para o cálculo considerou-se como 100% a soma das atividades específicas

Além das enzimas presentes na **Tabela 8**, o substrato arabinoxilana também foi utilizado para a dosagem enzimática, resultando em 3,98 (U/mL).

4.2.3. Planejamento de mistura

Devido à presença de diferentes enzimas promissoras à hidrólise de resíduos industriais no extrato bruto produzido por *M. pulchella*, foi realizado um planejamento de mistura com BCAN, casca de soja moída e BCev para avaliar sob qual dos resíduos o coquetel de enzimas seria mais eficiente na hidrólise de açúcares mais complexos em açúcares menores.

O experimento foi realizado como descrito no item 3.9.1. O *software* estatístico Statistica v.13.0 foi usado para analisar os dados experimentais de açúcares redutores (mg/mL) dosados em cada ponto do planejamento de mistura.

Figura 30. Representação gráfica das proporções das atividades enzimáticas presentes no extrato bruto.

Nos gráficos de superfície de resposta (**Figura 31**) é possível visualizar quais resíduos são mais hidrolisados em cada tempo de reação. Os valores de Anova, os

modelos utilizados e as equações construídas com os coeficientes do modelo encontram-se na **Tabela 9**.

No tempo de 3 horas mais de 0,9 mg/mL de açúcares redutores foram formados a partir da hidrólise do BCev, já no tempo de 6 horas mais de 1 mg/mL de açúcares redutores se formaram e em 24 e 48 horas os valores encontrados foram de mais 1,8 mg/mL e 2,0 mg/mL respectivamente. Pode-se concluir que o BCev foi o resíduo mais hidrolisado em todos os tempos do planejamento de mistura produzindo, assim, maior quantidade de açúcares redutores, seguido da casca de soja moída e do BCAN. O BCAN não apresentou bons resultados de hidrólise.

Figura 31. Superfície de resposta da ação do extrato bruto em diferentes tempos de hidrólise sob o bagaço de cana (BCAN = bagaço de cana-de açúcar *in natura*), casca de soja moída e bagaço de cevada (BCev). (A) 3 horas; (B) 6 horas; (C) 12 horas e em (D) 24 horas.

Tabela 9. ANOVA para o rendimento da hidrólise enzimática (mg/mL de açúcar redutor) em diferentes resíduos vegetais: 3, 6, 24 e 48 horas e equações de cada modelo de mistura.

Hidrólise (h)	Modelo da mistura	ANOVA							Equação do modelo
		Fonte de Variação	SS	GL	MS	Teste F		R ²	
						F _{calc}	F _{tab}		
3	Cúbico Especial	Modelo	0,879422	5	0,175884	168,40	9,01	0,996	mg/mL = - 0,013A + 0,067B + 1,000C +0,227AC + 0,547BC - 2,710ABC [Eq. 6]
		Resíduo	0,003133	3	0,001044				
		Falta de ajuste	0,001067	1	0,001067	1,0323	18,51		
		Erro puro	0,002067	2	0,001033				
		Total	0,882556	8			$\alpha=0,05$		
6	Quadrático	Modelo	0,944794	4	0,236199	59,78	6,39	0,984	mg/mL = 0,277A + 0,194B +1,157C – 0,365AB +1,195BC [Eq. 7]
		Resíduo	0,015806	4	0,003951				
		Falta de ajuste	0,010539	2	0,005270	2,0011	19,00		
		Erro puro	0,005267	2	0,002633				
		Total	0,960600	8			$\alpha=0,05$		
24	Quadrático	Modelo	2,143316	4	0,535829	118,52	4,11	0,992	mg/mL = 0,272A + 0,525B + 1,882C – 0,432AB + 0,748BC [Eq. 8]
		Resíduo	0,018084	4	0,004521				
		Falta de ajuste	0,013617	2	0,006809	3,0487	9,00		
		Erro puro	0,004467	2	0,002233				
		Total	2,161400	8			$\alpha=0,10$		
48	Linear	Modelo	2,520093	2	1,260047	257,19	5,14	0,989	mg/mL = 0,166A + 0,578B + 2,074C [Eq. 9]
		Resíduo	0,029396	6	0,004899				
		Falta de ajuste	0,020796	4	0,005199	1,2090	19,25		
		Erro puro	0,008600	2	0,004300				
		Total	2,549489	8			$\alpha=0,05$		

ANOVA (Análise de variância), SS (Soma dos quadrados), GL (nº de graus de liberdade), MS (Média dos quadrados), Teste F (Teste de Fisher), R² (% de variação explicada), AR (açúcar redutor). Termos em negrito são significativos.

4.2.3.1. TLC do produto de hidrólise

O BCev foi o resíduo sob o qual o coquetel de enzimas agiu de forma mais eficiente, e consequentemente produziu maior quantidade de açúcares redutores. Os pontos de 0, 3, 6, 24 e 48 horas da hidrólise do BCev pelas enzimas presentes no extrato bruto produzido pelo fungo *M. pulchella* foram analisados por meio de uma TLC (**Figura 32**).

No tempo de 0 hora não há presença de nenhum mono-, di- ou oligossacarídeo. Porém, em 3 horas de hidrólise já é possível observar a presença de oligossacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos. O mesmo resultado pode ser observado no tempo de 6 horas, porém as bandas aparecem com maior intensidade. Em 24 horas o perfil de açúcares formados pela hidrólise apresenta mudança, e observa-se majoritariamente dissacarídeos e monossacarídeos, com consequente diminuição de açúcares maiores como trissacarídeos e oligossacarídeos, confirmando a eficiência das enzimas presentes. Finalmente em 48 horas pode-se observar um perfil similar ao de 24 horas, porém com mais intensidade nas bandas demonstrando o aumento desses açúcares, além do aumento de xilose e glucose formada em comparação ao tempo de 24 horas.

Figura 32. TLC com os produtos de hidrólise do **BCev** pelas enzimas presentes no extrato bruto produzido por *M. pulchella* nas condições encontradas pelo DCCR. (1) Padrão (Glucose, Maltose, Maltotriose, Maltotetraose e Maltopentaose); (2) Padrão (Xilose, Xilobiose, Xilotriose e Xilotetraose); (3) 0 hora; (4) 3 horas; (5) 6 horas. (6) 24 horas; (7) 48 horas de hidrólise do BCev.

Capítulo III

*Imobilização, caracterização dos derivados e
aplicação biotecnológica de β -glucosidases
imobilizadas*

4.3.1. Imobilização

A imobilização de enzimas é uma ferramenta importante para a sua aplicação, pois permite o reuso desse catalisador e um controle fácil do processo, por interrupção da reação por simples filtragem (Mateo *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013). Além disso, a atividade, estabilidade e seletividade podem ser melhoradas através da imobilização (Mateo *et al.*, 2007). Com base nesses pressupostos as BGLs foram produzidas e pré-tratadas segundo o item 3.6, resultando na produção de 2,9 U/mL de BGLs que foram imobilizadas no suporte iônico MANAE-agarose, e no suporte de afinidade ConA-Sepharose.

Para estudos de estabilidade foi realizada também uma imobilização irreversível unipontual das BGLs presentes no extrato bruto em BrCN-Sepharose. Este tipo de imobilização é utilizado para simular a enzima livre em sua forma pura, sem sofrer influência de outras proteínas ou compostos químicos presentes nos extratos enzimáticos solúveis. Cerca de 50 % das BGLs presentes no extrato bruto foram imobilizadas nesse suporte, que resultou em um derivado denominado BGL-BrCN, com atividade de 9,2 U/g (**Tabela 10**).

Cerca de 100% das BGLs presentes no extrato bruto foram imobilizadas nos suportes MANAE-agarose e ConA-Sepharose. Os derivados de BGLs foram denominados de BGL-MANAE para o suporte iônico, BGL-ConA para o suporte de afinidade.

A imobilização em suporte MANAE-agarose resultou em uma ativação de aproximadamente 10 vezes em relação à atividade inicial da suspensão, enquanto que em suporte de afinidade ConA-Sepharose a ativação foi de quase 3 vezes, e isso possivelmente pode ser explicado pela estabilização da forma ativa das BGLs nos suportes (**Tabela 10**). Por outro lado, a imobilização em BrCN-Sepharose resultou em uma inibição de 0,65 vezes. Para determinar a atividade dos derivados passou-se a utilizar uma agitação mais vigorosa durante a reação. A taxa de imobilização e a atividade final dos derivados obtidos estão apresentadas na **Tabela 10**.

4.3.2. Caracterização enzimática dos derivados

Os derivados foram diluídos 10 vezes (p/v) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 formando uma suspensão. A diluição foi realizada, pois a atividade catalítica

apresentada pelos derivados era elevada, e não seria conveniente pesar quantidades tão pequenas para a realização dos testes, pois poderia levar a um grande erro.

Tabela 10. Imobilização das BGLs de *M. pulchella* em diferentes suportes, em pH 7,0.

Derivados	Proteínas totais imobilizadas (%)	Atividade dos derivados (U/g)	Imobilização das BGLs após 24 horas (%)	Hiperativação (%)
<i>BGL- BrCN^a</i>	59,5	9,2	50	-
<i>BGL-MANAE^b</i>	38,1	291	100	10,03
<i>BGL-ConA^b</i>	23,8	79,6	100	2,74

^a Reação ocorreu em 20 min, a 4 °C

^b Reação ocorreu em 1 hora, a 4 °C

4.3.2.1. Efeito da temperatura de reação dos derivados

A temperatura ótima dos derivados foi determinada por meio de experimentos nos quais as dosagens enzimáticas foram realizadas em diferentes temperaturas variando de 30 à 80°C.

A temperatura ótima de todos os derivados foi de 50°C, nas condições do ensaio, como pode ser observado na **Figura 33**.

Figura 33. Efeito da temperatura de reação dos derivados BGL-MANAE, BGL-ConA e BGL-BrCN.

4.3.2.2. Efeito do pH na reação dos derivados

Para avaliar o efeito do pH sobre os derivados, foi utilizado o tampão McIlvaine em diferentes pH (pH de 2-8), com a temperatura fixa de 50 °C para a reação enzimática.

