Juliana da Conceição Infante

**Imobilização e caracterização bioquímica de
mananases e pectinases produzidas por
Aspergillus brasiliensis: potencial para
aplicação na clarificação de sucos de frutas**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Área de concentração Bioquímica

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

Ribeirão Preto

2019

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.

Infante, Juliana da Conceição.

Imobilização e caracterização bioquímica de mananases e pectinases produzidas por *Aspergillus brasiliensis*: potencial para aplicação na clarificação de sucos de frutas. Ribeirão Preto, 2019.

128 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. Mananase. 2. Pectinase. 3. *Aspergillus brasiliensis*. 4. Imobilização.
5. Caracterização bioquímica. 6. Cascas de soja.

AGRADECIMENTOS

À minha família,

Meus pais João Carlos e Sandra, responsáveis pela minha existência. Pelo amor, carinho e dedicação que tiveram ao decorrer da minha formação pessoal e educacional, sempre me apoiando para seguir o meu sonho mesmo que a 2 mil Km de distância. À minha irmã Roberta, cunhado Alexandre, meu irmão Marcus Vinicius e cunhada Thais por todo carinho, amizade e momentos de conversas e diversão. Aos meus sobrinhos Letizia Marie e Rafael Henrique por simplesmente existirem na minha vida. Amo todos vocês!

À Profa. Dra. Maria de Lourdes T. de M. Polizeli pela orientação, paciência e apoio durante esses 4 anos de convivência. Por acreditar no meu potencial e crescimento, contribuindo muito para minha formação.

A todos os amigos e técnicos do laboratório: Alex Graça, Ana Scarcella, Ana Vici, Emanuelle Neiverth, Enrico Spiropulos, Guilherme Aranha, Inaiá Ramos, José Carlos, Luciana Zioti, Lummy Monteiro, Malena Martinez, Mariana Cereia, Mariana Rocha, Marita Gimenez, Maurício de Oliveira, Mônica Nozawa, Paula Zaghetto, Paulo Heinen, Rosy de Lucas, Tássio Brito, Thiago Pasin e Vanessa Pinheiro, pela amizade, convivência, troca de conhecimentos, além de muitos momentos de diversão. Nesses 4 anos conquistei grandes amizades para uma vida.

Ao meu amado companheiro Fábio William, pela força, positividade, muitos momentos de conversas reflexivas e divertidas, amizade, encorajamento, paciência, cumplicidade, muito carinho e amor. Por me apoiar nos meus projetos e por fazer parte dessa caminhada. Juntos seremos grandes!

Aos amigos especiais que conquistei no Kilombo crossfit e que fizeram parte de uma nova fase da minha vida: Bruno Marafon, Daniele Carvalho, Fábio William, Ítalo Castro, Kelly Duarte, Leticia Oliveira, Lucileni Bernardi (Leni), Luciane Caldeira (Bombom), Marjorie Pontelli e Natália Costa, pela força que sempre me deram dentro e fora do nosso Kilombo.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram, perto ou longe, com suas conversas, risadas e pensamentos positivos. Em especial a essas mulheres lutadoras e feministas: Antonielle Monclaro, Vanessa Pinheiro, Kelly Duarte, Rosy de Lucas, Malena Martinez, Natália Costa, Lu Bombom, Paula Zaghetto, Daniele Carvalho, Daniella Ferreira (Preta) e Marjorie Pontelli. “Mulheres, nós juntas podemos botar o mundo abaixo, balançar todas as estruturas. Vocês me lembram que somos incríveis e livres. Eu lembro vocês que somos cura. Somos mulheres que lutam”. (Adaptado de Ryane Leão – Tudo nela brilha e queima).

Aos colaboradores da Espanha Dr. Benevides Pessela, Dra. Glória Fernandez-Lorente e Dr. José Manoel Guisán pela oportunidade de estágio no Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación - CIAL (CSIC - Madri, Espanha) e orientação.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP pela qualidade e estrutura oferecidas para o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da minha banca, muito obrigada por aceitarem participar da minha defesa de Doutorado.

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

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

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

Clarice Lispector

"Quaisquer que sejam as condições que eu tenha que enfrentar, sei que elas representam o próximo degrau na minha evolução. Aceitarei de bom grado todos os desafios, porque sei que dentro de mim estão a inteligência para compreender, o amor para aceitar e o poder para superar".

Paramahansa Yogananda

RESUMO

INFANTE, Juliana da Conceição. **Imobilização e caracterização bioquímica de mananases e pectinases produzidas por *Aspergillus brasiliensis*: potencial para aplicação na clarificação de sucos de frutas.** Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Mananases e pectinases são carboidrases que estão ganhando significativo interesse na área biotecnológica devido ao aumento da demanda pela utilização de fontes biorenováveis. Em vista disso, foram selecionados 4 fungos potenciais produtores de mananase (*Talaromyces pinophilus*, *Aspergillus unguis*, *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus clavatus*), que também apresentaram elevadas atividades de pectinase. O fungo *Aspergillus brasiliensis* foi definido para dar continuidade ao estudo e apresentou melhor perfil de atividade de mananase a 70 °C em pH 4,0 (2,516 UI/mL) e de pectinase a 50 °C em pH 3,5 (4,168 UI/mL). Quando testados em relação a estabilidade ao pH a atividade de mananase foi ativada em 5 horas de incubação e se manteve estável durante 24 horas nos pHs 3,0 a 7,0. A pectinase se manteve estável durante 4 horas de incubação diminuindo sua eficiência após 5 horas em todos os pHs testados. A mananase apresentou termoestabilidade a 50 °C e 60 °C durante 24 horas e pectinase a 40 °C durante 24 horas. O extrato bruto extracelular (EbE) foi imobilizado em resinas de troca aniônica DEAE-Celulose e Q-Sefarose, no qual apresentou taxa de imobilização de mananase de 94,5 % em DEAE-Celulose e 93,8 % em Q-Sefarose e taxa de imobilização de pectinase de 75,2 % em DEAE-Celulose e 86,5 % em Q-Sefarose. HgCl₂ inibiu as atividades de mananase e pectinase presentes no EbE e nos derivados DEAE-Celulose e Q-Sefarose, que pode indicar a presença de sítios tióis próximos ao sítio catalítico. O agente quelante EDTA hiperativou 210 % a pectinase no EbE apresentando característica de metaloproteína, porém inibiu a mananase no EbE e nos derivados DEAE-Celulose e Q-sefarose. As mananases e pectinases foram avaliadas em relação a dessorção em diferentes concentrações de NaCl, no qual o derivado Q-Sefarose_Pectinase apresentou forte ligação ao suporte. Com intuito de analisar o potencial do efeito das enzimas imobilizadas nesse estudo (derivado QsMP), foram realizados testes no processo de clarificação de sucos de frutas. QsMP apresentou eficiência na redução da turbidez do suco de maçã na primeira aplicação e nos dois reusos (45 %, 60 % e 49 % respectivamente), no entanto no suco de uva apresentou uma redução de apenas 20 % somente no primeiro uso, perdendo sua eficiência nos reusos seguintes. Podemos concluir nesse estudo que a imobilização aumentou a atividade das mananases e pectinases estudadas, além do aumento da temperatura, pH, estabilidade ao pH e testes de reuso no processo de clarificação de sucos de frutas.

Palavras-chave: cascas de soja, mananase, pectinase, *Aspergillus brasiliensis*, imobilização, caracterização bioquímica.

ABSTRACT

INFANTE, Juliana da Conceição. **Immobilization and biochemical characterization of mannanases and pectinases produced by *Aspergillus brasiliensis*: potential application in fruit juice clarification.** Thesis (PhD in Biochemistry) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Mannanases and pectinases are carbohydrases that are gaining great biotechnological interest due to demand for biorenewable catalysts sources. In this context 4 mannanase-producing fungi (*Talaromyces pinophilus*, *Aspergillus unguis*, *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus clavatus*), which were also identified as pectinase producers, were selected. The fungus *Aspergillus brasiliensis* was chosen to continue the study, as it presented a better mannanase production profile, with an activity of 2,51 IU / mL at 70 ° C and pH 4.0, and 4.16 IU / mL of pectinase at 50 ° C and pH 3.5. When tested for pH stability the mannanase activity was activated within 5 hours of incubation and remained stable for 24 hours in pHs 3.0 to 7.0. The pectinase was stable for 4 hours incubation, decreasing its efficiency after 5 hours in all pHs tested. The mannanase was thermostable at 50°C and 60°C for 24 hours and the pectinase at 40°C for 24 hours. The extracellular crude extract (EbE) was immobilized in DEAE-Cellulose and Q-Sepharose anion exchange resins. The rate of EbE immobilization was 94.5% for mannanase in DEAE-Cellulose and 93.8% in Q-Sepharose. For pectinase immobilization the rate was 75% in DEAE-Cellulose and 86.5% in Q-Sepharose. HgCl₂ inhibited the mannanase and pectinase activities in EbE and in DEAE and Q-Sepharose derivatives. This may indicate the presence of thiol sites near the catalytic site. EDTA chelating agent hyperactivated 210% the pectinase present in EbE, exhibiting metalloprotein characteristics, but inhibited the mannanase in EbE, DEAE and Q-Sepharose derivatives. The resulting derivatives were evaluated for desorption at different concentrations of NaCl, in which the Q-Sepharose_Pectinase derivative showed a strong binding to the support. In order to analyze a potential application for the pectinase and mannanase immobilized in Q-Sepharose (QsMP derivative), were carried out tests in the clarifying fruit juices process. QsMP was efficient in the reduction of turbidity in apple juice in the first application and in two consecutive reuses (45%, 60% and 49% respectively), on the other hand, in grape juice it showed a turbidity reduction of only 20% in the first use, losing its efficiency in the following tests. We can conclude in this study that the immobilization improved mannanases and pectinases activities, in addition to the increase of temperature and pH, a better pH stability and the possibility of reuse in the clarification process of fruit juices.

Keywords: soybean husk, manannase, pectinase, *Aspergillus brasiliensis*, imobilization, biochemical carактерization.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal.....	3
Figura 2. Estrutura química da fibra de celulose.....	4
Figura 3. Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose	4
Figura 4. Estrutura da lignina	5
Figura 5. Representação esquemática da estrutura da pectina	7
Figura 6. Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas.....	11
Figura 7. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação em substratos pécticos	15
Figura 8. Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas e enzimas requeridas para sua hidrólise	18
Figura 9. Casca de soja e Casca de soja moída..	21
Figura 10. Imobilização em suporte ativado com brometo de cianogênio.....	23
Figura 11. Microscopia óptica do fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	25
Figura 12. Seleção de fungos filamentosos produtores de mananase	45
Figura 13. Seleção dos meios de cultura para produção de mananase	46
Figura 14. Efeito do pH na atividade de mananase dos 4 fungos.....	48
Figura 15. Efeito da temperatura na atividade de mananase dos 4 fungos.....	49
Figura 16. Avaliação da termoestabilidade dos 4 fungos produtores de mananase	52
Figura 17. Estabilidade ao pH dos 4 fungos produtores de mananase	54
Figura 18. Efeito de sais e EDTA dos 4 fungos produtores de mananase.....	55

Figura 19. Diagrama de Venn ilustrando o efeito dos sais e EDTA dos 4 fungos produtores de mananase.....	56
Figura 20. Dosagens enzimáticas dos 4 fungos.....	57
Figura 21. Eletroforese SDS-PAGE 12% e zimografia	60
Figura 22. Efeito do pH e temperatura de mananase e pectinase do EbE de <i>A. brasiliensis</i>	62
Figura 23. Estabilidade ao pH e termoestabilidade de mananase e pectinase do EbE de <i>A. brasiliensis</i>	63
Figura 24. Efeito de sais metálicos e EDTA nas atividades de mananase e pectinase de <i>A. brasiliensis</i>	64
Figura 25. Cinética de Imobilização de mananase e pectinase em DEAE-Celulose.....	67
Figura 26. Cinética de imobilização de mananase e pectinase em Q-Sefarose.....	67
Figura 27. Cinética de imobilização de mananase e pectinase em CM-Celulose.	68
Figura 28. Efeito do pH de EbE_Mananase, EbE_Pectinase e dos derivados correspondentes as atividades de mananase e pectinase.	70
Figura 29. Efeito da temperatura de EbE_Mananase, EbE_Pectinase e dos derivados correspondentes as atividades de mananase e pectinase.	71
Figura 30. Avaliação da termoestabilidade de EbE_Mananase, EbE_Pectinase, DEAE_mananase, DEAE_Pectinase, Q-Sefarose_Mananase e Q-Sefarose_Pectinase..	73
Figura 31. Avaliação da estabilidade ao pH dos derivados EbE_Mananase, EbE_Pectinase, DEAE_mananase, DEAE_Pectinase, Q-Sefarose_Mananase e Q-Sefarose_Pectinase.....	75
Figura 32. Avaliação da dessorção dos derivados em diferentes pHs de DEAE_mananase, DEAE_Pectinase, Q-Sefarose_Mananase e Q-Sefarose_Pectinase..	76