Todos os derivados apresentaram pH ótimo de 6,0, nas condições do ensaio, como pode ser observado na **Figura 34**.

Figura 34. Efeito do pH na reação dos derivados BGL-MANAE, BGL-ConA e BGL-BrCN. Os tampões utilizados foram McIlvaine nos pH de 2,0-8,0.

4.3.2.1. Estabilidade ao pH dos derivados

A estabilidade ao pH dos derivados foi avaliada a 25 °C, com 2h, 4h, 6h e 24 horas de incubação em diferentes tampões. Os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA foram mais estáveis que o BGL-BrCN, tanto nos pH ácidos quanto nos pH neutro e básicos (**Figura 35 e 36**).

Todos os derivados foram mais estáveis que o BGL-BrCN, o que indica que essas imobilizações aumentaram a estabilidade térmica aos pH testados (**Figura 36A e 36B**).

O derivado de BGL-MANAE permaneceu com aproximadamente 70% da atividade inicial em todos os pH ácidos testados (**Figura 35B**) e com mais de 90% de atividade nos pH neutro e básicos, sendo que no pH 9,0 e 10,0 o derivado permaneceu com 100% da atividade inicial com até 24 horas de incubação (**Figura 36B**).

O derivado BGL-ConA permaneceu com mais de 70% de sua atividade inicial em todos os pH ácidos (**Figura 35C**), e nos pH básicos e neutro testados permaneceu com mais de 80% da atividade inicial com até 24 horas de experimento. No pH 9,0 o derivado permaneceu com praticamente 100% da atividade inicial, no tempo experimental máximo de 24 horas (**Figura 36C**).

Figura 35. Estabilidade ao pH dos diferentes derivados nos pH ácidos (2,0-6,0) para (A) BGL-BrCN e (B) BGL-MANAE (C) BGL-ConA. A atividade das BGLs foi determinada conforme descrito no item 3.3. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição dos diferentes tampões.

Figura 36. Estabilidade ao pH dos derivados nos pH neutro e básicos (7,0-11,0) para (A) BGL-BrCN e (B) BGL-MANAE (C) BGL-ConA. A atividade das BGLs foi determinada conforme descrito no item 3.3. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição dos diferentes tampões.

4.3.2.2. Inativação térmica dos derivados

A inativação térmica dos derivados foi avaliada para as temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C para os derivados BGL-MANAE e BGL-BrCN e para as temperaturas 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C para o derivado BGL-ConA.

Todos os derivados foram mais estáveis que o BGL-BrCN, o que indica que essas imobilizações aumentaram a estabilidade térmica da BGL a 40 °C, 50 °C e 60 °C (**Figura 37A**).

O derivado BGL-MANAE mostrou-se estável a 40 °C permanecendo com 83% da sua atividade inicial com 24 horas de incubação. A 50 °C o derivado BGL-MANAE apresentou aproximadamente 60% da sua atividade inicial com 24 horas de experimento, e a 60 °C o derivado não apresentou bom comportamento, permanecendo com apenas 23% da atividade inicial por até 24 horas de incubação (**Figura 37B**).

O derivado mais estável a 40 °C, 50 °C e 60 °C foi o BGL-ConA, permanecendo com 100% da atividade inicial até por 24 horas de incubação nessas temperaturas. Apenas na temperatura de 70 °C esse derivado perdeu 60 % de sua atividade inicial com 2 horas de incubação, mas permanecendo com essa atividade residual por até 24 horas de incubação (**Figura 37C**).

Figura 37. Inativação térmica dos derivados a 40 °C, 50 °C e 60 °C para (A) BGL-BrCN e (B) BGL-MANAE e a 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C para o derivado (C) BGL-ConA. A atividade das BGLs foi determinada conforme descrito no item 3.3. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a incubação em diferentes temperaturas.

4.3.2.3. Efeito da glucose sobre os derivados

O efeito de glucose sobre os derivados foi avaliado para concentrações finais de 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M e 1 M, a 25 °C nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas.

O derivado BGL-BrCN permaneceu com 57%, 54%, 45%, 38% e 37% da atividade inicial por até 24 horas para as concentrações finais de glucose 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M e 1 M (**Figura 38A**).

O derivado BGL-MANAE permaneceu com 95% de sua atividade inicial nas concentrações 0,05 M e 0,1 M depois de 24 horas. Nas concentrações de 0,25 M, 0,5 M e 1 M o derivado permaneceu com 75%, 75% e 55% da atividade inicial por até 24 horas (**Figura 38B**).

O derivado BGL-ConA permaneceu com 85% de sua atividade inicial nas concentrações 0,05 M, 0,1 M e 0,25 M depois de 24 horas e nas concentrações de 0,5 M e 1 M o derivado permaneceu com aproximadamente 70% da atividade inicial por até 24 horas (**Figura 38C**).

Os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA apresentaram menor inibição na presença das diferentes concentrações de glucose quando comparado ao derivado BGL-BrCN com 24 horas de incubação, o que indica que essas imobilizações aumentaram a tolerância das BGLs a glucose.

4.3.2.4. Efeito do etanol sobre os derivados

O efeito do etanol sobre os derivados foi avaliado nas concentrações finais de 5%, 10% e 15%, a 25 °C, nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas.

O derivado BGL-BrCN teve inibição de 50% de sua atividade inicial por todas as concentrações de etanol testadas a partir de 2 horas de experimento (**Figura 39A**).

Os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA se comportaram de forma similar, sendo pouco inibidos na presença de todas as concentrações de etanol testadas por até 24 horas de incubação. BGL-MANAE e BGL-ConA permaneceram com mais de 80% da atividade inicial em 24 horas de incubação em todas as concentrações de etanol testadas (**Figura 39B e Figura 39C**).

Os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA apresentaram menor inibição na presença de etanol, quando comparados aos resultados obtidos pelo derivado BGL-BrCN, o que indica que essas imobilizações diminuem o efeito de inibição por etanol.

Figura 38. Efeito de diferentes concentrações de glucose na atividade de BGLs imobilizadas. Testes realizados a 25 °C nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas para os derivados (A) BGL-BrCN (B) BGL-MANAE (C) BGL-ConA. O 100% equivale a atividade obtida no tempo 0, imediatamente após a adição da diferentes concentrações de glucose.

Figura 39. Efeito de diferentes concentrações de etanol na atividade de BGLs imobilizadas. Testes realizados a 25 °C nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas para os derivados (A) BGL-BrCN (B) BGL-MANAE (C) BGL-ConA.

4.3.3. Dessorção de BGLs dos suportes MANAE-agarose e Concanavalina A-Sepharose

Para verificar qual concentração de NaCl era necessária para dessorver as BGLs do suporte iônico MANAE-agarose, e a concentração do açúcar α -D-metilmanosídeo necessária para dessorver as BGLs do suporte de afinidade Concanavalina A-Sepharose, os derivados foram mantidos em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, acrescido dos seus dessorventes nas concentrações 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,75 M, 1 M, 1,5 M, 2 M e 3 M, por 2 horas a 4 °C. Depois de 2 horas as suspensões foram filtradas, e os sobrenadantes e os derivados foram quantificados quanto à atividade de BGLs.

Quanto a dessorção de BGLs do suporte MANAE-agarose, pode-se observar que parte das BGLs dessorveram na faixa de 0,25-0,75 M, porém a maior parte dessorveu em concentrações iguais ou superiores a 1 M de NaCl. Apesar de aproximadamente 50% das BGLs dessorverem do suporte, 50% destas não dessorveram de MANAE-agarose nem mesmo em concentração de NaCl igual a 3 M. Isso mostra que as BGLs estão interagindo com o suporte fortemente (**Figura 40**).

Mesmo usando 3,0 M do açúcar α -D-metilmanosídeo, as BGLs não dessorveram do suporte Concanavalina A (**Figura 40**), o que nos indica que a ligação de afinidade que as mantém são extremamente forte.

Figura 40. Representação gráfica da dessorção de BGLs dos derivados BGL-MANAE e BGL-ConA. Barras representam a dessorção das BGLs a partir do derivado MANAE-agarose utilizando NaCl (0,05-3,0 M); pontos vermelhos representam a dessorção das BGLs a partir do derivado Concanavalina A utilizando α -D-metilmanosídeo (0,05-3,0 M).

4.3.4. Teste de reuso dos derivados

Os derivados foram testados quanto à sua capacidade de reutilização como descrito na seção 3.6.5. Tanto o derivado BGL-MANAE quanto o derivado BGL-ConA apresentaram resultados interessantes, podendo ser reutilizados por até 20 vezes, permanecendo com aproximadamente 50% da atividade catalítica inicial, no caso do BGL-MANAE e 70% no caso do BGL-ConA.

Figura 41. Representação gráfica do reuso dos derivados BGL-MANAE (em preto) e BGL-ConA (em branco). Os derivados foram testados quanto a capacidade de reuso por até 20 vezes, utilizando o substrato artificial pNPG. Os testes de reuso foram realizados a 25 °C.

4.3.5. Aplicação biotecnológica dos derivados – clarificação do suco de uva e de vinho tinto através da hidrólise de antocianinas

Os derivados BGL-MANAE e BLG-ConA foram aplicados na hidrólise de antocianinas e consequente clarificação do vinho tinto e do suco de uva.

A escolha da aplicação se deu pelo fato de que outras enzimas do complexo lignocelulolítico foram dosadas nos derivados, porém não apresentavam atividades. Desta forma, a hidrólise de resíduos agroindustriais não se faria pertinente. Optou-se então pela hidrólise das antocianinas, as quais dependem majoritariamente das BGLs.

Foram utilizados 50 mg dos derivados, que foram acrescentados em alíquotas de 2 mL de vinho tinto, vinho tinto diluído (1:1), suco de uva e suco de uva diluído (1:1).

As soluções foram colocadas em banho seco a 50 °C, 1000 rpm, por 8 horas e controles foram realizados, segundo descrito no item 3.9.2. Depois de 8 horas as suspensões (vinho ou suco de uva mais o derivado testado) foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante foi verificada em leitor de microplacas a 520 nm. O experimento foi realizado em duplicada.