Figura 33. Efeito de sais metálicos e EDTA nas atividades de EbE_Mananase, DEAE_mananase, Q-Sefarose_Mananase, EbE_Pectinase, DEAE_Pectinase e Q-Sefarose_Pectinase.	77
Figura 34. Diagrama de Venn ilustrando o efeito dos sais e EDTA para as atividades de mananase e pectinase.....	78
Figura 35. Dosagens enzimáticas dos derivados DEAE_mananase, DEAE_Pectinase, Q-Sefarose_Mananase e Q-Sefarose_Pectinase..	79
Figura 36. Avaliação da dessorção dos derivados em diferentes concentrações de NaCl..	80
Figura 37. Aplicação de QsMP na clarificação dos sucos de (A) maçã fuji e (B) uva integral.	82
Figura 38. Estimativa da turbidez dos sucos..	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Algumas das principais enzimas necessárias para a degradação da lignocelulose em monômeros..	12
Tabela 2. Enzimas pectinolíticas que degradam as cadeias de HG da pectina.....	14
Tabela 3. Enzimas mananolíticas e adicionais que degradam as cadeias de mananas. .	17
Tabela 4. Comparação das atividades de mananase expressas em UI/mL do EbE dos 4 fungos selecionados, a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford expressa em mg/mL e a atividade específica expressa em UI/mg.	50
Tabela 5. Atividades de mananase e pectinase do EbI e EbE de <i>A. brasiliensis</i>	59
Tabela 6. Taxa de imobilização de EbE_Man em diferentes suportes e atividade final dos derivados.....	69
Tabela 7. Taxa de imobilização de EbE_Pec em diferentes suportes e atividade final dos derivados.....	69

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BDA: Batata-dextrose-ágar

BSA: soroalbumina bovina

CM: carboximetil

CNBr: brometo de cianogênio

DEAE: dietilaminoetil

DNS: Ácido 3,5-dinitro-salicílico

EbE: Extrato bruto extracelular

EbI: Extrato bruto intracelular

EC: enzyme commission number

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

g: grama

kDa: kiloDaltons

mg: miligramas

min.: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

MM: massa Molecular

pH: Potencial Hidrogeniônico

q.s.p.: quantidade suficiente para

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate - Poliacrylamide Gel Eletrophoresis)

QsMP: Suporte de troca aniônica Q-Sefarose contendo mananases e pectinases imobilizadas

UI: Unidade Internacional

μL: Microlitros

°C: grau Celsius

%: por cento

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	XI
SUMÁRIO.....	XIII
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biomassa Lignocelulósica	2
1.2. Parede celular vegetal	2
1.2.1. Celulose	3
1.2.2. Lignina e extrativos vegetais	5
1.2.3. Pectina.....	6
1.2.4. Hemicelulose	8
1.3. Hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais	11
1.3.1. Celulases	13
1.3.2. Pectinases.....	13
1.3.3. Hemicelulases	16
1.4. Produção e aplicação industrial de Mananases.....	18
1.5. Produção e aplicação industrial de Pectinases.....	19

1.6.	Biomassa de soja como fonte indutora de produção de enzimas fúngicas	20
1.7.	Imobilização enzimática	21
1.7.1.	Imobilização irreversível por ligação covalente unipontual	22
1.7.2.	Imobilização reversível	24
1.8.	O fungo filamentoso <i>Aspergillus brasiliensis</i>	24
II.	OBJETIVOS	26
III.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1.	Seleção dos fungos e manutenção das cepas	29
3.2.	Condições de cultivo	29
3.3.	Meios de cultura	30
3.3.1.	Meio Adams	30
3.3.2.	Meio Khanna	30
3.3.3.	Meio Vogel	31
3.3.4.	Meio M5	31
3.3.6.	Meio Mls	32
3.3.7.	Meio Czapek	32
3.4.	Fonte de carbono e pré-tratamento	33
3.5.	Extração do extrato bruto intracelular (EbI) e extracelular (EbE)	33
3.6.	Dosagem da atividade enzimática	33
3.6.6.	Meio reacional	36

3.7.	Dosagem de proteínas.....	36
3.8.	Eletroforese.....	36
3.9.	Zimografia	37
3.10.	Imobilização enzimática	37
3.11.	Caracterização bioquímica.....	38
3.11.3.	Avaliação da termoestabilidade na atividade de mananase e pectinase	38
3.11.4.	Avaliação da estabilidade ao pH na atividade de mananase e pectinase.....	39
3.11.5.	Influência de sais e EDTA na atividade de mananase e pectinase	39
3.12.	Dessorção dos derivados em diferentes pHs.....	39
3.13.	Aplicação do derivado QsMP na clarificação de sucos	40
IV.	RESULTADOS	41
4.1.	Fonte de carbono e pré-tratamento	44
4.2.	Seleção de fungos produtores de mananases	44
4.3.	Seleção dos meios de cultura para produção de mananase dos 4 fungos	45
4.4.	Caracterização bioquímica	47
4.6.1.	Efeito do pH na atividade de mananase dos 4 fungos	47
4.6.2.	Efeito da temperatura na atividade de mananase dos 4 fungos	48
4.6.3.	Quantificação de proteínas e atividade específica de mananase dos 4 fungos	50
4.6.4.	Avaliação da termoestabilidade na atividade de mananase dos 4 fungos.....	51
4.6.5.	Avaliação da estabilidade ao pH na atividade de mananase dos 4 fungos	53

4.6.6.	Efeito de sais metálicos e EDTA na atividade de mananase dos 4 fungos.....	54
5.	Dosagens enzimáticas dos 4 fungos	56
PARTE II. Produção de mananases e pectinases de <i>A. brasiliensis</i>		58
6.	Avaliação das atividades de mananase e pectinase no extrato bruto intracelular (EbI) e extracelular (EbE) do fungo <i>A. brasiliensis</i>	59
6.1.	SDS-PAGE e Zimografia	59
6.2.	Caracterização de mananase e pectinase do EbE de <i>A. brasiliensis</i> obtidas em biorreator	61
6.3.	Efeito do pH e temperatura de mananase e pectinase do EbE de <i>A. brasiliensis</i>	61
6.3.1.	Estabilidade ao pH e termoestabilidade.....	62
6.3.2.	Efeito de sais metálicos e EDTA	64
8.7.	Dosagens enzimáticas dos derivados.....	79
8.8.	Dessorção dos derivados em NaCl	80
8.9.	Aplicação na clarificação de sucos de fruta.....	82
V.	DISCUSSÃO	84
VI.	CONCLUSÕES	93
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

I. INTRODUÇÃO

1.1. Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é a mais abundante fonte de matéria orgânica renovável produzida todos os dias na Terra. Sua estrutura é formada por uma complexa matriz de polissacarídeos, incluindo celulose (35-50%), hemicelulose (26-35%) e lignina (14-21%) e pequenas quantidades de extrativos vegetais, sais minerais, proteínas e pectina (Ferraz 2010; Singha *et al.*, 2015, Arevalo-Gallegos *et al.*, 2017). A composição da lignocelulose varia dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita, condição e/ou estágio de crescimento (Jeffries & Jin, 2000; Bothast & Schlinder, 2005; Ding & Himmel, 2006).

Resíduos agrícolas como cascas, caroços, sementes, ramas, bagaços etc. são fontes de proteínas (enzimas), fibras e óleos, e podem ser utilizados como fonte de carbono na elaboração de produtos com maior valor agregado, possuindo aplicações como fonte de energia ou matéria-prima para indústria bioquímica, de alimentos e de biocombustível (Octave & Thomas, 2009; Garmus *et al.*, 2009; Singha *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

1.2. Parede celular vegetal

A parede celular vegetal (**Figura 1**) possui uma estrutura complexa que desempenha várias funções, como suporte mecânico, transporte e defesa contra patógenos e insetos. Morfologicamente é dividida em três regiões distintas: lamela média, que é rica em pectina, parede primária, que é composta por microfibrilas de celulose (~30%), hemicelulose (~30%), pectina (~30%) e proteínas estruturais (~10%); e parede secundária, que contém celulose, hemicelulose e lignina e é composta por três camadas (S1, S2 e S3). Cada camada da parede secundária difere em espessura, composição e arranjos das microfibrilas de celulose. A camada S1 e S2 são ricas em hemicelulose, enquanto S3 em celulose (Carpita & Mccann, 2002; Sticklen, 2008; Raven *et al.*, 2014).

Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal. (A) e (B) Parede celular contendo microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas solúveis. (C) Parede secundária composta por três camadas: S1, S2 e S3. Adaptado de Sticklen (2008).

1.2.1. Celulose

A celulose (**Figura 2**) é o componente mais abundante da biomassa lignocelulósica (~50%), cujas fibras encontram-se embebidas em uma matriz de hemicelulose (~30-35%) e lignina (~20-23%). É um polímero linear com regiões cristalinas altamente organizadas e regiões amorfas em que as cadeias estão agrupadas de maneira mais irregular, sendo assim, mais suscetíveis ao ataque enzimático. Sua cadeia é formada exclusivamente por moléculas de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 (Ferraz, 2010). A unidade repetitiva da celulose, chamada de celobiose, é composta por duas moléculas de glicose esterificadas por ligações β -1,4, contendo seis grupos hidroxila que interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (**Figura 3**). Essas ligações de hidrogênio proporcionam uma forte tendência da celulose formar cristais tornando-a completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (Silva *et al.*, 2009).

Figura 2. Estrutura química da fibra de celulose. Modificado de [Chemical Structure of Cotton Fibre](#) (2017).

Figura 3. Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose. Adaptado de Santos *et al.* (2012).

1.2.2. Lignina e extrativos vegetais

A lignina está associada com a celulose e a hemicelulose na composição da lignocelulose, sendo uma macromolécula hidrofóbica com estrutura tridimensional altamente ramificada de álcoois aromáticos (Silva *et al.*, 2009; Sun & Cheng, 2002) constituídos por unidades de fenilpropano, tais como álcool p-cumárico, coniferílico, guaiacílico, siringílico e sinapílico (**Figura 4**). É encontrada na maioria das plantas superiores e em concentração mais alta na lamela média do que nas subcamadas da parede secundária dos traqueoides, vasos, fibras etc. sendo muito resistentes à degradação (Abreu & Oertel, 1999; Hendricks & Zeeman, 2009). Compreende cerca de 20-30% do material lignocelulósico, e envolve as células funcionando como uma “cola” que confere coesão à estrutura celular (Ferraz, 2010). O papel da lignina na parede celular das plantas é conferir suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo (Jovanovic *et al.*, 2009).

Figura 4. Estrutura da lignina. Modificado de Potters *et al.* (2010).

Os extrativos vegetais consistem-se em ceras, gorduras, resinas, taninos, óleos essenciais, compostos fenólicos, terpenos, ácidos alifáticos, álcoois e substâncias inorgânicas e compreendem cerca de 2-4% do material lignocelulósico (Kuhad & Singh, 2007; Ferraz, 2010).

1.2.3. Pectina

As pectinas são polissacarídeos heterogêneos, que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células vegetais superiores. É formada por uma cadeia central de centenas a quase mil resíduos de ácido galacturônico (GalA) unidos por ligação α -1,4 e contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como cadeias laterais (Scheller & Ulvskov, 2010). Encontra-se juntamente com polímeros de celulose e hemicelulose (**Figura 1**), conferindo estrutura, firmeza e contribuindo para a adesão entre as células vegetais (Macdougall & Ring, 2004). A pectina possui caráter hidrofílico, devido à presença de grupos polares. Portanto, tem característica de reter moléculas de água e está relacionada ao transporte de íons, além do crescimento, tamanho e forma das células vegetais (Endress & Mattes, 2009), além de produzir uma solução viscosa (Santi *et al.*, 2014).

Quimicamente, as pectinas correspondem uma família de polissacarídeos formada por homogalacturonanas (HG) e ramnogalacturonanas (RG) (**Figura 5**). As homogalacturonanas correspondem à parte de homopolímeros lineares de unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4) cujos muitos dos grupos ácidos estão metil-esterificados e que podem estar parcialmente esterificados, sendo assim mais resistentes à hidrólise (Pinheiro *et al.*, 2017). As ramnogalacturonanas constituem a região ramificada das pectinas e são divididas em:

- Ramnogalacturonanas I (RG-I) consistem em uma cadeia principal de unidades alternadas de ácido D-galacturônico ligadas a α -(1 $\rightarrow$ 4) e ramnose ligadas a α -(1 $\rightarrow$ 2). A incorporação da ramnose em intervalos aleatórios dentro da cadeia principal resulta na torção em outra cadeia linear, à qual se ligam cadeias laterais de arabinoses e galactoses (Carbinatto, 2010; Polizeli *et al.*, 2014).
- Ramnogalacturonanas II (RG-II) ou galacturonas consistem em uma cadeia principal com aproximadamente nove ligações de ácido galacturônico com quatro cadeias laterais complexas, consistindo em 12 monossacarídeos diferentes e 20 ligações distintas. RGII tem um suporte estrutural de HG ao invés de RG, com cadeias laterais complexas ligadas a resíduos de GalA (Polizeli *et al.*, 2014).