Ambos os derivados foram capazes de clarificar os vinhos tintos e os sucos de uva, o que pode ser observado pela **Figura 42**. A diminuição da absorbância das amostras de vinhos e sucos a 520 nm indica a perda de coloração roxa avermelhada, ou seja, a hidrólise das antocianinas presentes nas amostras, comprovando a efetividade do uso das BGLs imobilizadas para esse fim (Sánchez-Torres *et al.*, 1998). Os resultados estão disponíveis nos gráficos da **Figura 43**.

Figura 42. Clarificação do vinho tinto e do suco de uva por BGLs de *M. pulchella* imobilizadas em MANAE-agarose e em Concanavalina A-Sepharose. O controle 1 corresponde ao suco ou vinho incubados a 50 °C na ausência do catalisador; o controle 2 corresponde aos sucos e vinhos incubados na presença de 50 mg de suporte MANAE-agarose (Controle 2 MANAE) e Concanavalina A-Sepharose (Controle 2 ConA) livre de enzimas imobilizadas; BGL-MANAE e BGL-ConA correspondem aos sucos e vinhos incubados na presença de 50 mg dos derivados testados. As amostras foram mantidas a 50 °C, 1000 rpm, por 8 horas.

Figura 43. Clarificação do vinho tinto e do suco de uva por BGLs de *M. pulchella* imobilizadas em (A) MANAE-agarose e em (B) Con A-sepharose. O controle 1 (c1) corresponde ao suco e vinhos incubados a 50 °C na ausência do catalisador; o controle 2 (c2) corresponde aos sucos e vinhos incubados na presença de 50 mg de suporte MANAE-agarose e Concanavalina A-Sepharose livre de enzimas imobilizadas; BGL-MANAE e BGL-ConA correspondem aos sucos e vinhos incubados na presença de 50 mg de cada derivado. As amostras foram mantidas a 50 °C, 1000 rpm, por 8 horas.

O derivado BGL-MANAE apresentou melhores resultados na clarificação dos vinhos e sucos de uva, clarificando 52% o vinho, 71% o vinho diluído, 77% o suco de uva e 56% o suco de uva diluído. BGL-ConA em contrapartida clarificou 41% o vinho, 46% o vinho diluído, 63% o suco de uva e 23% o suco de uva diluído (**Tabela 11**). A partir desses resultados podemos afirmar que o derivado BGL-MANAE foi mais eficiente que BGL-ConA na clarificação de vinhos e sucos de uva e, portanto, ele pode ser considerado um biocatalisador promissor para a hidrólise de antocianinas e, consequentemente, para a produção de vinhos brancos com reduzida coloração avermelhada e de vinhos rose a partir de uma grande variedade de uvas vermelhas.

Tabela 11. Porcentagem de clarificação dos vinhos e sucos utilizando os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA na hidrólise da antocianina.

Derivado	Clarificação (%)			
	Vinho	Vinho diluído	Suco de uva	Suco de uva diluído
BGL-MANAE	52	71	77	56
BGL-ConA	41	46	63	23

Discussão

Neste trabalho, BGLs secretadas por *Malbranchea pulchella* foram produzidas de diferentes formas de acordo com o objetivo a ser atingido. Para a purificação da BGL o extrato bruto foi produzido utilizando-se celobiose 1% (p/v) como fonte de carbono indutora da produção enzimática, no meio de cultivo Lummy. Esse meio de cultivo foi escolhido por ser simples, tamponado em pH 6,0 e, provavelmente, induzir preferencialmente a produção de BGL devido à fonte de carbono utilizada – um dissacarídeo que é hidrolisado por BGLs. A purificação foi realizada por meio de ultrafiltrações tangenciais e cromatografia de troca iônica em DEAE-fractogel. A BGL após ter sido eluída da resina DEAE-Fractogel foi purificada com um fator de purificação 6,32 e recuperação de aproximadamente 35 vezes.

Diversas estratégias foram utilizadas previamente na tentativa de purificação da BGL, como por exemplo, a dessorção a partir dos suportes de imobilização MANAE-agarose e Concanavalina A e a purificação utilizando resinas trocadoras de cátions. Nenhuma dessas estratégias foi bem sucedida. Na tentativa de dessorver a BGL de MANAE-agarose, contaminantes dessorviam junto com a enzima de interesse, comprometendo a purificação. Já no caso da Concanavalina A, a BGL não dessorvia da resina, nem mesmo utilizando o máximo de açúcar permitido pelo fabricante. Esse resultado era esperado, uma vez que BGLs fúngicas normalmente são muito glicosiladas. Quanto à coluna trocadora de cátion, a purificação não foi possível, já que as BGLs não interagem com a coluna.

Posterior a purificação, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) pode-se observar apenas uma banda proteica de aproximadamente 100 kDa, sugerindo que a enzima estava pura. A confirmação da atividade da BGL foi realizada com um Zimograma, pela presença de uma única banda escura. Além da identificação por Zimograma, a banda proteica obtida no gel SDS-PAGE identificada como uma GH3 de *M. pulchella* por espectrometria de massas.

Como a massa molecular teórica da BGL não correspondia à massa molecular calculada através de gel de eletroforese desnaturante, optou-se por realizar um procedimento de deglicosilação. Através do experimento pode concluir que 15% da massa molecular da BGL correspondiam a glicosilação. Uma análise da sequencia primária da proteína foi realizada indicando presença de 10 possíveis sítios de N-

glicosilação e 2 de O-glicosilação. Normalmente as enzimas fúngicas são altamente glicosiladas, e esse resultado corrobora para essa afirmação.

A análise de dicroísmo circular da BGL foi condizente com estruturas de BGLs, que tem domínios altamente conservados, pois apresentou estrutura semelhante às α/β hidrolases. Sendo assim, por meio de buscas em bancos de dados, uma GH3 do fungo *A. oryzae* teve 61% de identidade com os resultados encontrados para a GH3 de *M. pulchella*.

Os parâmetros cinéticos da BGL, frente ao substrato pNPG foram calculados e a enzima BGL apresentou K_m 0,33 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 13,67 (U/mg) e o K_{cat} foi calculado em 26,6 s⁻¹ valores encontrados pelo *software* SigrafW. As BGLs de diferentes organismos diferem tanto no tamanho quanto nas características, inclusive quanto a seus parâmetros cinéticos, como pode ser visto pelos exemplos que seguem. Asha e colaboradores (2014) determinaram os parâmetros cinéticos de uma BGL de massa 38,3 kDa de *Bacillus subtilis* SU40 com K_m de 0,21 μ M e $V_{m\acute{a}x}$ de 9,38 μ mol mg⁻¹ min⁻¹, para o substrato pNPG. BGLs de *Aspergillus oryzae* tiveram como parâmetros cinéticos K_m igual a 0,75 mM, $V_{m\acute{a}x}$ de 456 (U/mg) e K_{cat} de 651 s⁻¹ para a BglA (130 kDa) e K_m igual a 0,48 mM, $V_{m\acute{a}x}$ de 264 (U/mg) e K_{cat} de 373 s⁻¹ para a BglJ (100 kDa), também utilizando o substrato pNPG (Kudo *et al.*, 2015). Já a BGL de *Aspergillus niger* de 110 kDa apresentou um K_m de 2,703 mmol/L, $V_{m\acute{a}x}$ de 0,631 mmol·l⁻¹·min⁻¹ e K_{cat} de 140 s⁻¹ também para o substrato pNPG (Gong *et al.*, 2014). Tomando como base os valores encontrados pela literatura, pode-se dizer que a BGL de *M. pulchella* apresenta uma considerável afinidade pelo substrato (K_m) muitas vezes maior que as demais BGLs de outros fungos, porém com um menor número de renovação (K_{cat}).

K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para BGLs são geralmente calculados frente ao substrato sintético pNPG ou ao metilumbeliferil β -D-glucosídeo (MUG), alguns exemplos mostram atividades de BGLs frente ao substrato celobiose. Na maioria dos casos, BGLs mostram alta atividade catalítica e baixos valores de K_m para o substrato artificial pNPG e MUG mas não para celobiose (Singhania *et al.*, 2012). A cinética das BGLs depende da configuração do substrato e a celobiose requer uma mudança conformacional para que haja catálise e isso não é necessário no caso de pNPG onde nitrofenol segue o mesmo padrão de ligação que a glucose (Singhania *et al.*, 2012).

A temperatura e pH ótimos da BGL foi de 50°C e 6,0, respectivamente, nas condições do ensaio. Esses resultados são bem comuns para BGLs de diferentes organismos. BGLs normalmente apresentam temperaturas ótimas na faixa de 40 a 60 °C e pH ótimos na faixa de 4,0 a 6,0 (Baffi *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2014; Kudo *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 1996).

A BGL purificada não foi ativada por nenhum dos sais metálicos testados, portanto, essa enzima não corresponde a uma metaloproteína. Ao contrário, cloreto de mercúrio foi capaz de reduzir 90% da atividade da enzima, o que pode indicar a presença de sítios tióis próximos ao sítio catalítico. Na literatura, é possível encontrar variados tipos de respostas de BGLs frente à presença de íons metálicos na reação enzimática. Por exemplo, BGL de *A. niger* foram estimuladas na presença de Mn^{+2} em 163%, e em Fe^{+2} em 151%, por outro lado, Cu^{+2} inibiu a atividade, e Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} e Ba^{+2} não tiveram efeito sobre a enzima (Gong *et al.*, 2014). Já a BGL de *Cecropia peltata* não teve efeito significativo na presença de nenhum dos íons testados (Saha *et al.*, 1996). A BGL de *Sporidiobolus pararoseus* foi totalmente inibida por Ag^{+2} e Hg^{+2} , e parcialmente inibida por Cu^{+2} e Zn^{+2} (Baffi *et al.*, 2013). A BGL de *Penicillium pinophilum* foi inibida significativamente por Cu^{+2} e Pb^{+2} , e não sofreu inibição em presença de Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , NH_4^+ e Fe^{+2} (Joo *et al.*, 2009).