Figura 5. Representação esquemática da estrutura da pectina (Polizeli *et al.*, 2014).

Com base no tipo de modificações da cadeia principal, as substâncias pécnicas são classificadas em protopectinas, ácido pécnico, ácido pectínico e pectina (Kashyap *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2017).

As protopectinas são compostas por unidades de ácidos galacturônicos ligados ao cálcio por ligações iônicas. São substâncias pécnicas insolúveis em água encontradas em tecidos de plantas intactos (Polizeli *et al.*, 2014). Estão presentes em frutos verdes as quais agem como uma "cola", conectando as paredes celulares das diferentes células vegetais. Na fase de pleno desenvolvimento das frutas, a protopectina é abundante, contudo, no processo é transformada em pectina (Enzimas em Alimentos, 2015).

Os ácidos pécnicos são galacturonanas solúveis em água contendo pequena quantidade de grupos metoxil. Ácidos pectínicos possuem a propriedade de formar gel na presença

de grandes quantidades de açúcares (>65%), e baixo pH, sendo utilizados em preparações como geleias e doces de frutas, por exemplo (Pinheiro *et al.*, 2017; Yamashita, 2017).

As pectinas têm como função dar estrutura aos tecidos vegetais, firmeza e resistência à compressão (Santi *et al.*, 2014) e constituem de 4-30% das cascas de frutas cítricas, as quais são extraídas para serem utilizadas como estabilizantes na indústria de alimentos (Canteri *et al.*, 2012).

1.2.4. Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo maior constituinte da biomassa lignocelulósica. Seus componentes na parede celular de plantas incluem uma variedade de polissacarídeos com polímeros lineares ou ramificados, compostos por cinco monossacarídeos comumente encontrados na natureza, sendo estes as pentoses xilose e arabinose, as hexoses glicose, manose e galactose e o ácido glicurônico (Filho, 1998; Gray *et al.*, 2006).

As classes de hemicelulose são nomeadas de acordo com a unidade principal de açúcar. A maior parte dos açúcares da cadeia principal na estrutura da hemicelulose estão unidos entre si por ligações do tipo β -1,4 (Polizeli *et al.*, 2005), formando uma ligação cruzada em uma rede muito resistente (Shallom & Shoham, 2003) e, dependendo da composição da cadeia de açúcar, elas podem ser classificadas como arabinoxilana, acetilglicuronoxilana, xilana, xiloglicana, arabinana, arabinogalactana, galactomanana, glicomanana e galactoglicomanana (Moreira *et al.*, 2011). Desta forma, o termo hemicelulose não designa um composto químico definido, mas sim um conjunto de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos possuindo, cada componente, propriedades distintas (Santos, 2008).

As duas hemiceluloses mais importantes e representativas são as hetero-1,4- β -D-xilanas que compreendem o principal componente hemicelulósico em angiospermas e gramíneas e as hetero-1,4- β -D-mananas, que estão presentes na parede celular de gimnospermas e em estruturas especializadas como sementes e frutos (Moreira & Filho, 2008; Girio *et al.*, 2010; Van Zyl *et al.*, 2010). Xiloglicanas e galactomananas são encontradas tanto na parede primária (cuja função é estrutural), assim como à função de reserva em sementes de algumas espécies (Lima, 2002).

1.2.4.1. Manana

Manana (**Figura 6**) é o segundo componente mais abundante da fração hemicelulósica, sendo amplamente encontrada em madeiras (gimnospermas), tubérculos, sementes e grãos, em diferentes composições, estrutura e complexidade (Malgas *et al.*, 2015). A cadeia principal de manana consiste em resíduos de manose unidos por ligações do tipo β -1,4 ou uma combinação de resíduos de glicose e manose associados pelo mesmo tipo de ligação. Além disso, a cadeia principal da manana pode ter cadeias laterais ligadas a resíduos de α -1,6-galactose. A manana é classificada em quatro subfamílias: manana linear, glicomanana, galactomanana e galactoglicomanana (Moreira & Filho, 2008; Van Zyl *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2012).

A manana linear (**Figura 6-A**) apresenta função de reserva no endosperma de sementes e, além disso, possui função estrutural na parede celular. Por ser insolúvel em água e apresentar forte interação intermolecular, sua função biológica está relacionada à dureza e resistência a danos mecânicos (exposição à água). Está presente em diversas espécies de plantas do gênero *Phytelephas spp.*, na palma (*Elaeis guineensis*), na tamareira (*Phoenix dactylifera*), no café (*Coffea spp.*), e na parede celular de algumas algas (*Codium spp.*) (Buckeridge *et al.*, 2000; Liepman *et al.*, 2007; Buckeridge, 2010; Chauhan *et al.*, 2012; Rodriguez-Gacio *et al.*, 2012).

De acordo com a literatura, Petkowicz *et al.* (2001) foram os primeiros a isolar, na família Leguminosae, uma manana linear, a qual foi obtida a partir do endosperma de sementes de *Schizolobium amazonicum*. A estrutura da manana linear foi confirmada através de dados de metilação, ressonância magnética nuclear e difração de raios X. Posteriormente, Petkowicz *et al.* (2007) demonstraram que o mesmo polissacarídeo está presente nas sementes de *Schizolobium parahybae* e que este possui uma função estrutural na semente, já que 12 dias após germinação, a manana foi recuperada do endosperma remanescente.

A subfamília das glicomananas (**Figura 6-B**) representa o constituinte mais abundante da hemicelulose em gimnospermas. Sua cadeia principal é formada por resíduos de manose e glicose intercalados na proporção 2:1 unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Sua estrutura pode conter também unidades de galactose dispostas lateralmente à cadeia do polímero por ligação glicosídica do tipo α -1,6 sendo

representada pelas galactoglicomananas (**Figura 6-C**) (Martins, 2012). Em angiospermas as glicomananas constituem de 2-5% e apresentam uma relação glicose/manose de 1:1,5 (ou 2), já as galactoglicomananas apresentam uma relação de galactose/glicose/manose que varia entre 1:1:3 para 0,1:1:3 (Timell, 1967; Pham *et al.*, 2011). Em espécies de Orchidaceae (*Cattleya*) e Araceae (*Phylodendron*), manana e glicomanana são acetiladas e podem não conter galactose em sua composição (Buckeridge, 2010).

Outra subfamília a ser abordada, as galactomananas (**Figura 6-D**), são polissacarídeos de reserva de parede celular presentes em sementes de leguminosas (Lisboa *et al.*, 2006). Em gimnospermas, constituem em 15-25% do peso seco da madeira, porém, são mais comumente encontradas na família Leguminosae, podendo representar de 1-38% do peso seco da semente (Timell, 1967; Pham *et al.*, 2011). As sementes de leguminosas de espécies brasileiras da subfamília Caesalpinoideae, Mimosoideae e Faboideae apresentam 84,65%, 52% e 46,6% respectivamente (Buckeridge & Reid, 1994). A razão entre manose e galactose, o qual indica o grau de ramificação da galactomanana, e o padrão de distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia de manose variam entre espécies de angiospermas, fatores estes, que podem apresentar relevância para estudos quimiotaxonômicos e evolutivos (Reid & Meier, 1970; Buckeridge & Dietrich, 1990; Buckeridge *et al.*, 1995).

Galactomananas de diferentes espécies botânicas apresentam características estruturais distintas, ou seja, a razão entre manose e galactose varia em 4:1, 3:1, 2:1 e 1:1 para as gomas alfarroba, tara, guar e feno grego respectivamente (Moreira & Filho, 2008; Miller *et al.*, 2012). Em sementes de leguminosas de espécies brasileiras, as galactomananas de *Strypnodendron barbatiman* (Reicher *et al.*, 1991), *Mimosa scabrella* (Ganter *et al.*, 1992), *Schizolobium parahybae* (Ganter *et al.*, 1993), *Senna multijuga* (Rechia *et al.*, 1995) e *Schizolobium amazonicum* (Petkowicz *et al.*, 1998), possuem relações de manose e galactose em 1,5:1; 1,1:1; 3,0:1; 2,3:1 e 3,0:1 respectivamente. Galactomananas também são encontradas em várias espécies de plantas, como *Coffea arabica*, *Cocos nucifera*, *Phoenix dactylifera*, *Elaies guinensis*, *Phytelephas macrocarpa*, entre outras (Dea & Morrison, 1975; Dey, 1978; Ademark *et al.*, 1998; Vries & Visser, 2001; Srivastava & Kapoor, 2005). Em *Glycine max*, *Gymnocladus dioica* e *Mucuna* a goma está presente na casca, no lado interior do tegumento e no interior da semente, respectivamente (Cybercolloids, 2018).

Figura 6. Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas. (A) manana linear, (B) glicomanana, (C) galactoglicomanana, (D) galactomanana. Modificado de Van Zyl *et al.* (2010).

As galactomananas tem atraído grande interesse acadêmico e industrial, devido a sua propriedade em formar soluções viscosas ou géis em meio aquoso. As principais fontes de galactomananas usadas comercialmente provêm das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar), *Ceratonia siliqua* (goma de alfarroba) e *Caesalpinia spinosa* (goma tara), sendo amplamente utilizadas como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, ligantes e agentes de gelificação na indústria de alimentos (Cybercolloids, 2018).

Todas essas características têm possibilitado o seu uso em diversos setores, tais como indústria de papel, têxtil, petrolífera, farmacêutica, de alimentos, de cosméticos, de explosivos, e etc. As propriedades das gomas podem ser reforçadas pela interação com outros monômeros e polímeros, principalmente por sua capacidade de interagir de forma sinérgica, devido aos inúmeros grupos OH presentes (Srivastava & Kapoor, 2005).

1.3.Hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais

As enzimas são catalisadores que possuem alto grau de especificidade por seus substratos, favorecendo as reações biológicas. Além disso, apresentam uma eficiência

catalítica extraordinária, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos e inorgânicos e funcionam em soluções aquosas, sob condições muito suaves de temperatura e pH, sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico (Nelson & Cox, 2014).

A utilização de enzimas na conversão da biomassa por meio da hidrólise enzimática, apresenta uma série de vantagens, dentre elas, o baixo consumo de energia, por utilizar condições amenas, menor perda de substrato e a não produção de subprodutos. Além dessas características, outros fatores são de grande importância para a escolha de uma enzima específica ou um consórcio enzimático em um processo industrial, entre eles se destacam, temperatura, pH, inibidores, especificidade, pureza, ativadores, métodos de análises, custos e substratos. A grande maioria das enzimas aplicadas industrialmente são hidrolases, dentre estas, as proteases e as carboidrases são as mais utilizadas (Said & Pietro, 2004; Siqueira & Filho, 2010).

Tabela 1. Algumas das principais enzimas necessárias para a degradação da lignocelulose em monômeros. *Fonte:* Van Dyk & Pletschke (2012).

CELULOSE	HEMICELULOSE	PECTINA	LIGNINA
celobiohidrolase	endo-xilanase	acetil xilana esterase	pectina metil esterase
endoglicanase	β -xilosidase	endomananase	manganês peroxidase
β -glicosidase	β -manosidase	α -L-arabinofuranosidase	lignina peroxidase
	α -glicuronidase	ácido ferúlico esterase	ramnogalacturonano liase
	α -galactosidase	ácido p-coumárico esterase	

A degradação da biomassa lignocelulósica por fungos ocorre de forma extracelular e é atribuída à ação de uma série de enzimas que atuam sinergicamente. Os componentes da biomassa lignocelulósica devem ser inicialmente despolimerizados a compostos

menores tornando-lhe suscetíveis ao transporte, através da parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos (Ferraz, 2010).

A lignina não pode ser clivada por enzimas hidrolíticas como a maioria dos outros polímeros naturais (celulose, amido, proteínas, etc). A biodegradação da lignina é um processo oxidativo, que envolve enzimas como a lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) e lacase (Souza, 2008).

1.3.1. Celulases

As celulases são produzidas por bactérias e fungos, sendo que, poucas espécies são capazes de produzir celulases suficientes para solubilizar a celulose cristalina (Bhat & Bhat, 1997). Para que ocorra a completa hidrólise da celulose é necessária a ação de três grupos de enzimas atuando sinergicamente. Esses grupos de enzimas correspondem (i) as endo-1,4- β -glicanases (EC 3.2.1.4, endocelulase), que rompem a molécula de celulose criando extremidades redutoras e não-redutoras e liberando fragmentos menores que servem de substrato para (ii) as exo-1,4- β -glicanases (EC 3.2.1.91, exo-glicosidase ou celobiohidrolase) que clivam moléculas de celobiose a partir da celulose ou de oligossacarídeos derivados de celulose, sendo específica para extremidades redutoras e não-redutoras e (iii) as 1,4- β -glicosidasas (EC 3.2.1.21, celobiase) que liberam D-glicose das extremidades não-redutoras de oligossacarídeos provenientes da celulose, especialmente da celobiose (Jovanovic *et al.*, 2009; Ferraz, 2010).

1.3.2. Pectinases

As pectinases (EC.3.2.1.15) (**Figura 7**) são um grupo de enzimas complexas capazes de catalisar a degradação de substâncias pécicas através de reações de despolimerização (hidrolases e liases) ou desesterificação (esterases) (Tariq & Latif, 2012), e incluem poligalacturonases (PGs), pectinesterases (PEs), pectina liases (PLs) e pectato-liases (PGLs) com diferentes especificidades de substrato (Ahlawat *et al.*, 2009).

Tabela 2. Enzimas pectinolíticas que degradam as cadeias de HG da pectina.

NOME	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO ENZYME COMMISSION (EC)
Esterases	
Pectina metil esterases	EC 3.1.1.11
Pectina acetil esterases	EC 3.1.1.6
Hidrolases	
Endo-polimetilgalacturonases	EC 3.2.1.41
Exo-polimetilgalacturonases	EC 3.2.1.15
Endo-poligalacturonases	EC 3.2.1.15
Exo-poligalacturonases	EC 3.2.1.67
Liases	
Endo-pectina liases	EC 4.2.2.10
Endo-pectato liases	EC 4.2.2.2
Exo-pectato liases	EC 4.2.2.9

Poligalacturonases (PGs) hidrolisam a ligação α -1,4 glicosídica na estrutura da homopoligalacturonana. As poligalacturonases podem ser do tipo endo e exo:

- As endopoligalacturonases (EC.3.2.1.15) atacam aleatoriamente as ligações α -1,4 glicosídicas da cadeia polissacarídica, produzindo vários oligômeros de ácido galacturônico;
- As exopoligalacturonases do tipo I (EC.3.2.1.67) hidrolisam o ácido D-galacturônico na extremidade não redutora;
- As exopoligalacturonases do tipo II (EC.3.2.1.82) liberam di-galacturonato a partir da extremidade não redutora do ácido poligalacturônico (Khan *et al.*, 2013).

As poligalacturonases são classificadas na família GH 28 de acordo com a classificação do Banco de Dados de Enzimas Ativas em Carboidratos - CAZY (<http://www.cazy.org/>).

- Pectinesterases (EC 3.1.1.11) catalisam o grupo metoxil da pectina formando o ácido péctico (Amin *et al.*, 2017).

- Pectina Liases (EC 4.2.2.10) realizam reação de trans-eliminação e pectina esterases desesterificam os polímeros de pectina, seguindo a hidrólise de ligações éster (Amin *et al.*, 2017).
- Pectato liases (EC 4.2.2.2) clivam aleatoriamente o ácido α -1,4-poligalacturônico via uma reação de eliminação β (Yang *et al.*, 2018).

Figura 7. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação em substratos pécicos. (A) R = H para PG e CH₃ para PMG, (B) PE e (C) R = H para PGL e CH₃ para PL. A tesoura indica o local onde as pectinases atuam nos substratos pécicos. PG: poligalacturonase, PMG: polimetilgalacturonase, PE: pectinesterase, PGL: pectato liase, PL: pectina liase. (Ilustração: Infante, J. C.).

1.3.3. Hemicelulases

As hemicelulases são produzidas por vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras já investigados e relatados na literatura. São componentes-chave na degradação da biomassa e organização da hemicelulose exige uma ação combinada de muitas enzimas, atuando de forma sinérgica, para sua completa degradação (Shalon & Shoham, 2003). Sua hidrólise ocorre de forma semelhante à hidrólise de celulose, onde as enzimas envolvidas nesse processo são hidrolases específicas que clivam determinados tipos de ligação existentes no polímero.

Assim, as hemicelulases são divididas em dois grupos: endo-hemicelulases e exo-hemicelulases (Ferraz, 2010). As xilanas e mananas geralmente possuem diferentes grupos substituintes ligados à cadeia principal, sendo necessárias enzimas auxiliares para removerem esses grupos e darem acesso às enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal. No caso das xilanas, algumas enzimas auxiliares são α -L-arabinofuranosidases, α -glicuronidase, acetil xilana esterase e ácido ferúlico esterase, que clivam especificamente as ligações entre hemicelulose e lignina. α -L-arabinofuranosidases possuem diferentes especificidades, algumas clivam ligações α -1,2 ou α -1,3, enquanto que outras são capazes de clivar resíduos de arabinose a partir de arabinoxilana (Meyer *et al.*, 2009).

1.3.3.1. Mananases

Mananases são enzimas classificadas como carboidrases e são responsáveis por degradar cadeias de mananas que se encontram naturalmente presentes na fração hemicelulósica juntamente com celulose e lignina, compondo a parede celular de diversas espécies vegetais (Weingartner, 2010). Características como proporção e distribuição de manose e glicose na cadeia principal da manana, são importantes para determinar as enzimas responsáveis para sua completa degradação (McCleary, 1991).

A maioria dos estudos encontrados na literatura sobre β -mananases microbianas relata que ocorrem de forma extracelular, podendo ser induzida por vários substratos contendo β -manana em sua estrutura como goma de alfarroba, goma guar e farinha de coco (Kote *et al.*, 2009). Algumas mananases possuem domínios que favorecem a ligação ao

substrato (CBM-Carbohydrate Binding Module). Esses domínios, tem como função principal concentrar as moléculas de enzima na superfície do substrato, bem como permitir a ligação do catalisador especificamente ao seu substrato (Morrill *et al.*, 2015).

Tabela 3. Enzimas mananolíticas e adicionais que degradam as cadeias de mananas.

NOME	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO ENZYME
	COMISSION (EC)
β -mananase (endo- β -D-mananase)	EC 3.2.1.78
β -manosidase (exo- β -D-mananase)	EC 3.2.1.25
β -glicosidase	EC 3.2.1.21
Acetil manana esterase	EC 3.1.1.6
α -galactosidase	EC 3.2.1.22

Para que ocorra a completa hidrólise da estrutura da manana, é necessária a ação sinérgica de endo e exo-hidrolases, juntamente com enzimas que clivam as cadeias laterais. Essas enzimas são classificadas dentro da família das glicosil hidrolases (GH) e carboidrato esterases (CE), com base na sequência de aminoácidos, similaridade mecânica e estrutural, e estão disponíveis para consulta no banco de dados CAZY (<http://www.cazy.org/>) (Cantarel *et al.*, 2009).

As enzimas responsáveis pela degradação da cadeia principal da manana incluem β -mananase, β -manosidase e β -glicosidase (**Figura 8**). Enzimas adicionais, tais como acetil manana esterase e α -galactosidase são necessárias para remover substituintes laterais que são unidos em vários pontos da estrutura da manana, criando mais locais suscetíveis para a completa hidrólise enzimática. A endo- β -D-mananase (EC 3.2.1.78, manana endo-1,4- β -D-manosidase) cliva aleatoriamente dentro da cadeia principal de 1,4- β -D-manana de galactomanana, glicomanana, galactoglicomanana e manana (Mccleary, 1991; Moreira & Filho, 2008).

A heterosinergia (a ação sinérgica entre enzimas da cadeia principal e as das cadeias laterais) e a homosinergia (a ação sinérgica entre enzimas das duas cadeias principais ou, entre as enzimas das duas cadeias laterais) são relatadas na degradação de mananas (Moreira & Filho, 2008; Van Zyl *et al.*, 2010).

Figura 8. Estrutura ilustrativa de diferentes formas de mananas e enzimas requeridas para sua hidrólise. (A) manana linear, (C) galactomanana ramificada, (D) glicomanana linear, (F) galactoglicomanana ramificada. A estrutura da manana é hidrolisada pela β -mananase, ao passo que a α -galactosidase e a acetil manana esterase liberam galactose e grupos acetil respectivamente. Os produtos gerados pela β -mananase tais como, (B) manobiose e (E) glicomanose são, em seguida, hidrolisados por β -mannosidase e β -glicosidase para então gerarem manose, glicose e galactose. Modificado de Van Zyl *et al.* (2010).

1.4. Produção e aplicação industrial de Mananases

A aplicação de β -mananases ganharam significativo interesse na área biotecnológica pela versatilidade deste grupo de enzimas e à variedade de aplicações onde elas podem ser utilizadas (Chauhan *et al.*, 2012).

Uma variedade de organismos como bactérias (Olaniyi & Arotupin, 2013; Kulcinskaja *et al.*, 2013), fungos (Ferreira & Filho, 2004; Van Zyl *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014; Inoue, *et al.*, 2015; Malgas *et al.*, 2015; Jana *et al.*, 2018), plantas (Petkowicz *et al.*, 2001; Bourgault *et al.*, 2005; Lisboa *et al.*, 2006) e animais (Yamaura *et al.*, 1996; Larsson *et al.*, 2006) têm sido relatados como produtores de mananases, gerando grande interesse industrial e podendo ser utilizados para os mais diversos fins: redução da viscosidade de agentes espessantes, clarificação de sucos de frutas, ração animal, remoção e inibição da formação de biofilmes, extração de petróleo, indústria de detergentes, aditivos alimentares que promovem o crescimento de microbiota intestinal benéfica, produção de

mano-oligossacarídeos, biobranqueamento de polpa e papel, processos têxteis, produção de bioetanol, entre outros e, dependendo do objetivo final do produto, elas são usadas isoladamente ou em conjunto com outras enzimas agindo de forma sinérgica em consórcios enzimáticos, estratégia essa, muito utilizada por indústrias para diminuir a quantidade de enzimas utilizadas no processo e reduzir custos (Moreira & Filho, 2008; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012; Yamabhai *et al.*, 2014; Malgas *et al.*, 2015).

De acordo com a literatura, a adição de mananases em consórcios enzimáticos facilita o contato da celulase com as fibrilas de celulose pela remoção de glicomananas presentes na superfície celular, aumentando a liberação de açúcares redutores e glicose (Pham *et al.*, 2011). As β -mananases alcalinas apresentam vantagens em aplicações na indústria de polpa de papel e celulose assim como de detergentes (Van Dyk & Pletschke, 2012), enquanto que β -mananases neutras são adequadas para a bioconversão de β -manana em mano-oligossacarídeos (Dhawan & Kaur, 2007). Já as β -mananases ácidas podem ser utilizadas juntamente com celulasas e xilanases na hidrólise da biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol de segunda geração (Bien-Cuong *et al.*, 2009; Songsiriritthigul *et al.*, 2010).

1.5. Produção e aplicação industrial de Pectinases

As pectinases são enzimas de importante aplicação industrial e parte integrante da indústria alimentícia. Em 1995, o valor estimado de venda de todas as enzimas industriais foi de um bilhão de dólares, dos quais 75 milhões de dólares foram destinados às pectinases. Apesar disso, sua aplicação industrial já havia sido notada, pela primeira vez, em 1930, durante os processos de preparação de vinhos e sucos de frutas (Oslen, 2000; Bhardwaj *et al.*, 2017). No entanto, a natureza química dos tecidos vegetais se tornou aparente somente na década de 1960 (Abeles, 1992; Bhardwaj *et al.*, 2017).

Atualmente, as pectinases, representam aproximadamente 25% da produção no setor comercial (Makky & Yusoff, 2015; Pinheiro *et al.*, 2017). As pectinases mostram-se por aumento acelerado em seu mercado, mantendo a taxa de crescimento anual médio de 2,86%. Isso equivale ao montante de 27,6 milhões de dólares em 2013 para 30,0 milhões

de dólares em 2016 e estimado em, US \$ 35,5 milhões até 2021 (Global Pectinase Market Research Report, 2017; Amin *et al.*, 2018).

As pectinases são secretadas em grande quantidade por algumas espécies de fungos (Sandri *et al.*, 2011; Jaramillo, 2014; Pinheiro *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018), bactérias (Rehman *et al.*, 2013; Oumer & Abate, 2018) e leveduras (Merín & Morata de Ambrosini VI, 2015; Oskay & Yalçin, 2015), e são utilizadas em uma vasta gama de aplicações biotecnológicas, como por exemplo, na liquefação e extração de tecidos vegetais, na degomagem de fibras naturais, na redução de viscosidade, no aumento de rendimento, na clarificação de sucos de frutas e na melhoria da eficiência de filtração dos mesmos (Uenojo & Pastore, 2007).

1.6. Biomassa de soja como fonte indutora de produção de enzimas fúngicas

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos EUA. Na safra 2016 e 2017, a cultura ocupou uma área de 33,89 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 113,92 milhões de toneladas desse insumo. A produtividade média da soja brasileira foi 3.362 kg por hectare (Embrapa, 2018). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016), a produção brasileira de soja tem crescido nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos no país. O aumento da produtividade está associado aos avanços tecnológicos, ao manejo e eficiência dos produtores.