Apesar de maioria dos sais de íons de metálicos não inibirem a atividade de BGLs, Ag^+ e Hg^{+2} , são potentes inibidores e a inibição por Cu^{+2} e Fe^{+3} também tem sido relatada (Cairns *et al.*, 2010; Zollner *et al.*, 1989). Íons metálicos podem ter papel importante na função de enzimas, mas também podem inibir a atividade enzimática, muitas vezes por interferir na estrutura da proteína. Como é o caso do Hg^{2+} , que pode inibir a atividade enzimática atuando sobre sítios tióis presentes no sítio ativo da enzima (Rizzatti *et al.*, 2001), ou então agindo sobre de grupos R na porção externa da enzima capazes de alterar a estrutura tridimensional e consequentemente a sua atividade. A modelagem molecular seria uma forma mais eficiente de se afirmar a origem dessa inibição.

Embora as BGLs não necessitem de qualquer cofator para agir, ascorbato é conhecido por aumentar a atividade da enzima (Burmeister *et al.*, 2000), e alguns íons como K^+ , Na^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} foram descritos como capazes de estimular a atividade de BGLs (Lowry *et al.*, 1951; Ozaki *et al.*, 1992). Particularmente, Ca^{+2} e Mg^{+2} foram relatadas como necessários por estas enzimas para a melhor afinidade de ligação ao

substrato e a estabilização da conformação do sítio catalítico (Paavilainen *et al.*, 1993), entretanto isso não foi observado para a BGL purificada de *M. pulchella*.

Para a biocatálise, enzimas que não possuem ativação por íons são interessantes porque não necessitam da adição desses reagentes para a sua atividade. Da mesma forma, a não inibição pela maioria dos íons é interessante porque a presença de pequenas quantidades desses elementos no meio reacional não alterará a catálise, evitando-se passos de quelação.

BGL purificada foi termoestável por até 24 horas a 40 °C. Na temperatura de 50 °C a enzima permaneceu com aproximadamente 50 % da sua atividade inicial por 4 horas. Quanto a estabilidade ao pH a BGL purificada manteve-se estável nos pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 apresentando aproximadamente 86%, 88%, 97% e 90% da atividade inicial respectivamente, mesmo com 24 horas de incubação. A estabilidade ao pH e a termoinativação das BGLs pode variar de organismo para organismo, mas na literatura observa-se que muitas BGLs são estáveis em pH que variam de 4,0 a 6,0 e em temperaturas de 40 a 60 °C (Baffi *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2014; Kudo *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 1996).

A BGL purificada não apresentou inibição em presença de glucose em todas as concentrações testadas, 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, 0,5 M e 1 M podendo ser considerada, estratégica em aplicações industriais. As BGLs em sua maioria são inibidas por glucose, que quando em alta concentração pode bloquear o sítio ativo para a entrada do substrato ou impedir a saída do substrato hidrolisado (Singhania *et al.*, 2012). BGLs tolerantes à glucose são interessantes, pois não sofrem inibição por retroalimentação e, se presentes em um coquetel de enzimas para a hidrólise da biomassa podem melhorar a eficiência de hidrólise, deslocando o equilíbrio para o aumento da concentração de produto.

Poucas espécies de *Aspergillus* são conhecidas por produzir BGLs tolerantes a glucose, como por exemplo, *A. unguis*, *A. caespitosus*, e algumas destas enzimas já foram clonadas e caracterizadas (Gunata & Vallier, 1999; Rajasree *et al.*, 2013; Riou *et al.*, 1998; Sonia *et al.*, 2007). São necessários esforços no sentido de se obter BGLs expressas de forma heteróloga com propriedades de tolerância à glucose, juntamente com a procura dessas enzimas a partir de fontes nativas.

Numa segunda parte desse trabalho o objetivo foi aumentar a produção de BGLs de *M. pulchella*, utilizando preferencialmente fontes de carbono mais baratas para a aplicação na hidrólise de biomassa. *M. pulchella* cresce bem em meio Emerson (Pereira,

2011), porém foi observado que durante o crescimento neste meio de cultivo o pH modificava de 6,0 (pH inicial) para 12,0 (pH final), em 72 horas de cultivo. Possivelmente esse aumento no pH se dava pela produção de amônia/amônio pelo fungo. Desta forma o meio Lummy foi elaborado, sem que alterasse demasiadamente a composição do meio Emerson, porém com tamponamento no pH 6,0, a fim de controlar as alterações do pH durante o crescimento do fungo.

O meio Lummy apresentou melhor resultado para a produção de BGLs quando comparada a produção em meio Emerson. A produção de BGLs, pelo fungo no meio Emerson representou apenas 45% da produção de BGLs alcançada no meio Lummy depois de 72 horas de cultivo.

A celobiose, apesar de ser uma boa fonte de carbono indutora da produção de BGL, pode ser considerada cara, e pouco promissora a aplicações industriais. Desta forma buscou-se pela associação das fontes de carbono celobiose e do BCAN, a fim de diminuir custos e aumentar a produção. Celobiose e BCAN mostraram-se bons indutores da produção de BGLs para o fungo *M. pulchella*. Estas fontes de carbono vem sendo utilizadas como fontes de carbono indutoras da produção de BGLs para diversos fungos (Cadete *et al.*, 2014; Gottschalk *et al.*, 2010; Manavalan *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2009).

Por apresentarem forte influência na atividade enzimática os dois parâmetros foram investigados de forma conjunta através de planejamentos experimentais. Os resultados obtidos nesse planejamento fatorial completo 2^2 e as análises dos resultados, com p de 0,05 mostraram que a celobiose e o BCAN apresentam efeito sobre a atividade enzimática ($R^2=0,9877$) e os melhores resultados foram observados nos pontos centrais do experimento, com concentrações de 0,6% de celobiose e 4% de BCAN. O gráfico de Pareto, com p de 0,5 mostra que as variáveis apresentaram apenas efeito quadrático na atividade enzimática, e o modelo reduzido obtido para a atividade enzimática de BGL (U/mL) foi expresso em uma equação. Os valores de atividade encontrados experimentalmente e preditos pela equação mostram que a equação encontrada é preditiva e válida.

Os resultados de ANOVA para o modelo reduzido de segunda ordem, com valor de coeficiente de correlação (R^2) de 0,9877, resultou num $F_{calculado}$ (347,06) cerca de 80 vezes maior que o $F_{tabelado}$ (4,26), o que significa que o modelo é preditivo e estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95%. A superfície de resposta

obtida através do modelo reduzido calculado demonstra que a maior atividade se dá no centro do gráfico, correspondente aos pontos centrais.

Depois dessa otimização por DCCR, *M. pulchella* passou a ser cultivado nas melhores condições experimentais encontradas: meio de cultivo Lummy suplementado com 0,6% de celobiose (p/v) e 4% de BCAN (p/v). A utilização de resíduos agroindustriais como o BCAN barateia a produção enzimática, diminui os danos ambientais causados pela agroindústria e agrega valor a um subproduto da indústria sucroalcooleira.

Dessa forma, um novo extrato bruto foi produzido e, depois de concentrado aproximadamente 3 vezes, o extrato enzimático foi utilizado para dosagem das enzimas CMCase, avicelases, FPases, xilanases, pectinases, amilases, arabinanases, β -glucanases, mananases β -glucosidases, β -xilosidases, lacases, arabinofuranosidases, lipases e celobiohidrolases que apresentam importante papel na degradação da biomassa (Cadete *et al.*, 2014; Panday *et al.*, 2000; Ratanakhanokchai *et al.*, 2013).

Por ser utilizada uma fonte de carbono complexa (BCAN), além da celobiose, diversas enzimas puderam ser encontradas no extrato enzimático de *M. pulchella*, como por exemplo, xilanases, amilases, CMCase, FPases, Avicelases, pectinases, β -glucanases, arabinanases, lipases, β -glucosidases, arabinofuranosidases, celobiohidrolases e β -xilosidases.

Devido à presença dessas enzimas no extrato enzimático produzido por *M. pulchella*, foi realizado de um planejamento de mistura utilizando BCAN, casca de soja moída e BCev como substrato, com a finalidade para avaliar sob qual dos resíduos o coquetel de enzimas seria mais eficiente na hidrólise de açúcares complexos a açúcares menores e fermentescíveis.

O *software* Statistica v.13.0 foi usado para análise dos dados experimentais de açúcares redutores (mg/mL). Nos gráficos de superfície de resposta é possível visualizar quais resíduos foram mais hidrolisados em cada tempo de reação.

O BCev foi o resíduo que apresentou melhores resultados de hidrólise em todos os tempos de experimento do planejamento de mistura produzindo maior quantidade de açúcares redutores, seguido da casca de soja moída e do BCAN. O BCAN não apresentou bons resultados de hidrólise. Com 3 horas de hidrólise cerca de 0,9 mg/mL

de açúcares redutores foram formados a partir da hidrólise do BCev; em 6 horas esse valor foi superior a 1 mg/mL e em 24 e 48 horas esses valores foram cerca de 1,8 mg/mL e 2,0 mg/mL respectivamente.

As alíquotas retiradas da hidrólise do BCev – tempos de 0, 3, 6, 24 e 48 horas de hidrólise – foram analisados por meio de uma TLC, e nesse experimento puderam-se evidenciar as bandas referentes aos açúcares formados em cada tempo. No tempo de 0 hora não há presença de nenhum mono- di- ou oligossacarídeo, o que é esperado, pois neste tempo nenhuma hidrólise aconteceu. Em apenas 3 horas de hidrólise já foi possível observar a presença de alguns oligossacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos indicando o início da ação das enzimas presentes. O mesmo resultado pode ser observado no tempo de 6 horas, com a diferença de que as bandas referentes aos açúcares apareceram em maior intensidade, ou seja, realmente houve aumento na quantidade de açúcares redutores em relação ao tempo anterior. Em 24 horas de hidrólise o perfil de açúcares redutores formados apresentou mudança, podendo-se observar maior quantidade de dissacarídeos e monossacarídeos, com consequente diminuição de oligossacarídeos, confirmando a eficiência das enzimas presentes no extrato enzimático na hidrólise de açúcares maiores a açúcares menores. Finalmente em 48 horas um perfil de açúcares similar ao de 24 horas pode ser observado, porém nota-se maior intensidade das bandas referentes aos açúcares demonstrando o aumento da produção desses açúcares, além do aparecimento de uma banda de baixa massa que pode ser referente à xilose e à glucose.