A casca da soja (**Figura 9**), um subproduto obtido da industrialização do grão da soja, corresponde a uma fina camada (tegumento) que recobre o grão, consistindo em uma fonte rica em fibra pouco lignificada (1,4 a 4,3 %) com 43% de celulose, 18% de hemicelulose e 12,8% de pectina. Tem grande destaque no cenário nacional, em virtude da alta produção brasileira de soja dessa forma, para cada tonelada de soja processada são produzidos 50 kg de casca de soja. Apesar dos diversos destinos, uma fração deste subproduto é descartado como resíduo no ambiente (Restle *et al.*, 2004; Martinez, 2008).

A casca de soja, um resíduo lignocelulósico, apresenta cerca de 8% de manana em sua constituição, em contraste com o grão da soja que possui 1,26 a 1,61% (Jackson, 2010), e uma relação entre galactose e manose de 2:3 (Whistler & Saarnio, 1957). Há

relatos na literatura, mostrando que a casca de soja é um ótimo indutor para a produção de mananases fúngicas (Weingartner, 2010; Gomes, 2014; Marco *et al.*, 2015; Sciuto, 2015).

Figura 9. (A) Casca de soja e (B) Casca de soja moída. Foto: Infante, J. C.

Schirmer-Michel *et al.* (2008) relataram que o fungo *Candida guilliermondii* quando crescido em casca de soja produziu elevada quantidade de etanol. Cassales *et al.* (2011) demonstraram o uso da casca de soja como substrato para vários bioprocessos depois da hidrólise ácida. Fernandes *et al.* (2018) utilizaram cascas de soja como fonte de carbono indutora para a produção de celulase do fungo *Penicillium sp.*, o qual se revelou potencial podendo contribuir significativamente para fins biotecnológicos. Os resultados desses trabalhos mostraram perspectivas para o uso de casca de soja, como um substrato para produção biotecnológica e de biocombustíveis.

1.7. Imobilização enzimática

As enzimas apresentam muitas características promissoras, que tornam sua aplicação mais vantajosa nas áreas tecnológicas e ambientais. Elas atuam em condições suaves de pH, temperatura e pressão, atingindo velocidades de reação muito superiores, quando comparadas aos catalisadores químicos convencionais. Essas características são responsáveis pela redução no custo final do processo, além de evitar a formação de

produtos indesejáveis. Por apresentarem elevada especificidade, pode-se atingir um maior rendimento do processo, além da obtenção de produtos biodegradáveis e consequentemente a redução da quantidade de resíduos gerados. Porém, sua aplicação ainda é limitada devido à alta sensibilidade a agentes desnaturantes, altos custos de produção e impossibilidade de reuso. Contudo, essas desvantagens podem ser contornadas através da imobilização enzimática (Jordão, 2010).

A imobilização é a fixação da enzima sobre ou dentro de suportes sólidos, resultando em sistemas heterogêneos (Jordão, 2010). Quando a enzima é imobilizada dentro desses suportes sólidos, ela se torna mais resistente a mudanças no ambiente da reação, permitindo sua recuperação e reuso (Castro *et al.*, 2010). Para que a imobilização seja eficiente, o suporte deve deixar o sítio catalítico da enzima acessível aos substratos, manter sua atividade enzimática por longos períodos e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (Jordão, 2010; Castro *et al.*, 2010).

Existem diversas técnicas de imobilização, dentre as mais conhecidas estão: a simples adsorção em suportes porosos, interações químicas relativamente fracas, como por exemplo, troca iônica e interação hidrofóbica, imobilização por ligação covalente unipontual ou multipontual, etc (Vici, 2015). Além disso, existem também uma variedade de biopolímeros, polissacarídeos essencialmente insolúveis em água, que são amplamente utilizados como suporte para a imobilização enzimática (celulose, agarose, carragenina, quitosana, etc). Essas matrizes formam géis aquosos muito inertes, característica essa, que proporciona resistência ao gel, mesmo em baixa concentração (Van de Velde *et al.*, 2002).

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 fortes e muito estáveis, o que impede a recuperação da enzima (Guisan, 2006; Vici, 2015). A imobilização covalente pode ser de dois tipos:

- Unipontual, como a que ocorre em suporte ativado por brometo de cianogênio (BrCN) e pode ser observada na **Figura 10**;

- Multipontual, como aquelas que ocorrem em suportes do tipo glioxil agarose e suportes ativados por glutaraldeído.

Em ambos os casos a ligação ocorre entre os grupos funcionais presentes no suporte e as cadeias laterais dos aminoácidos da superfície da enzima, como os grupos NH_2 das cadeias laterais das lisinas, o que gera uma ligação do tipo amida (Srere & Uyeda, 1976). No entanto, a formação de ligações multipontuais é realizada em pH muito alcalinos, acima dos pKas dos grupamentos participantes, condição essa muito extrema para muitas enzimas (Guisan *et al.*, 1997)

A imobilização unipontual, em suportes ativados com BrCN, é realizada em condições mais brandas e a imobilização ocorre entre poucos grupos, geralmente apenas entre o grupo amino terminal da enzima e o suporte (**Figura 10**). Os derivados¹ gerados a partir desse suporte resultam em excelentes modelos para o estudo da enzima na ausência do fenômeno intramolecular, ou seja, esse tipo de derivado representa a enzima em seu estado livre, sem interferências dos extratos enzimáticos e sem distorções conformacionais, o que permite verificar a atividade e estabilidade original da enzima e compará-la com os outros derivados (Guisan *et al.*, 1997; Vici, 2015).

Figura 10. Imobilização em suporte ativado com brometo de cianogênio. A imobilização ocorre devido a reação da amina terminal da enzima com o suporte ativado. Modificado de Hayworth (2018).

¹ Derivado é o nome dado para o complexo formado pela enzima e o suporte sólido ao qual foi imobilizada.

1.7.2. Imobilização reversível

A imobilização reversível é um método no qual ocorre a união da enzima ao suporte por meio de ligações fracas, de forma que a enzima pode ser recuperada do suporte por estratégias de dessorção. Os protocolos mais utilizados para a técnica de imobilização reversível são os ativados com grupos iônicos, como dietilaminoetil (DEAE), carboximetil (CM) e monoamino-*N*-aminoetil (MANAE), aos quais a enzima se adsorve por interação iônica (Mateo *et al.*, 2006).

1.8.O fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis*

Os fungos filamentosos são uma classe de microrganismos de grande interesse industrial, sendo amplamente distribuídos na natureza, encontrados no solo, em vegetais e animais, podendo ter hábitos saprófitos ou parasitas e são fundamentais na ciclagem de nutrientes na biosfera. Podem também associar-se simbioticamente com raízes de plantas, formando micorrizas (Grimm *et al.*, 2005; Strullu-Derrien & Strullu, 2007).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* pertencem ao grupo dos Ascomycetos, podendo ser isolados do solo, água, vegetação, material em decomposição, e ar. Possuem características que os fazem microrganismos ideais para aplicações industriais como: boa capacidade de fermentação e altos níveis de secreção de enzimas responsáveis pela degradação de polissacarídeos de parede celular de plantas, sendo estas de grande interesse para a indústria de alimentos. *Aspergillus spp.* também tem sido usado como hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas (Vries & Visser, 2001; Ja'afaru & Fagade, 2007).

O fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* espécie *brasiliensis* foi descrito em 2007 por Varga *et al.* Suas colônias possuem coloração branca nos primeiros dias, que mudam para marrom escuro e então preto. Seus conídios variam de 3,5 a 4,5 µm, a vesícula de 30 a 40 µm e a esclerótica é encontrada em apenas algumas cepas. Variam de 1 a 1,5 µm e possuem a coloração branca (Varga *et al.*, 2007; Almeida, 2015).

De acordo com Varga *et al.* (2007), nenhum dos isolados estudados produziram ocratoxina A, kotaninas, funalenona ou piranonigrinas. Sendo então, considerado um microrganismo GRAS (geralmente reconhecido como seguro), o que lhe permite ser usado em aplicações industriais.

Figura 11. Microscopia óptica do fungo *Aspergillus brasiliensis* (-100 μm). Foto: Paula Zaghetto de Almeida.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral selecionar fungos bons produtores de mananases cultivados em cascas de soja. Destes, realizar estudos de imobilização e caracterização bioquímica, das enzimas mananase e pectinase, além de avaliar o efeito de QsMP no clareamento de sucos de frutas.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Selecionar dentre fungos filamentosos da coleção do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular (FFCLRP – USP), bons produtores de mananases e escolher o melhor para cultivo em cascas de soja como fonte de carbono;
- ✓ Analisar o efeito de diferentes meios de cultura para a produção de mananases pelo microrganismo escolhido;
- ✓ Caracterizar do ponto de vista bioquímico mananases e pectinases quanto ao efeito do pH, temperatura, termoestabilidade, estabilidade ao pH, efeito de sais e EDTA;
- ✓ Imobilizar as mananases e pectinases utilizando diferentes suportes iônicos;
- ✓ Caracterizar do ponto de vista bioquímico as mananases e pectinases imobilizadas quanto ao efeito do pH, temperatura, termoestabilidade, estabilidade ao pH, efeito de sais e EDTA;
- ✓ Avaliar a eficiência de QsMP no processo de clarificação de sucos.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos fungos e manutenção das cepas

Inicialmente foram selecionados 13 fungos pertencentes a micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular (FFCLRP – USP). As linhagens selecionadas foram identificadas no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (*Trichoderma asperelum* CFF125, *Talaromyces radicus* CFF113, *Fusarium sporotrichoides* CFF99, *Aspergillus versicolor* CFF56, *Trichoderma ghanense* CFF120, *Euritium Chevalieri* CFF109, *Aspergillus fumigatus* CFF114, *Aspergillus niveus* CFF58, *Penicillium coprophilum* CFF133, *Talaromyces pinophilus* CFF119, *Aspergillus unguis* CFF01, *Aspergillus brasiliensis* CFF124 e *Aspergillus clavatus* CFF80).

As cepas foram mantidas em sílica gel, no qual, uma suspensão de esporos (1,2 mL) misturados em 5 mL de solução de leite Molico desnatado (20g/100 mL de água deionizada) foram adicionados a 6 g de sílica gel – previamente autoclavadas - contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca. Esses tubos foram armazenados em refrigerador a -20°C.

Para a manutenção das cepas, foram feitos repiques em tubos, contendo meio de cultura sólido constituído por (m/v) PDA 4 %, dextrose 0,5 % e ágar 2 %, e mantido em estufa a 30 °C até esporulação. Os tubos foram conservados a 4 °C.

3.2. Condições de cultivo

Os fungos foram cultivados em condições submersas, contendo 1% (m/v) de cascas de soja como fonte de carbono. Os cultivos foram realizados utilizando Erlenmeyers de 250 mL em triplicatas biológicas, contendo em cada um 50 mL de meio líquido suplementado com os meios de cultura selecionados (ver item 3.3), nos quais foram autoclavados a 121 °C por 30 minutos.

Posteriormente, fungos selecionados cultivados em tubos foram raspados e os esporos misturados com 30 mL de água deionizada. Uma gota desta solução de esporos foi colocada na câmara de Neubauer, onde pôde ser feita a contagem dos esporos em microscópio óptico para a obtenção de uma suspensão de 10^8 esporos/mL – relação de 1

mL de solução de esporos para cada 100 mL de meio de cultura. Após inoculação da solução de esporos nos Erlenmeyers na concentração de 1 % os cultivos foram incubados em shaker a 120 rpm, 30 °C, durante 7 dias.

3.3. Meios de cultura

Foram feitos inóculos com os seguintes meios de cultura líquidos: Adams (Adams, 1990), Khanna (Khanna *et al.*, 1995), Vogel (Vogel, 1964), M5 (Peralta *et al.*, 1990), SR (Rizzatti *et al.*, 2001), Mls (Marco *et al.*, 2015) e Czapek (Wiseman, 1975) em pH 6,0.