Devido à composição dos BCAN, casca de soja moída e BCev utilizados no planejamento de mistura e devido à capacidade de ação das enzimas presentes no extrato, o resultado do planejamento de mistura pode ser justificado por três possíveis fatores. Diferente dos demais resíduos, BCev tem em sua composição o amido (0,6%), e esse pode ter sido um dos fatores que contribuíram para a maior eficiência de hidrólise desse resíduo, já que o extrato enzimático utilizado possui 2,03 U/mL de amilases.

Outro fator que pode ter sido determinante para esse resultado foi à composição ligno/celulose dos resíduos. BCev apresenta aproximadamente 28% de ligno/celulose, enquanto que o BCAN e a casca de soja moída apresentam 38% e 61% respectivamente.

A partir dessa composição pode-se concluir que a menor quantidade de ligno/celulose (lignina e celulose) comprometeu a ação do consórcio de enzimas do extrato enzimático, e isso pode ser explicado da seguinte forma:

A lignina está normalmente presente na parede celular vegetal, conferindo rigidez, impermeabilidade, e resistência ao ataque microbiano e ao stress oxidativo (Pérez *et al.*, 2002; Sánchez, 2009) dificultando, portanto, a ação das enzimas que degradam celulose e hemicelulose. O extrato enzimático utilizado não apresentava atividade ligninase, desta forma, quanto menos lignina na constituição do resíduo, melhor a ação das demais enzimas. BCAN e casca de soja moída possivelmente apresentam maior quantidade de lignina em suas composições, e a ausência de ligninases pode ser um dos fatores determinante para uma menor eficiência de hidrólise sobre esses resíduos. Uma possível forma de melhorar a hidrólise desses resíduos seria a utilização de pré-tratamentos alcalinos, oxidativos, biológicos e o AFEX (Ammonia fiber explosion) que removem, principalmente, a fração da lignina, e assim a biomassa seria composta majoritariamente por hemicelulose e celulose ao final do processo.

Apesar de o extrato enzimático apresentar diversas celulasas e hemicelulasas, para iniciar a hidrólise da celulose, exoglucanases e endoglucanases são de extrema importância, e no extrato enzimático utilizado, essas enzimas estão presentes em pequenas quantidades (CMCase 0,09 U/mL e Avicelase 0,03 U/mL), dificultando a iniciação da hidrólise.

Finalmente, podemos concluir que a presença da pectina na composição dos BCev e BCAN nas porcentagens 31% e 11% respectivamente, também colaborou para o resultado de melhor hidrólise do BCev, já que existem pectinases no extrato enzimático.

Em uma terceira parte deste trabalho, visando a aplicação enzimática em processos industriais, a imobilização de enzimas foi uma estratégia interessante, pois permite a reutilização do catalisador, a interrupção do processo e a separação do catalisador do produto por simples filtração, além de, frequentemente, melhorar características como a atividade, estabilidade, seletividade e diminuição da inibição da enzima pelo produto (Guisan *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013; Sabbani *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Nesse contexto foi realizada a imobilização das BGLs em diferentes suportes. A imobilização reversível das BGLs foi realizada tanto em suportes de interação aniônica como afinidade. A imobilização irreversível

unipontual, em BrCN-Sepharose, foi utilizada apenas com o objetivo de simular as características da enzima pura.

A imobilização foi realizada e foi verificada através da dosagem da atividade sobre o substrato pNPG. A taxa de imobilização foi calculada subtraindo-se a atividade residual do sobrenadante da atividade inicial da suspensão, após 2 horas de imobilização. As BGLs foram 100% imobilizadas nos suportes MANAE-agarose e Concanavalina A-Sepharose e 50% em BrCN-Sepharose.

Hiperativações de aproximadamente 10 e 3 vezes foram observadas para o derivado BGL-MANAE e BGL-ConA, respectivamente. Essa hiperativação pode ser explicada devido as ligações formadas entre as BGLs e os suportes, provavelmente estabilizando conformações onde o sítio ativo da enzima está mais apto a receber e agir sobre o substrato (Cecchini *et al.*, 2007). pNPG sendo um substrato pequeno em termos de massa molecular, pode penetrar no sítio ativo das BGLs imobilizadas sem sofrer impedimento estérico significativo gerado pelos suportes (Guisán *et al.*, 1996)

A estabilidade térmica e ao pH são parâmetros importantes a serem analisados pós-imobilização, uma vez que grande parte das enzimas, depois de imobilizadas, tendem a aumentar sua estabilidade (Fernandez-Lorente *et al.*, 2008). Inúmeros trabalhos foram publicados analisando a inativação térmica e a estabilidade ao pH de diferentes enzimas imobilizadas em diferentes suportes (Bastida *et al.*, 1998; da Silva *et al.*, 2014; Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 1990)

O derivado BGL-MANAE foi mais estável a 40°C e 50°C e BGL-ConA foi mais estável a 40°C, 50°C e 60°C que o controle BGL-BrCN depois de 24 horas, além disso, os derivados foram mais estáveis que o BGL-BrCN em todos os pH testados com 24 horas de incubação, o que nos leva a acreditar que as imobilizações nos diferentes suportes foram eficientes e tiveram grande importância na estabilidade aos diferentes pH e na estabilidade térmica das BGLs.

Além da estabilidade aos diferentes pH e temperaturas, os derivados foram testados quanto a inibição da atividade enzimática na presença de glucose e etanol em diferentes concentrações. Os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA apresentaram menor inibição na presença das diferentes concentrações de glucose e etanol quando comparados ao derivado BGL-BrCN com 24 horas de incubação, o que indica que essas imobilizações aumentaram a tolerância à glucose e a etanol pelas BGLs imobilizadas.

Em grande parte, BGLs fúngicas são inibidas ou parcialmente inibidas em presença de glucose (Singhania *et al.*, 2012). Alguns exemplos de BGLs tolerantes a glucose são as BGL de *Aspergillus niger* que é 92% ativa em presença de 250 mM de glucose (Singhania *et al.*, 2011), e a BGL de *Sporidiobolus pararoseus* com tolerância moderada à glucose, que permanece com 29% da sua atividade residual em presença de 200 mM do açúcar (Baffi *et al.*, 2013). Os derivados BGL-MANAE e BGLS-ConA, em contrapartida permaneceram ativos 55% e 70% respectivamente, em presença de 1M de glucose mesmo depois de 24 horas, e dessa forma, podem ser considerados promissores para aplicações industriais.

BGL-MANAE e BGL-ConA permaneceram 80% ativos em presença de 5, 10 e 15 % de etanol, mesmo após 24 horas. Esse resultado é importante para aplicações na indústria enológica, uma vez que enzimas tolerantes ao etanol podem ser adicionadas no final da fermentação alcoólica, quando há altas concentrações de etanol presentes (Arévalo-Vilena *et al.*, 2007; Baffi *et al.*, 2013). Além disso, a tolerância ao etanol pode também ser considerada uma característica importante para uma aplicação no processo de sacarificação na produção do bioetanol.

As BGLs podem hidrolisar antocianinas, importantes agentes de cor encontrados em alimentos de origem vegetal (Spagna *et al.*, 2000). Em uvas tintas, em mostos e vinhos derivados destas uvas, as antocianinas são os principais pigmentos (Liu, 2002; Sánchez-Torres *et al.*, 1998). Desta forma, a atividade de BGLs pode afetar adversamente estes vinhos, provocando perda da coloração (Barbagallo *et al.*, 2004b; Liu, 2002; Manzanares *et al.*, 2000; Vernocchi *et al.*, 2015), o que é interessante na produção de vinhos brancos e rosados a partir de uvas rosadas. Por este motivo, os derivados BGL-MANAE e BGL-ConA foram utilizados para o teste de clarificação de vinhos e sucos de uva através da hidrólise de antocianinas.

Devido aos resultados que os derivados apresentaram para estabilidade a temperatura e ao pH, e por serem pouco inibidos em presença de glucose e etanol, decidiu-se utilizá-los na hidrólise de antocianinas presentes no suco de uva e no vinho tinto.

O pH do suco e do vinho utilizados nesse trabalho é de aproximadamente 3,7 e a hidrólise das antocianinas foi realizada a 50 °C, com agitação 1000 rpm, por 8 horas. A partir dos resultados de hidrólise da antocianina pode-se concluir que o derivado BGL-

MANAE apresentou melhores resultados na clarificação dos vinhos e sucos de uva, clarificando 52% o vinho, 71% o vinho diluído, 77% o suco de uva e 56% o suco de uva diluído enquanto o BGL-ConA clarificou 41% o vinho, 46% o vinho diluído, 63% o suco de uva e 23% o suco de uva diluído.

Pode-se concluir pelos resultados de porcentagem de clarificação dos sucos de uva, que nos sucos concentrados a hidrólise de antocianinas foi mais eficiente tanto pelo derivado BGL-MANAE quanto pelo BGL-ConA quando comparada à hidrólise de antocianinas no suco de uva diluído. Esse comportamento era esperado tanto para o suco de uva quanto para o vinho, uma vez que quanto mais antocianinas presentes, mais hidrólise das mesmas poderia acontecer e consequentemente maior porcentagem de clarificação deveria ser observada. Entretanto, esse comportamento não foi observado na hidrólise das antocianinas presentes nos vinhos concentrados e diluídos. Nos vinhos diluídos a hidrólise pelos dois derivados, foi mais eficiente que nos vinhos concentrados. Esse resultado poderia ser explicado pela concentração de etanol que também foi diluída, e esse fato pode de alguma forma ter permitido maior eficiência catalítica dos derivados frente à hidrólise das antocianinas.