3.3.1. Meio Adams

Peptona - 0,2 g

KH₂PO₄ - 0,1 g

MgSO₄.7 H₂O - 0,05 g

Fonte de Carbono - 1 g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.2. Meio Khanna

Solução de sais de Khanna [20X] - 5 mL

Extrato de levedura - 0,1 g

Fonte de Carbono - 1 g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.2.1. Solução de sais de Khanna

NH₄NO₃ - 2,0 g

KH₂PO₄ - 1,3 g

MgSO₄.7 H₂O - 0,362 g

KCl - 0,098 g

ZnSO₄.H₂O - 0,007 g

MnSO₄.H₂O - 0,0138 g

FeCl₃.6 H₂O - 0,0066 g

CuSO₄.5 H₂O - 0,0062 g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.3. Meio Vogel

Solução de biotina - 20,0 µL

Solução de sais de Vogel [50X] - 2,0 mL

Extrato de levedura - 0,75 g

Peptona - 0,75 g

Fonte de Carbono - 1 g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.3.1. Solução de biotina

Biotina - 5,0 mg

Etanol 50 % - 100 mL

3.3.3.2. Solução de sais de Vogel [50X]

Citrato de sódio pentahidratado - 150,0 g

NH₄NO₃ - 100,0 g

KH₂PO₄ - 250,0 g

MgSO₄.7 H₂O - 10,0 g

CaCl₂.2 H₂O - 5,0 g

Solução de traços de elementos - 5,0 mL

Clorofórmio - 2,0 mL

Água deionizada q.s.p. - 1000 mL

3.3.4. Meio M5

Extrato de levedura - 0,6 g

Peptona - 0,1 g

CaCO₃ - 0,1 g

NaCl - 0,1 g

Acetato de amônio - 0,6 g

Fonte de Carbono - 1g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.5. Meio SR

Solução de sais SR [20X] - 5,0 mL

Extrato de levedura - 0,45 g

Peptona - 0,02 g

Fonte de Carbono - 1 g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.5.1. Solução de sais SR [20X]

MgSO₄.7 H₂O - 0,24 g

KH₂PO₄ - 0,3 g

NH₄H₂PO₄ - 1,0 g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.6. Meio Mls

Extrato de levedura - 0,6 g

KH₂PO₄ - 7,0 g

K₂HPO₄ - 2,0 g

MgSO₄.7H₂O - 0,1 g

(NH₄)₂SO₄ - 1,0 g

Fonte de Carbono – 1 g

Água deionizada q.s.p. - 100 mL

3.3.7. Meio Czapek

NaNO₃ - 3 g

K₂HPO₄ - 1 g

KCl - 0,5 g

MgSO₄.7H₂O - 0,1 g

FeSO₄.7 H₂O - 0,01 g

Fonte de carbono - 1 g

Água deionizada q.s.p. - 1000 mL

3.4. Fonte de carbono e pré-tratamento

O resíduo agroindustrial escolhido como fonte de carbono para produção de mananases foram cascas de soja. Esse resíduo provém da espécie *Glycine max* e foi obtido na Fazenda Tropical, em Cabeceiras, GO. O material foi submetido a um pré-tratamento no qual foi autoclavado a 121 °C por 2 horas e lavado em água corrente, posteriormente seco em estufa a 60 °C por 48 horas, triturado e guardado em recipiente de vidro.

3.5. Extração do extrato bruto intracelular (EbI) e extracelular (EbE)

Após 7 dias de incubação os cultivos foram filtrados a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro Whatman® n°1, a fim de separar a massa micelial do sobrenadante. O sobrenadante obtido, denominado extrato bruto extracelular (EbE), foi preservado em azida sódica 0,1% e guardado em geladeira, sendo posteriormente submetido a ensaios enzimáticos para determinação das atividades de mananase e pectinase e dosagem de proteínas.

A massa micelial, denominada extrato bruto intracelular (EbI) foi obtida da seguinte forma: o micélio foi lavado com água deionizada e posteriormente macerado com 2 volumes de areia previamente tratada com solução sulfonítrica (ácido sulfúrico: ácido nítrico na proporção 1:3) em gral de porcelana, mantido em gelo. O macerado foi ressuspenso em 100 mL de água deionizada e o material foi então filtrado a vácuo, para remoção da areia e dos debrís celulares. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação das atividades de mananase, pectinase e dosagem de proteínas.

3.6. Dosagem da atividade enzimática

Foram feitos ensaios para determinação da atividade enzimática do EbE e/ou dos derivados DEAE e Q-sefarose (0,1g/mL), utilizando diferentes substratos, incluindo CMC 1% (carboximetil-celulose), Avicel 1% (celulose microcristalina), FP (papel de filtro), xilana beechwood 1%, amido solúvel de batata reagen 1%, arabinana linear 1 %, galactomanana – goma de alfarroba 0,5 %, ácido poligalacturônico 0,5 % e substratos

sintéticos (4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 4mM, 4-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo 2mM, 4-nitrofenil-celobiose 18mM, 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo 18mM, 4-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo 18mM e 4-nitrofenil-palmitato 8Mm).

Os ensaios utilizando os substratos xilana beechwood 1%, amido solúvel de batata reagen 1%, arabinana linear 1 %, galactomanana – goma de alfarroba 0,5 % e ácido poligalacturônico 0,5 % foram realizados incubando-se 50 μ L de soluções de substratos e 25 μ L de EbE e/ou dos derivados DEAE e Q-sefarose, a 50 °C durante 5 minutos. Após este tempo foram adicionados 150 μ L de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959), com o intuito de detectar a quantidade de açúcar redutor liberado durante o ensaio, sendo então, incubadas em banho fervente por 5 minutos. Ao final, foram adicionados 750 μ L de água deionizada e, posteriormente foi feita a leitura da absorbância a λ 540 nm em leitor de placas (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., EUA). Os controles foram mensurados substituindo o substrato por tampão, nas mesmas condições do ensaio descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas.

Para a determinação da atividade de avicelase, foram incubados 50 μ L de EbE e/ou dos derivados DEAE e Q-sefarose e 50 μ L de avicel 1% a 50 °C durante 5 minutos. Após este tempo foram adicionados 100 μ L de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959), com o intuito de detectar a quantidade de açúcar redutor liberado durante o ensaio, sendo então, incubadas em banho fervente por 5 minutos. Ao final, foram adicionados 1 mL de água deionizada e, posteriormente foi feita a leitura da absorbância a λ 540 nm em leitor de placas (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., EUA). Os controles foram mensurados substituindo o substrato por tampão, nas mesmas condições do ensaio descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas.

Para atividade de FPase foram utilizadas tiras papel de filtro Whatman® n°1 (1 x 3 cm) para cada tubo de ensaio e adicionadas 250 μ L de EbE e/ou dos derivados DEAE e Q-sefarose e 250 μ L de tampão acetato de sódio pH 5,5, 50 mM os quais foram incubados por 1 hora a 50 °C. Após este tempo foram adicionados 100 μ L de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959), com o intuito de detectar a quantidade de açúcar redutor liberado durante o ensaio, sendo então incubadas em banho fervente por 5 minutos. Ao final, foram adicionados 1 mL de água deionizada e, posteriormente foi feita a leitura da absorbância a λ 540 nm em leitor de placas (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., EUA). Os controles foram mensurados substituindo o substrato por tampão, nas mesmas

condições do ensaio descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas.

As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL, sendo definida como a quantidade de açúcares redutores liberados por minuto por mililitro ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) nas condições de ensaio.

Para a determinação das atividades de β -glicosidase, arabinofuranosidase, celobiohidrolase, β -xilosidase e β -mananase foram adicionados 15 μL de EbE e/ou dos derivados DEAE e Q-sefarose, 25 μL das soluções de substratos, 10 μL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. A reação foi incubada em termociclador a 50 °C por 20 minutos, em seguida foi adicionado 50 μL de carbonato de sódio 0,2 M (Na_2CO_3). O p-nitrofenol liberado por hidrólise, que em pH alcalino forma p-nitrofenolato – um composto com coloração amarela. Uma alíquota de 100 μL desta mistura foi quantificada pela leitura da absorbância a λ 410 nm em leitor de placas. Os controles foram mensurados substituindo o substrato por tampão, nas mesmas condições do ensaio descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas.

Para a determinação da atividade de lipase, adicionou-se 10 μL de EbE e/ou dos derivados DEAE e Q-sefarose a 90 μL de meio reacional S1 + S2 na proporção 9:1 (item 3.6.1), os quais foram incubados por 5 minutos a 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de 100 μL de solução saturada de tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). O p-nitrofenol liberado por hidrólise, que em pH alcalino forma p-nitrofenolato – um composto com coloração amarela – foi quantificado pela leitura da absorbância a λ 405 nm em leitor de placas. Os controles foram mensurados substituindo o substrato por tampão, nas mesmas condições do ensaio descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas técnicas.

A solução S1 foi homogeneizada por 25 minutos e estocada a 4°C. A solução S2 foi homogeneizada por 5 minutos e estocada a -20°C. As duas soluções foram misturadas minutos antes de sua utilização e homogeneizadas por 10 minutos. A solução resultante não pode ser estocada.

3.6.6. Meio reacional

- Solução I:
Goma arábica - 0,05 g
Tampão citrato-fosfato (100mM), pH 6,0 (McIlvaine, 1921) - 90 mL
Triton X-100 - 250 μ L
- Solução II:
p-nitrofenilpalmitato - 0,030 g
Isopropanol - 10 mL

Para cálculo de atividade foi utilizada curva padrão de p-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol, por minuto, nas condições de ensaio.

3.7. Dosagem de proteínas

A quantificação de proteína foi realizada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Foram incubados 100 μ L do EB com 1 mL do reagente de Bradford por 5 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi determinada em leitor de placas a λ 595 nm. A unidade proteica foi definida como mg de proteína/mL (mg/mL).

3.8. Eletroforese

As amostras enzimáticas do EbE, concentrado (10 x) e ultrafiltrado foram submetidas à eletroforese em condições não-desnaturantes, conforme descrito por Davis (1964). As amostras foram preparadas utilizando ~ 15 μ g de proteínas e posteriormente diluídas em tampão de amostra azul de bromofenol 0,002% (m/v) e glicerol 10% (m/v). Foram aplicados 20 μ L desta mistura no gel com a concentração de 12 %. As eletroforeses foram realizadas dentro de um isopor com gelo na presença do tampão de corrida Tris-HCl 0,020 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1 %, pH 8,3, sob corrente de 30 mA e 120 V. Após a corrida os géis foram cortados e o lado esquerdo onde estavam presentes o marcador de

peso molecular e as amostras enzimáticas foram coradas com Coomassie Brilhante Blue e o lado direito contendo amostras duplicadas ao lado esquerdo foram coradas de acordo com o protocolo de zimografia (item 3.9).

3.9. Zimografia

As amostras enzimáticas do EbE, EbE concentrado (10 x) e ultrafiltrado foram submetidas ao método de zimografia em PAGE, co-polimerizado com galactomanana - goma de alfarroba 0,1 % (m/v) ou ácido poligalacturônico 0,1 % (m/v). Após a corrida da eletroforese, o gel foi incubado em solução de Triton X-100 2,5 % (v/v) por 1 hora, sob agitação. Em seguida, o gel foi incubado em pH 3,5 a 65 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pelo resfriamento do gel em um isopor com gelo. Posteriormente, o gel foi lavado com água deionizada e corado por 30 minutos, sob agitação. Foi utilizada coloração com vermelho congo 0,1 % para a zimografia de mananase e vermelho de rutênio 0,1 %, para a zimografia de pectinase. Por fim, o gel foi descorado em solução de NaCl 1M até o aparecimento de bandas definidas. Foi adicionado 10 µL de solução de ácido acético 0,5 % (v/v), para melhor visualização das bandas.

3.10. Imobilização enzimática

O EbE foi previamente dialisado em água deionizada e submetido a um processo de imobilização em diferentes suportes iônicos – DEAE-Celulose e Q Sefarose - carregados positivamente e CM celulose – carregado negativamente. Como controle foi utilizado o EbE em sua forma livre.

Os experimentos foram realizados adicionando 1g de suporte de imobilização com 1 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e 9 mL de EbE. Para os experimentos de imobilização o EbE foi concentrado 10x. A mistura foi mantida a 4 °C, sob agitação suave em agitador de rolos. Foram realizados ensaios enzimáticos das amostras de suspensão (derivado) e sobrenadante para as atividades de mananase e pectinase nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas. Como controle foi utilizado o EbE em sua forma livre para avaliar possíveis perdas de atividade com o processo. Após a enzima ser adsorvida,

os suportes foram lavados abundantemente com água deionizada, filtrados e estocados a 4 °C. Posteriormente, os derivados foram avaliados quanto à eficiência de imobilização, estabilidade a temperatura e pH. Os derivados que apresentaram maior taxa de imobilização e maior estabilidade foram utilizados em testes de aplicação.

3.11. Caracterização bioquímica

Para caracterização bioquímica foram avaliados parâmetros como: efeito do pH e da temperatura na reação enzimática, estabilidade ao pH e a temperatura e efeito de sais metálicos.

3.11.1. Efeito da temperatura na atividade de mananase e pectinase

Para determinar o efeito da temperatura na reação enzimática, foram realizados ensaios nas temperaturas de 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C para as atividades de mananase e pectinase, tanto para o EbE quanto para os derivados. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas técnicas.

3.11.2. Efeito do pH na atividade de mananase e pectinase

Foram realizados ensaios para determinação das atividades de mananase e pectinase na presença de diferentes faixas de pH. Foi utilizado o tampão McIlvaine (McIlvaine, 1921) na faixa de pH 2,5-8. Foram adicionados 25 µL da enzima, 25 µL de substrato 0,5 % e 25 µL do tampão 50 mM. Os ensaios enzimáticos foram feitos em triplicatas técnicas.

3.11.3. Avaliação da termoestabilidade na atividade de mananase e pectinase

As amostras foram incubadas nas temperaturas de 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C e alíquotas foram coletadas e testadas da 1ª incubação até perder 50 % de atividade enzimática. Os ensaios enzimáticos foram feitos em triplicatas técnicas.

3.11.4. Avaliação da estabilidade ao pH na atividade de mananase e pectinase

Para avaliar a estabilidade de mananase e pectinase ao pH as amostras foram incubadas por 24 horas em tampão McIlvaine na faixa de pH de 2,5 a 8, em temperatura ambiente (25 °C).

Para avaliar a estabilidade de mananase e pectinase ao pH nos experimentos de imobilização, os derivados selecionados foram incubados nos tempos 0, 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 24 horas em tampão McILvaine nas faixas de pH de 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, e 8,0 em temperatura ambiente (25 °C).

3.11.5. Influência de sais e EDTA na atividade de mananase e pectinase

Com o intuito de avaliar quais compostos iônicos influenciam nas atividades de mananase e pectinase, foram testados diferentes sais metálicos: AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , FeCl_2 , HgCl_2 , KCl , MgCl_2 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CuCl_2 , ZnSO_4 , AgNO_3 e EDTA. 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 3.6 desta seção.

3.12. Dessorção dos derivados em diferentes pHs

Foram realizados ensaios enzimáticos com o intuito de avaliar a dessorção dos derivados DEAE_mananase, DEAE_Pectinase, Q-Sefarose_Mananaase e Q-Sefarose_Pectinase em tampão McILvaine nas faixas de pH de 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 durante os tempos 0, 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 24 horas em temperatura ambiente (25 °C). Os derivados foram ressuspensos na concentração de 0,1 g de derivado em 1 ml dos tampões McILvaine citados acima. Como controle os derivados foram ressuspensos na concentração de 0,1 g de derivado em 1 ml de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0. As reações enzimáticas foram realizadas conforme o item 3.6 desta seção.

3.13. Aplicação do derivado QsMP na clarificação de sucos

Para realizar esse experimento foram escolhidas maçãs fuji e suco de uva integral orgânico. As maçãs foram lavadas, cortadas e trituradas em liquidificador. Posteriormente, 10 mL de suco de frutas foram separadas em frascos Erlenmeyers de 50 mL com 1,5 UI e 2 UI de atividade de mananase e pectinase, respectivamente, do derivado QsMP (suporte Q-sefarose co-imobilizado com mananase e pectinase), por mL de suco de fruta. O controle foi feito por meio de fervura para inativação da enzima. Os frascos foram incubados a 37 °C, 120 rpm, por 5 horas. As amostras foram feitas em replicatas técnicas). Posteriormente foi feita a extração dos sucos de frutas por filtração a vácuo em funil de Büchner e mensurada a turbidez, utilizando leitor de placas. As amostras foram feitas em triplicatas técnicas (Pinheiro *et al.*, 2017).

IV. RESULTADOS

Este trabalho foi dividido em quatro partes, a primeira a respeito da seleção de fungos produtores de mananases, assim como, seleção de meios de cultivo e caracterização do ponto de vista bioquímico do EbE. A segunda parte refere-se à escolha do fungo *A. brasiliensis*, seu cultivo escalonado em biorreator de 5 L e caracterização do ponto de vista bioquímico de mananases e pectinases presentes no EbE. A terceira parte apresenta os experimentos de imobilização de mananases e pectinases presentes no EbE de *A. brasiliensis* em diferentes suportes de troca iônica e caracterização do ponto de vista bioquímico dos derivados e a quarta parte apresenta a análise do potencial de aplicação no processo de clarificação de sucos de frutas.

PARTE I. Seleção de fungos produtores de mananases

4.1. Fonte de carbono e pré-tratamento

Inicialmente, foi escolhido o resíduo agroindustrial casca de soja, como fonte para a produção de mananases, pois a mesma foi utilizada com sucesso durante os estudos realizados no Mestrado (Marco, 2013). Foi feito um pré-tratamento (ver item 3.4), no qual já foi demonstrado em outros trabalhos de pesquisa ser um processo eficiente por três motivos:

1. Aumentar a área de superfície e acessibilidade da enzima por meio de alterações na porosidade e tamanho da partícula de forma a potencializar o acesso das hifas às fibras da parede celular vegetal, aumentando a produção de enzimas hidrolíticas;
2. Eliminar açúcares presentes no material, ou seja, o fungo estaria degradando, de fato, a fonte de carbono e não simplesmente se alimentando de açúcares residuais do processo de moagem da fonte de carbono (Martins, 2012; Marco, 2013).
3. Métodos físicos, tais como pré-tratamentos com moagem e trituração, têm sido utilizados para a degradação da lignocelulose como um procedimento ecológico e de baixo custo (Bhatia *et al.*, 2012).

4.2. Seleção de fungos produtores de mananases

Após o processo de pré-tratamento, foram feitos cultivos em condições submersas utilizando o meio de cultura SR (Rizzatti *et al.*, 2001), durante 7 dias (ver item 3.2), e realizados ensaios enzimáticos (ver item 3.6) para determinação das atividades de mananase do extrato bruto intracelular (EbI) de 13 fungos (*Trichoderma asperelum*, *Talaromyces radicus*, *Fusarium sporotrichoides*, *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma ghanense*, *Euritium Chevalieri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niveus*, *Penicillium coprophilum*, *Talaromyces pinophilus*, *Aspergillus unguis*, *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus clavatus*) aleatoriamente selecionados da micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular.

Na **Figura 12**, pode-se observar que entre os 13 fungos analisados, *A. clavatus* (0,350 UI/mL $\pm$ 0,003) e *A. brasiliensis* (0,292 UI/mL $\pm$ 0,007) apresentaram as maiores atividades de mananase, seguidos de *A. unguis* (0,215 UI/mL $\pm$ 0,008) e *T. pinophilus*

(0,213 UI/mL $\pm$ 0,004). A partir desses resultados, esses 4 fungos foram selecionados para testes de meios de cultura (**Figura 13**).

Figura 12. Seleção de fungos filamentosos produtores de mananase, cultivados em meio submerso SR, contendo cascas de soja 1% como fonte de carbono, durante 7 dias.

4.3. Seleção dos meios de cultura para produção de mananase dos 4 fungos

Foram selecionados 6 meios de cultura comumente utilizados no laboratório para crescimento dos 4 fungos escolhidos e avaliação da produção de mananase durante 7 dias. Como controle foi utilizado o meio de cultura SR pois o mesmo foi utilizado na primeira etapa de seleção apresentado no item 4.4. Na **Figura 13** pode-se observar que dentre os 4 fungos estudados, *T. pinophilus* (0,486 UI/mL $\pm$ 0,022), *A. unguis* (0,441 UI/mL $\pm$ 0,011) e *A. brasiliensis* (0,578 UI/mL $\pm$ 0,004) apresentaram maior atividade de mananase quando cultivados em meio de cultura Vogel entre 72 e 96 horas. *A. clavatus* (0,599 UI/mL $\pm$ 0,006) apresentou maior produção de mananase quando cultivado em MIs com 96 h de crescimento. Com o intuito de comparar bioquimicamente os diferentes perfis dos 4 fungos analisados, ficou definido padronizar os cultivos da seguinte forma: os fungos

T. pinophilus, *A. unguis* e *A. brasiliensis* foram cultivados em meio Vogel por 96 horas e o fungo *A. clavatus* foi cultivado em meio Mls por 96 horas.

Figura 13. Seleção dos meios de cultura para produção de mananase. Os cultivos foram preparados utilizando casca de soja 1% como fonte de carbono, durante 7 dias, 120 rpm, 30°C. (A) *T. pinophilus*, (B) *A. unguis*, (C) *A. brasiliensis*, (D) *A. clavatus*. Legenda: (—■—) Adams, (—●—) Vogel, (—▲—) Khanna, (—◆—) M5, (·····▲·····) Czapek, (—■—) Mls e (—●—) SR.

Para os estudos de caracterização bioquímica foram realizados experimentos de pH (efeito e estabilidade), temperatura (efeito e estabilidade), dosagem de proteínas totais e atividade específica no EbE, efeito da atividade de mananase em relação ao tempo de ensaio, efeito de sais e dosagens de outras enzimas presentes no EbE.

4.4. Caracterização bioquímica

4.6.1. Efeito do pH na atividade de mananase dos 4 fungos

A **Figura 14**, apresenta as representações gráficas do efeito de diferentes pHs sobre a atividade de mananase dos 4 fungos estudados. Para avaliar esse experimento foram utilizados diferentes tampões com faixas de pH de 3,0 a 9,0. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio 50 mM, pHs 3,0 a 6,0; fosfato de sódio 50 mM, pHs 6,0 a 7,5 e Tris HCl 50 mM, pHs 8,0 a 9,0.

Podemos observar que a atividade de mananase dos 4 fungos estudados foi maior na presença do tampão acetato de sódio, ou seja, em pHs de faixa ácida. Os fungos *T. pinophilus* ($0,682 \text{ UI/mL} \pm 0,020$) e *A. unguis* ($0,640 \text{ UI/mL} \pm 0,018$) apresentaram maior atividade de mananase em pH 4,0, *A. brasiliensis* ($0,896 \text{ UI/mL} \pm 0,014$) em pH 3,5 e *A. clavatus* ($0,608 \text{ UI/mL} \pm 0,086$) em pH 4,5. Na presença do tampão Tris-HCl a atividade de mananase teve uma redução de aproximadamente 50 % nos 4 fungos estudados. Na presença do tampão Tris-HCl -HCl a atividade de mananase teve uma redução de aproximadamente 50 % nos 4 fungos estudados.

Existem na literatura muitos estudos que demonstraram que mananases fúngicas apresentam mais perfis de atividade enzimática em pH ácido (Eneyskaya *et al.*, 2009; Kote *et al.*, 2009; Blibech *et al.*, 2010; Norita *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2012), enquanto mananases de origem bacteriana apresentam maior atividade na faixa de pH neutra a básica (Lorentz, 2005; Dhawan & Kaur, 2007; Chandra *et al.*, 2011; Mou *et al.*, 2011).

Figura 14. Efeito do pH na atividade de mananase dos 4 fungos. (A) *T. pinophilus*, (B) *A. unguis*, (C) *A. brasiliensis*, (D) *A. clavatus*. Legenda: (—●—) Tampão acetate de sódio (50mM), (—■—) Tampão fostato de sódio (50mM), (—▲—) Tampão Tris-HCl HCl (50mM).

4.6.2. Efeito da temperatura na atividade de mananase dos 4 fungos

Nesse experimento os EbE dos 4 fungos estudados foram submetidos a ensaios enzimáticos em diferentes temperaturas (**Figura 15**). Pode-se observar que todos os fungos apresentaram maiores atividades de mananase quando submetidos a ensaios enzimáticos nas temperaturas de 60 °C a 70 °C. Analisando separadamente, *T. pinophilus* ($0,807 \text{ UI/mL} \pm 0,010$) e *A. unguis* ($0,614 \text{ UI/mL} \pm 0,008$) apresentaram maior atividade de mananase na faixa de temperatura de 60 °C a 70 °C, e *A. brasiliensis* ($1,115 \text{ UI/mL} \pm 0,007$) e *A. clavatus* ($0,763 \text{ UI/mL} \pm 0,003$) a 65 °C.

A determinação do efeito da temperatura é um dos parâmetros estabelecidos para aplicação industrial de enzimas, portanto é uma etapa importante no processo de seleção e otimização da atividade enzimática. Enzimas que demonstram características de ativação e estabilidade em temperaturas elevadas apresentam interesse industrial, pois as mesmas poderiam, por exemplo, aumentar a velocidade da reação, diminuindo o tempo de reação no reator (Kubicek, 2013; Marco, 2013).

Figura 15. Efeito da temperatura na atividade de mananase dos 4 fungos. **(A)** *T. pinophilus*, **(B)** *A. unguis*, **(C)** *A. brasiliensis*, **(D)** *A. clavatus*.

4.6.3. Quantificação de proteínas e atividade específica de mananase dos 4 fungos

A quantificação de proteínas totais presentes no EbE dos 4 fungos estudados foi determinada pelo método de Bradford (1976). Na **Tabela 4** observa-se que *A. unguis* (0,225 mg/mL) apresentou maior quantidade de proteínas totais e a menor atividade enzimática (0,614 UI/mL) e atividade específica (2,733 UI/mg). Essa característica demonstra que o EbE de *A. unguis* possui muitas proteínas, porém pouca mananase presente. O fungo *T. pinophilus*, apresentou atividade de mananase de 0,807 UI/mL, a segunda maior quantidade de proteínas totais (0,214 mg/mL) dentre os 4 fungos estudados e atividade específica de 3,781 UI/mg. Em contraste o fungo *A. clavatus* apresentou menor quantidade de proteínas totais (0,056 mg/mL) e maior atividade específica (13,581 UI/mg), com atividade enzimática de (0,763 UI/mL), ou seja, o EbE de *A. clavatus* revelou que dentre as proteínas totais, mananase está altamente presente, sendo uma característica importante em processos de purificação. O fungo *A. brasiliensis*, apresentou a maior atividade enzimática (1,115 UI/mL), porém sua atividade específica não foi tão alta (5,614 UI/mg) quando comparado com *A. clavatus* (13,581 UI/mg) e a quantificação de proteínas totais foi a terceira maior dentre os 4 fungos estudados. Como a atividade específica de *A. brasiliensis* não foi tão alta, porém sua atividade enzimática foi a maior, isso pode estar relacionado ao indício da ação sinérgica de outras enzimas com a mananase ou com várias mananases presente no EbE.