BGL-MANAE foi mais eficiente que BGL-ConA na clarificação de vinhos e sucos de uva podendo ser considerado um biocatalisador promissor na hidrólise de antocianinas e, consequentemente, na produção de vinhos brancos e rosé a partir de diferentes variedades de uvas.

Apesar do derivado BGL-MANAE ser menos estável a 50 °C que o derivado BGL-ConA, a maior eficiência de hidrólise de antocianinas pelo BGL-MANAE pode ser explicada pelas hiperativações dos derivados. BGL-MANAE foi hiperativado 10 vezes enquanto o derivado BGL-ConA foi hiperativado apenas 3 vezes em relação a enzima livre.

Em indústrias de sucos de frutas, particularmente, BGLs podem ser utilizadas em processos de maceração ou liquefação, participando da degradação da celulose e da liberação de aromas através da hidrólise de precursores glicosilados. BGLs que hidrolisam antocianinas são utilizadas na produção de vinhos brancos, ou na produção de vinhos rosados, onde o processo de maceração pode ser prolongado, e o excesso de cor removido através de tratamento enzimático (Barbagallo *et al.*, 2007; Palmeri *et al.*, 2007; Sánchez-Torres *et al.*, 1998; Vernocchi *et al.*, 2015).

Pode-se afirmar, portanto que o derivado BGL-MANAE pode ser considerado um biocatalisador promissor para a hidrólise de antocianinas e, conseqüentemente, para a produção de vinhos brancos com reduzida coloração avermelhada e/ou de vinhos rose a partir de uma grande variedade de uvas vermelhas. Os resultados obtidos nesse trabalho confirmam que a busca por novas fontes de enzimas, assim como estudos da modulação da atividade, do aumento da estabilidade e da tolerância em presença de glucose e etanol através da imobilização enzimática, pode ser interessante para aplicação em diferentes áreas da biocatálise.

Este trabalho, pelo o que sabemos, é o primeiro a usar BGLs imobilizadas em diferentes suportes com aplicação na clarificação de sucos de uva e vinhos, podendo ser considerado um trabalho inovador, e de grande importância para a indústria de alimentos e bebidas.

Conclusões

- ✓ Uma BGL da família GH3 de *M. pulchella*, foi eficientemente purificada com um fator de purificação 6,32 e recuperação de aproximadamente 35 vezes;
- ✓ A análise de dicroísmo circular e da modelagem da BGL purificada foi condizente com estruturas de BGLs e o dicroísmo circular estimou em 25% α -hélice, e 20% folha β ;
- ✓ Os parâmetros cinéticos da BGL, frente ao substrato pNPG foram calculados e a enzima apresentou K_m 0,33 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 13,67 (U/mg) e o K_{cat} igual a 26,6 s⁻¹ valores encontrados pelo *software* SigrafW;
- ✓ A enzima não sofreu ativação por íons metálicos;
- ✓ A temperatura e pH ótimos da BGL foi de 50°C e 6,0 nas condições do ensaio;
- ✓ A enzima foi termoestável por até 24 horas a 40 °C e manteve-se estável nos pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 mesmo depois de 24 horas;
- ✓ A enzima é glicosilada e a proporção de açúcar corresponde a 15% da massa final da BGL;
- ✓ A análise de dicroísmo circular da BGL estimou em 25% α -hélice, e 20% folha β e a modelagem da enzima revelou uma estrutura semelhante à beta-glucosidase 1 de *Aspergillus aculeatus* (20% de α -hélice e 19% de folha β);
- ✓ A enzima não apresentou inibição na presença de glucose;
- ✓ A celobiose e o BCAN foram investigados de forma conjunta através de um DCCR 2² e as variáveis apresentam apenas efeito quadrático na atividade enzimática;
- ✓ Os valores de atividade encontrados experimentalmente e preditos pela equação mostram que a equação encontrada é preditiva.
- ✓ A superfície de resposta obtida através do modelo reduzido demonstra que a maior atividade se dá no centro do gráfico, correspondente aos pontos centrais 0,6% de celobiose e 4% de BCAN.
- ✓ O extrato enzimático teve melhor potencial de hidrólise sobre o BCev;
- ✓ BGLs foram eficientemente imobilizadas, a partir do extrato bruto, em pH 7,0, em suportes de interação aniônica e afinidade;

- ✓ A imobilização em todos os suportes testados melhorou a estabilidade térmica da enzima a 40 °C, 50 °C e 60 °C e a estabilidade ao pH em todos os pH testados;
- ✓ A imobilização em todos os suportes testados aumentou a tolerância da enzima na presença de diferentes concentrações de glucose e etanol;
- ✓ Quando imobilizada em suporte MANAE-agarose, a BGL foi hiperativada 10 vezes e quando imobilizada em Concanavalina A-Sepharose a enzima foi hiperativada 3 vezes;
- ✓ Os derivados tiveram pelo menos 20 ciclos de reuso mantendo mais de 50% da atividade inicial;
- ✓ Os derivados de BGL foram capazes de hidrolisar as antocianinas presentes no suco de uva e no vinho;
- ✓ BGL-MANAE foi mais eficiente que BGL-ConA na clarificação de vinhos e sucos de uva podendo ser considerado um biocatalisador promissor na hidrólise de antocianinas e, consequentemente, na produção de vinhos brancos e rose a partir de diferentes variedades de uvas;
- ✓ BGL mostrou-se uma enzima com grande potencial de aplicação biotecnológica, podendo ser utilizada na indústria de alimentos e bebidas e de biocombustível.

Referências bibliográficas

- Arévalo-Villena, M., Úbeda Iranzo, J. & Briones Pérez, A. Enhancement of aroma in white wines using a β -glucosidase preparation from *Debaryomyces pseudopolymorphus* (A-77). **Food Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 181-194, 2007.
- Baffi, M. A., Tobal, T., Lago, J. H. G., Boscolo, M., Gomes, E., & Da-Silva, R. Wine aroma improvement using a β -glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 493-501, 2013.
- Barbagallo, R. N., Spagna, G., Palmeri, R., & Torriani, S. Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 3, p. 292-296, 2004.
- Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisan, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.
- Belancic, A., Gunata, Z., Vallier, M. J., & Agosin, E. (2003). β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1453-1459, 2003.
- Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- Bhat, M. K., & Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3, p. 583-620, 1997.
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- Burmeister WP, Cottaz S, Rollin P, Vasella A, Henrissat B. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39385-39393, 2000.
- Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J. P., & Günata, Z. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 581-587, 2003.
- Cadete, R. M., Fonseca, C., & Rosa, C. A. Novel Yeast Strains from Brazilian Biodiversity: Biotechnological Applications in Lignocellulose Conversion into Biofuels. **Biofuels in Brazil**. Springer International Publishing, p. 255-279, 2014.
- Cairns, J. R. K., & Esen, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389-3405, 2010.

Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 1, p. 233-238, 2009.

Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., & Qu, Y. Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 444-449, 2010.

Cooney, D. G., & Emerson, R. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities, and classification. In: **Thermophilic fungi. An account of their biology, activities, and classification**. Donald George Cooney; Ralph Emerson, San Francisco ; London : W.H. Freeman and Co Editors., 1964

Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., & Stillman, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 3, p. 1316-1323, 1989.

CTBE, 2010. Low Impact Mechanization for No-Till Farming. <www.bioetanol.org.br/english/>. Acesso em: novembro de 2015.

da Silva, A. S. A., Teixeira, R. S. S., de Oliveira Moutta, R., Ferreira-Leitão, V. S., de Barros, R. D. R. O., Ferrara, M. A., & da Silva Bon, E. P. Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production. In: **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, Anuj K. Chandel and Silvio Silvério da Silva (Editors) INTEC, Croatia, chapter 3, p. 47-88, 2013.

da Silva, T. M., Pessela, B. C., da Silva, J. C. R., Lima, M. S., Jorge, J. A., Guisan, J. M., & Maria de Lourdes, T. M. Immobilization and high stability of an extracellular β -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p. 95-100, 2014.

Daly, R., & Hearn, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005.

Egli, T., Van Dijken, J. P., Veenhuis, M., Harder, W., & Fiechter, A. Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. **Archives of Microbiology**, v. 124, n. 2-3, p. 115-121, 1980.

Fernandez-Lorente, G.; Godoy, C. A.; Mendes, A. A.; Lopez-Gallego, F.; Grazu, V.; De Las Rivas, B.; Palomo, J. M.; Hermoso, J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 9, p. 2553-2561, 2008.

- Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Cabrera, Z.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 242-250, 2007.
- Filice, M., Marciello, M., Betancor, L., Carrascosa, A. V., Guisan, J. M., & Fernandez-Lorente, G. Hydrolysis of fish oil by hyperactivated *Rhizomucor miehei* lipase immobilized by multipoint anion exchange. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 4, p. 961-968, 2011.
- Fu, Z., & Holtzapple, M. T. Consolidated bioprocessing of sugarcane bagasse and chicken manure to ammonium carboxylates by a mixed culture of marine microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2825-2836, 2010.
- Gargouri, M., Smaali, I., Maugard, T., Legoy, M. D., & Marzouki, N. Fungus β -glucosidases: immobilization and use in alkyl- β -glycoside synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, n. 1, p. 89-94, 2004.
- Goldstein, I. I., & Poretz, R. D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. **The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**, p. 233-247, 2012.
- Gottschalk, L. M. F., Oliveira, R. A., & da Silva Bon, E. P. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1, p. 72-78, 2010.
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Janbon, G., Arnaud, A., & Galzy, P. A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2336-2340, 1996.
- Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., & Del Rio, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 195204, p. 187204, 2005.
- Guisan, J. M. (2006). Immobilization of enzymes as the 21st century begins. **Immobilization of Enzymes and Cells**, p. 1-13, 2006.
- Guisán, J. M., Polo, E., Aguado, J., Romero, M. D., Alvaro, G., & Guerra, M. J. Immobilization-stabilization of thermolysin onto activated agarose gels. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 15, n. 3, p. 159-173, 1997.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. **Journal of Chromatography A**, v. 331, p. 83-90, 1985.
- Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Tapiero, C., & Cordonnier, R. E. Hydrolysis of grape monoterpenyl beta-D-glucosides by various beta-glucosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 1232-1236, 1990.

- Günata, Z., & Vallier, M. J. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 3, p. 219-223, 1999.
- Gunata, Z., Bitteur, S., Brillouet, J. M., Bayonove, C., & Cordonnier, R. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 139-149, 1988.
- Harnpicharnchai, P., Champreda, V., Sornlake, W., & Eurwilaichitr, L. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 2, p. 61-69, 2009.
- Hashimoto, W., Miki, H., Nankai, H., Sato, N., Kawai, S., & Murata, K. Molecular Cloning of Two Genes for β -d-Glucosidase in *Bacillus* sp. GL1 and Identification of One as a Gellan-Degrading Enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, n. 1, p. 1-9, 1998.
- Hayworth, D. Covalent Immobilization of Affinity Ligands. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/method/covalent-immobilization-approaches>>. Acesso em: Fevereiro de 2016.
- Hemingway, K. M., Alston, M. J., Chappell, C. G., & Taylor, A. J. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 3, p. 283-286, 1999.
- Henrissat, B., & Bairoch, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, n. Pt 2, p. 695, 1996.
- Hernandez, L. F., Espinosa, J. C., Fernandez-Gonzalez, M., & Briones, A. β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 171-176, 2003.
- Iembo, T., Da-Silva, R., Pagnocca, F. C., & Gomes, E. Production, characterization and properties of beta-glucosidase and beta-xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, v. 38, n. 6, p. 639-643, 2001.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, 2015.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.
- Korotkova, O. G., Semenova, M. V., Morozova, V. V., Zorov, I. N., Sokolova, L. M., Bubnova, T. M., & Sinitsyn, A. P. Isolation and properties of fungal β -glucosidases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 5, p. 569-577, 2009.
- Krammer, G., Winterhalter, P., Schwab, M., & Schreier, P. Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of *Prunus* species: apricot (*P. armeniaca*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 4, p. 778-781, 1991.

- Krogh, K. B., Harris, P. V., Olsen, C. L., Johansen, K. S., Hojer-Pedersen, J., Borjesson, J., & Olsson, L. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 143-154, 2010.
- Le Traon-Masson, M. P., & Pellerin, P. Purification and characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 5, p. 374-382, 1998.
- Leone, F. A., Baranauskas, J. A., Furriel, R. P. M., & Borin, I. A. SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 6, p. 399-403, 2005.
- Li, X., Pei, J., Wu, G., & Shao, W. Expression, purification and characterization of a recombinant β -glucosidase from *Volvariella volvacea*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 18, p. 1369-1373, 2005.
- Lima, M. A., Gomez, L. D., Steele-King, C. G., Simister, R., Bernardinelli, O. D., Carvalho, M. A., & Polikarpov, I. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.
- Liu, S. Q. Malolactic fermentation in wine-beyond deacidification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 589-601, 2002.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.
- Maeda, R. N., Serpa, V. I., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Santa Anna, L. M. M., De Castro, A. M., & Polikarpov, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.
- Maicas, S., & Mateo, J. J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 322-335, 2005.
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 44-49, 2015.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Thangavelu, K. P., & Heese, K. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 298-309, 2012.

- Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., & Vallés, S. A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 95-103, 2000.
- Marco, J. D. C. I. D. Produção e caracterização de mananase de *Aspergillus foetidus* cultivado em casca do grão da soja. 2014. Dissertação de mestrado apresentado a Universidade de Brasília, DF, 72 páginas, 2014.
- Martino, A., Schiraldi, C., Di Lazzaro, A., Fiume, I., Spagna, G., Pifferi, P. G., & De Rosa, M. Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.36, n.1, p. 93-102, 2000.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- Mateo, C., Pessela, B. C., Fuentes, M., Torres, R., Ortiz, C., López-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R. Very strong but reversible immobilization of enzymes on supports coated with ionic polymers. **Immobilization of Enzymes and Cells**, p. 205-216, 2006.
- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- Mateo, J. J., & Jiménez, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1, p. 557-567, 2000
- Matsuo, M., & Yasui, T. Properties of xylanase of *Malbranchea pulchella* var. sulfurea no. 48. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 839-841, 1985.
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., & Jiranek, V. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5715-5731, (2004).
- Mendes Ferreira, A., Climaco, M. C., & Mendes Faia, A. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - a preliminary study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 67-71, 2001.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- Moredo, N., Lorenzo, M., Domínguez, A., Moldes, D., Cameselle, C., & Sanroman, A. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 665-669, 2003.

- Nagatomo, H., Matsushita, Y. I., Sugamoto, K., & Matsui, T. Preparation and properties of gelatin-immobilized β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 128-136, 2005.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.
- Nascimento, C. V., Souza, F. H. M., Masui, D. C., Leone, F. A., Peralta, R. M., Jorge, J. A., & Furriel, R. P. M. Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated β -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 53-62, 2010.
- Ong, E., Gilkes, N. R., Miller, R. C., Antony, R., Warren, J., & Kilburn, D. G. Enzyme immobilization using a cellulose-binding domain: properties of a β -glucosidase fusion protein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 1, p. 59-65, 1991.
- Ozaki, H., and Yamada K. Isolation of *Streptomyces* sp. producing glucose-tolerant β -glucosidases and properties of the enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 979-987, 1992.
- Paavilainen, S., J. Hellman, and T. Korpela. Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new beta-glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 927-932, 1993.
- Palmeri, R., & Spagna, G. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 382-389, 2007.
- Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 775-783, 2002.
- Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Segura, R. L., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M. Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Immobilization of Enzymes and Cells**, p. 143-152, 2006.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., & Soccol, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000.
- Pauly, M., & Keegstra, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 559-568, 2008.
- Pereira, M. G., Guimarães, L. H. S., Furriel, R. P. M., Polizeli, M. L. T.M., Terenzi, H. F., & Jorge, J. A. Biochemical properties of an extracellular trehalase from *Malbranchea pulchella* var. *Sulfurea*. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 809-815, 2011.

- Pérez, A. G., Cert, A., Ríos, J. J., & Olías, J. M. Free and glycosidically bound volatile compounds from two banana cultivars: Valery and Pequena Enana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 4393-4397, 1997.
- Pérez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T. D. L. R., & Martinez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.
- Rajoka, M. I. Double mutants of *Cellulomonas biazotea* for production of cellulases and hemicellulases following growth on straw of a perennial grass. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 1063-1066, 2005.
- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Achaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., & Mori, Y. *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. **Biomass Now-Cultivation and Utilization**, chapter 16, 2013.
- Ribeiro, L. F., De Lucas, R. C., Vitcosque, G. L., Ribeiro, L. F., Ward, R. J., Rubio, M. V., & Jorge, J. A. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.
- Riou, C., Salmon, J. M., Vallier, M. J., Günata, Z., & Barre, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3607-3614, 1998.
- Rizzatti, A. C.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F.; Rechia, C. G.; Polizeli, M. L. Purification and properties of a thermostable extracellular beta-D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.
- Rodrigues, R. C.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Torres, R.; Fernandez-Lafuente, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.
- Sabbani, S.; Hedenstrom, E.; Nordin, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1-2, p. 1-9, 2006.
- Saha, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.
- Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., & Ramón, D. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 354-360, 1998.
- Santer, J. E., & Günata, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 509-521, 2004.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. Hemicelluloses. **Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263, 2010.
- Seabra, J. E., Tao, L., Chum, H. L., & Macedo, I. C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1065-1078, 2010.
- Shen, X., & Xia, L. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1363-1367, 2004.
- Shewale, J. G. β -Glucosidase: its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. **International Journal of Biochemistry**, v. 14, n. 6, p. 435-443, 1982.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507. 2013.
- Soccol, C. R., de Souza Vandenberghe, L. P., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., & da Silva Bon, E. P. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.
- Solov'eva, I. V., Okunev, O. N., Vel'kov, V. V., Koshelev, A. V., Bubnova, T. V., Kondrat'eva, E. G., ... & Sinitsyn, A. P. The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. **Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 141-146, 2005.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Pifferi, P. G., Blanco, R. M., & Guisan, J. M. Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 2, p. 63-69, 2000.
- Spiridonov, N. A., & Wilson, D. B. Cloning and biochemical characterization of BglC, a β -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. **Current Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 295-301, 2001.
- Srebotnik, E., Messner, K., & Foisner, R. Penetrability of white rot-degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2608-2614, 1988.
- Srere, P. A., & Uyeda, K. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. **Methods in Enzymology**, v. 44, p. 11-19, 1975.
- Sumner, J. B., Gralén, N., & Eriksson-Quensel, I. B. The molecular weights of urease, canavalin, concanavalin A and concanavalin B. **Science**, v. 87, n. 2261, p. 395-396. 1938.

- Szklarz, G. D., Antibus, R. K., Sinsabaugh, R. L., & Linkins, A. E. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, p. 234-240, 1989.
- Tanaka, H., Itakura, S., & Enoki, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 57-70, 1999.
- Tomme, P., Warren, R. A. J., & Gilkes, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 37, n. 1, p. 1-81, 1995.
- Tsukada, T., Igarashi, K., Yoshida, M., & Samejima, M. Molecular cloning and characterization of two intracellular β -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 807-814, 2006.
- Vernocchi, P., Patrignani, F., Ndagijimana, M., Lopez, C. C., Suzzi, G., Gardini, F., & Lanciotti, R. Trebbiano wine produced by using *Saccharomyces cerevisiae* strains endowed with β -glucosidase activity. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1565-1571, 2015.
- Walter, A., & Ensinas, A. V. Combined production of second-generation biofuels and electricity from sugarcane residues. **Energy**, v. 35, n. 2, p. 874-879, 2010.
- Wang, L., Yan, W., Chen, J., Huang, F., & Gao, P. Function of the iron-binding chelator produced by *Coriolus versicolor* in lignin biodegradation. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 51, n. 3, p. 214-221, 2008.
- Wang, Y.; Hsieh, Y. L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 309, n. 1-2, p. 73-81, 2008.
- Wertz, J. L., Mercier, J. P., & Bédoué, O. Cellulose science and technology. **CRC Press**, 2010.
- Williams, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., & Massy-Westropp, R. A. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2013-2020, 1982.
- Yang, S., Wang, L., Yan, Q., Jiang, Z., & Li, L. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1247-1252, 2009.
- Zollner H. Handbook of enzyme inhibitors. **VCH, Weinheim**, p 94-95, 1989.

Anexos

Anexo I - Meios de cultivo

Meio Emerson

Extrato de levedura	0,4 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
MgSO ₄	0,05 g
Fonte de carbono	1,0 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Para os experimentos utilizando meio Emerson foram usados 75% de água destilada e 25% de água de torneira.

Meio Lummy

Extrato de levedura	0,4 g
MgSO ₄	0,05 g
Na ₂ HPO ₄	0,9 g
Ácido Cítrico	0,35 g
Fonte de carbono	1,0 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Para os experimentos utilizando meio Lummy foram usados 75% de água destilada e 25% de água de torneira.

Anexo II - Soluções e géis de poliacrilamida para eletroforese

Tampão de corrida SDS-PAGE 1 X

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris base)	3,028 g
Glicina	14,42 g
SDS	10 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH final foi 8,3.

Tampão de amostra 2X para SDS-PAGE

Azul de bromofenol	0,2 g
SDS	4,0 g
Glicerol	20 mL
Tampão Tris/HCl 100 mM, pH 6,8 q.s.p.	100 mL

Gel para eletroforese SDS-PAGE

Gel separador 12%

Água destilada	1,6 mL
Mix de acrilamida 30%	2,0 mL
Tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8	1,3 mL
SDS 10%	50 µL
Persulfato de amônio 10%	50 µL
TEMED	2 µL

Gel de empilhamento 5%

Água destilada	2,1 mL
Mix de acrilamida 30%	500 µL
Tampão Tris/HCl 1,0 M, pH 6,8	380 µL
SDS 10%	30 µL
Persulfato de amônio 10%	30 µL
TEMED	5 µL

O gel separador foi aplicado cuidadosamente, sem formar bolhas. A bandeja com o gel foi completada com água destilada, que permaneceu acima do gel garantindo uma interface plana entre os dois géis. Após a polimerização, a água foi retirada e o excesso de água seco com papel filtro. Em seguida, foi aplicado o gel de empilhamento, preparado na hora, e encaixado o pente para a obtenção dos poços de aplicação das amostras.

Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida 30%

Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Coloração por solução de *Coomassie Brilhante Blue*Solução de *Coomassie Brilhante Blue*

Ácido fosfórico	10 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
<i>Coomassie Brilhante Blue</i> G-250	0,12 g
Metanol	20 mL
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL

Para a preparação dessa solução, primeiro diluiu-se o ácido fosfórico e o sulfato de amônio em água. Em seguida, adicionou-se o *Coomassie* e, por fim, o metanol, corrigindo o volume final com água milli-Q.

Solução descorante

Ácido acético glacial	80 mL
Etanol	250 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Para a coloração, o gel ficou imerso na solução de *Coomassie* durante uma noite, sob agitação orbital (50 rpm). Decorrido esse tempo, o gel foi descorado através de sucessivas lavagens com a solução descorante até a visualização das bandas de proteínas.

Anexo III

Sequência de BGL de *Aspergillus fumigatus* Af293 da família GH3 identificada por espectrometria de massas. Em negrito estão os peptídeos obtidos que foram analisados utilizando o software MASCOT (Matrix Science, London, UK) e o banco de dados NCBI nr/fungi.

```
>gi|70990956|ref|XP_750327.1| beta-glucosidase [Aspergillus fumigatus Af293]
```

```
*MRFGWLEVAALTAASVANAQVFDNSHGNNQELAFSPPFYPSPWADGQGEWADAHRAVEIVSQMTLAEK
VNLTGTGWEMDRCVGQTGSVPRLGINWGLCGQDSPLGIRFSDLNSAFPAGTNVAATWDKTLAYLRGKAM
GEEFNDKGVDILLGPAAGPLGKYPDGGRIWEGFSPDPALTGVLFATETIKGIQDAGVIATAKHYILNEQE
HFRQVGEAQGYGYNITETISSNVDDKTMHELYLWPFADAVRAGVGAVMCSYNQINNSYGCQNSQTLNKLK
KAELGFQGFVMSDWSAHHSGVGAALAGLDMSMPGDISFDDGLSFWGTNLTVSVLNGTVPAPRVDDMAVRI
MTAYYKVGDRDLRIPPNFSSWTRDEYGWEHSAVSEGAWTKVNDFVNVQRSHSQIIREIGAASTVLLKNT
GALPLTGKEVKVGVVLGEDAGSNPWGANGCPDRGCDNGLTAMAWGSGTANFPYLVTPAQAIQREVISNGGN
VFAVTDNGALSQMADVASQSSVSLVFVNADSGEGFISVDGNEGDRKNLTLWKNGEAVIDTVVSHCNNTIV
VIHSVGPVLIDRWYDNPNTAIIWAGLPGQESGNSLVDVLYGRVNPSAKTPFTWGKTRESYGAPLLTEPN
NGNGAPQDDFNEGVFIDYRHFDKRNETPIYEFHGHSYTTFGYSHLRVQALNSSSSAYVPTSGETKPAPT
YGEIGSAADYLYPEGLKRITKFIYPWLNSTDLEDSSDDPNYGWQDSEYIPEGARDGSPQPLLKAGGAPGG
NPTLYQDLVRVSATITNTGNVAGYEVQLYVSLGGPNEPRVVLRKFDRIFLAPGEQKVWTTTLNRRDLAN
WDVEAQDWVITKYPKKVHVHGSSSRKLPLRAPLPRVY
```

Anexo IV

Alinhamento da β -glucosidase 1 de *Aspergillus aculeatus* com a BGL com a de *M. pulchella*.

>BGL *M. pulchella*

```
MTLVEKVNVTGIGWQMGLCVGNTGPATSVGFPSLCLQDGPLGIRFADNITAFPAAGVTVAATWDRELMYRRGKALGEEARLKGVNVLGSPSVGPISLPA
GGRNWEGFGSDPVLQGGIAAAETIRGIQANGVMATAKHVVLNEQEHFRM-----PNEWGI PHALSANIDDRTLHEVYIWPFFADSVRAGVASVMCSYQMINN
SYGCSNSLLMNRILKNELGFGQGFVQSDWWAQQSGVASALAGLDMTPGGGPRTYGTSYWGGNLTLAALNASLPMERLNDMVTRIVAAWYQLNQDSWPKP
PPDGDGGPNFSSWTKEELGRHLHQSDDDDAIGVVKFVNQAQGNHSLVVRTVAAESTVLLKNEGGFLPLSRDGPSTSGKKYRVGIFGEDAGPGKG-PNFCR
DRGCNQGTLAGSWGSGAVDFPYLITPWKALKEAFSNETVAI---SGYLTNEVADEDLVDQLCIVFANADAGEGYLSDSDIHGDRNDLRLQKDTDKLVQR
VAKKCGNGAGSTVVVHISVGPVILESWIELPGIQAVLLANLPGQESGNSLVDVLFQGDVDASGRLPYTIGRSEDDYGPDSKVLYKALEPVPQKNFSGLYI
DYRYFDKHLGIAPRYEFGFGLSYTSFSLSNLIISPLQEKSLPRPRPAVPEVLPTTYDNTIPDPRSALEFPDEFRLSKYIYPYINSVDDVRQGYPPYPEGY
DTAQPPSPAGGGEGGNPSLYEPFVNVTVTQNTGPRTGKEVVQLYLSFPDNVTDVLDGEDEERGLGQSSERIDFPVRVLRNFKVQLAPEESTTVEMSLT
RRDLSYWSSKRQNWVMPVKGFRIWVGRSSRDPLSGEF
```

>c4iidB_

```
MTLDEKVNLTGTTGWELEKCVGQTGGVPRNLNIGGMCLQDPSPLGIRSDSDYNFAFPAGVNVAATWDKNLAYLRGQAMGQEFSDKGIDVQLGPAAGPLGRSPD
GGRNWEGFSPDPALTGVLFAETIKGIQDAGVVATAKHVILNEQEHFRQVAEAGYGFNISDTISSNVDDKTICHEMYLWPFADAVRAGVGAIMCSYNQINN
SYGQNSYTLNKLKAELEGFQGFVMSDWGAHHSVGVSALAGLDMSPGDDITFDS-ATSWGTNLTIAVLNGTVPQWRVDDMAVRIMAAAYYKVRDRLYQP
PNFSSWTRDEYGF-----KYFYPOEGPYEKNHFNQVNRHSEVIRKLGADSTVLLKNN-NALPLTG-----KERKVAILEG DAGSNSY GANGCS
DRGCDNGTLAMAWGSGTAEFPLYLTPEQAIQAEVLKHKGSVYAITDNWALSQVETLAKQASVSLVFNVS DAGEGYISVDGNEGDRNNLT LWKNGDNLIKA
AANNCNN---TIVVIHISVGPVLVDEWYDHPNVTAI LWAGLPQESGNSLADVLYGRVNP GAKSPFTWGKTREAYGDYLVRELNNGNAPQDDFSEGVFI
DYRGFDKRNETPIYEFHGGLSYTTFNYSGLHIQVLNATETGAAPTFGQVGNASDYVYPEGLTRISKFIYPWLNSTD LKASSGDPYGVDTAEHVPEGATD
GSPQPVLPAGGGSGGNPRLYDELIRVSVTVKNTGRVAGDAVPQLYVSLG-----GPNEPKVVLRRKFDRLTLKPSEETVWTTTLT
RRDLSNWDVAAQDWVIT-SYPKKVHVHGSSSRQLPLHAAL
```