Tabela 4. Comparação das atividades de mananase expressas em UI/mL do EbE dos 4 fungos selecionados, a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford expressa em mg/mL e a atividade específica expressa em UI/mg.

	Atividade enzimática (UI/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade específica (UI/mg)
<i>T. pinophilus</i>	0,807 ± 0,004	0,214	3,781
<i>A. unguis</i>	0,614 ± 0,008	0,225	2,733
<i>A. brasiliensis</i>	1,115 ± 0,007	0,199	5,614
<i>A. clavatus</i>	0,763 ± 0,003	0,056	13,581

Na **Tabela 4**, os dados apresentados foram referentes as seguintes condições: Os fungos *T. pinophilus*, *A. unguis* e *A. brasiliensis* foram cultivados em meio vogel por 96 horas e o fungo *A. clavatus* foi cultivado em meio MIs por 96 horas, utilizando casca de

soja 1% como fonte de carbono a 120 rpm, 30 °C. Os ensaios de mananase dos EbE foram realizados nas condições de pH e temperatura estabelecidas na caracterização bioquímica, na qual, *T. pinophilus* e *A. unguis* (tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,0, 70 °C), *A. brasiliensis* (tampão acetato de sódio 50mM, pH 3,5, 65 °C) e *A. clavatus* (tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,5, 65 °C).

4.6.4. Avaliação da termoestabilidade na atividade de mananase dos 4 fungos

Para realizar os experimentos de termoestabilidade os EbE dos 4 fungos estudados, foram incubados em temperaturas de 40 °C a 80 °C (**Figura 16 A-D**). Podemos observar na **Figura 16-A** que a atividade de mananase do fungo *T. pinophilus* foi ativada quando o EbE foi incubado nas temperaturas de 40 °C e 50 °C durante 180 minutos, e a 60 °C durante 30 minutos, no entanto, quando incubado nas temperaturas de 70 °C e 80 °C, perdeu 50 % da atividade após 60 minutos e 10 minutos respectivamente. Na **Figura 16-B**, a atividade de mananase de *A. unguis* também foi ativada nas temperaturas de 40 °C e 50 °C durante 120 minutos, mantendo sua estabilidade até 240 minutos e a 60 °C apresentou ativação durante 30 minutos. Quando o EbE foi submetido a incubação nas temperaturas de 70 °C e 80 °C, a atividade de mananase perdeu 50 % da atividade após 30 minutos e 10 minutos respectivamente.

Com um perfil diferente, na **Figura 16-C**, o fungo *A. brasiliensis* apresentou ativação da atividade de mananase nas temperaturas de 40 °C e 50 °C somente por 10 minutos, em contraste com a temperatura de 70 °C na qual a atividade de mananase manteve-se ativada durante 120 minutos. Em relação a estabilidade, podemos observar as temperaturas de 40 °C e 60 °C, mantendo a atividade de mananase estável durante 1440 minutos (24 horas), e quando incubada a 80 °C, perdeu 50 % da atividade após 10 minutos. Na **Figura 16-D**, o fungo *A. clavatus* apresentou ativação da atividade de mananase nas temperaturas de 40 °C a 60 °C somente por 10 minutos, e perdeu 50% da atividade quando incubado a 70 °C e 80 °C após 10 minutos e no tempo inicial respectivamente.

Figura 16. Avaliação da termoestabilidade dos 4 fungos produtores de mananase (A) *T. pinophilus*, (B) *A. unguis*, (C) *A. brasiliensis*, (D) *A. clavatus*. Legenda: (—◆—) 40 °C, (—■—) 50 °C, (—▲—) 60 °C, (—●—) 80 °C.

A partir dessas análises, fica evidente que a atividade de mananase de *A. brasiliensis* apresentou maior estabilidade térmica nas temperaturas de 40 °C a 70 °C e alta ativação quando incubada a 70 °C, quando comparada com os outros fungos estudados. Essa característica é importante em processos industriais, pois enzimas termoestáveis são capazes de manter sua atividade em elevadas temperaturas, o que favorece a solubilização e redução da viscosidade dos substratos e produtos, aumentando a taxa de reação. Outra característica importante é a maior resistência à ação de proteases. Além disso, processos biotecnológicos em temperaturas elevadas têm menor risco de contaminação microbiana (Marco, 2013).

4.6.5. Avaliação da estabilidade ao pH na atividade de mananase dos 4 fungos

Os experimentos de estabilidade ao pH foram realizados adicionando o EbE de cada um dos 4 fungos estudados com tampões McIlvaine nas faixas de pH de 2,5 a 8,0. As amostras foram incubadas por 24 horas a 25 °C e uma alíquota foi adicionada ao ensaio enzimático, que foi realizado de acordo com os perfis de temperatura e pH ótimos de atividade de mananase dos 4 fungos. O controle foi feito utilizando também os perfis ao pH e temperatura ótima, porém sem a influência da incubação com os diferentes pHs.

Na **Figura 17-A**, o fungo *T. pinophilus* apresentou atividade de mananase estável na faixa de pH de 3,0 a 6,0, sendo ativado nos tampões 4, 4,5, 5 e 5,5. O pH 4,5 apresentou a maior atividade de mananase (2,399 UI/mL), em contraste com o pH 8,0 que apresentou redução de 50 % na atividade de mananase. Observamos também uma redução de 0,132 UI/mL em relação ao controle (1,742 UI/mL) quando incubado no pH 3,5, mas esse resultado pode estar relacionado com o desvio padrão, sendo uma diferença pequena quando comparada com o controle. Na **Figura 17-B** o fungo *A. unguis* apresentou ativação da atividade de mananase em todos os tampões testados. Sendo que no pH 3,0 (2,436 UI/mL) e pH 5,0 (2,562 UI/mL) foi atingida as maiores atividades quando comparadas com o controle (1,422 UI/mL). O fungo *A. brasiliensis* (**Figura 17-C**), apresentou ativação de mananase somente nos pH 3,0 e 3,5 e se manteve estável na faixa de pH 2,5 a 4,5, perdendo 50 % de sua atividade nos pH 7,5 e 8,0. Na **Figura 17-D**, a atividade de mananase de *A. clavatus* foi ativada nas faixas de pH de 3,5 a 8,0 e sua atividade foi inibida na presença do pH 2,5, característica essa que dentre os 4 fungos somente *A. clavatus* apresentou.

Enzimas com características de estabilidade a amplas faixas de pH apresentam potencial na aplicação industrial. Por exemplo, mananases ácidas podem ser associadas com celulasas e xilanases no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol 2G (Bien-Cuong *et al.*, 2009; Songsiriritthigul *et al.*, 2010), enquanto mananases neutras são utilizadas na bioconversão de manana em manooligosacarídeos na indústria alimentícia (Dhawan & Kaur, 2007) e as mananases alcalinas são utilizadas na indústria de polpa de papel e celulose e na indústria de detergentes (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Figura 17. Estabilidade ao pH dos 4 fungos produtores de mananase (A) *T. pinophilus*, (B) *A. unguis*, (C) *A. brasiliensis*, (D) *A. clavatus*.

4.6.6. Efeito de sais metálicos e EDTA na atividade de mananase dos 4 fungos

Foi avaliado o efeito de sais metálicos e EDTA na atividade de mananase dos 4 fungos estudados. Esse experimento é importante para observar o efeito modulador positivo ou negativo desses sais no sítio ativo da enzima. Na **Figura 18** podemos observar que MnCl_2 hiperativou (136%, 121%, 113 % e 111 %) a atividade de mananase no EbE de *T. pinophilus*, *A. unguis*, *A. brasiliensis* e *A. clavatus* respectivamente. AgNO_3 hiperativou (122%) somente a atividade de mananase no EbE de *A. unguis* e Cl_2Fe hiperativou (114 % e 122%) a atividade de mananase no EbE de *T. pinophilus* e *A. brasiliensis* respectivamente. Em contraste, HgCl_2 (A-68% B-69%, C-55% e D-13%) inibiu-as. CoCl_2 inibiu (15%) somente no EbE de *A. brasiliensis*, enquanto superativou nos fungos *T. pinophilus* (132%) e *A. clavatus* (120%). Cl_2Fe (9,89%) e AgNO_3 (64%) também inibiram a atividade de mananase no EbE de *A. clavatus*. Adicionalmente na

Figura 19 os diagramas de Venn mostram a correlação entre os sais metálicos e EDTA que ativaram (A) e inibiram (B) a atividade de mananase dos 4 fungos estudados.

Figura 18. Efeito de sais e EDTA dos 4 fungos produtores de mananase **(A)** *T. pinophilus*, **(B)** *A. unguis*, **(C)** *A. brasiliensis*, **(D)** *A. clavatus*.

Figura 19. Diagrama de Venn ilustrando o efeito dos sais e EDTA dos 4 fungos produtores de mananase **(A)** ativação e **(B)** inibição.

5. Dosagens enzimáticas dos 4 fungos

Com o intuito de obter conhecimento sobre quais outras enzimas além de mananase estariam presentes nos EbE dos 4 fungos estudados, foram realizados ensaios para 13 atividades enzimáticas diferentes. Na **Figura 20 A-D** podemos observar que os 4 fungos apresentaram alta atividade de pectinase e em seguida de mananase. Todos os ensaios foram realizados de acordo com o item 3.6.

As maiores atividades de pectinase encontradas foram nos fungos *A. unguis* (**Figura 20-B**) com 5,471 UI/mL, em seguida *T. pinophilus* (**Figura 20-A**) com 5,031 UI/mL, *A. brasiliensis* com 3,750 UI/mL (**Figura 20-C**) e *A. clavatus* (**Figura 20-D**) com 2,731 UI/mL. Para as atividades de mananase, temos o fungo *A. brasiliensis* com 2,904 UI/mL, em seguida *A. clavatus* com 2,314 UI/mL, *A. unguis* com 2,267 UI/mL e *T. pinophilus* com 2,031 UI/mL. Adicionalmente, *A. brasiliensis* (1,532 UI/mL) e *A. clavatus* (1,129 UI/mL) também apresentaram considerável atividade de xilanase. Analisando os resultados da caracterização bioquímica dos 4 fungos, ficou definido dar continuidade a segunda parte da pesquisa, estudando as enzimas mananase e pectinase do fungo *A. brasiliensis*.

Figura 20. Dosagens enzimáticas dos 4 fungos (A) *T. pinophilus*, (B) *A. unguis*, (C) *A. brasiliensis* e (D) *A. clavatus* cultivados em meio de cultura submerso Vogel, com casca de soja 1% como fonte de carbono, em shaker a 120 rpm, 30 °C, 4 dias. Legenda da esquerda para a direita: (■) Pectinase, (■) Mananase, (■) β-mananase, (■) Xilanase, (■) Amilase, (■) Fpase, (■) Cmcase, (■) Avicelase, (■) β-glicosidade, (■) Arabinofuranosidase, (■) Celobiohidrolase, (■) β-xilosidase, (■) Arabinanase, (■) Lipase.

**PARTE II. Produção de
mananases e pectinases
de *A. brasiliensis***

6. Avaliação das atividades de mananase e pectinase no extrato bruto intracelular (EbI) e extracelular (EbE) do fungo *A. brasiliensis*

Dando seguimento aos estudos com o fungo *A. brasiliensis*, foi feita a extração do extrato bruto intracelular (EbI) e extracelular (EbE) (item 3.3) e realizados os ensaios enzimáticos para as atividades de mananase e pectinase. A **Tabela 5** mostra que tanto mananase quanto pectinase foram produzidas e excretadas pelo fungo para o meio extracelular (EbE) em maior quantidade quando comparada com o a presença dessas enzimas no micélio (EbI).

Tabela 5. Atividades de mananase e pectinase do EbI e EbE de *A. brasiliensis*.

	EbI_Man	EbE_Man	EbI_Pec	EbE_Pec
Atividade enzimática	0,672± 0,059	2,516± 0,087	0,855± 0,045	4,168± 0,160
(UI/mL)	(21,08 %)	(78,92 %)	(17,02 %)	(82,98 %)
Proteínas (mg/mL)	0,453	0,092	0,453	1,308
Atividade específica	1,483	27,316	1,886	5,950
(UI/mg)				

6.1.SDS-PAGE e Zimografia

Com o intuito de visualizar o perfil eletroforético e as bandas presentes no EbE, concentrado (10x) e ultrafiltrado, foi realizada eletroforese sob condições desnaturantes (**Figura 21 A e C**) e concomitantemente zimografica (**Figura 21 B e D**), a fim de, identificar as bandas proteicas correspondentes à atividade de mananase e pectinase respectivamente. No gel SDS-PAGE (**Figura 21 A e C**) podemos observar várias bandas correspondendo a diversidade de proteínas presentes nas amostras. No gel de zimograma correspondente a atividade de mananase, podemos observar as bandas de número 1, 2 e 3 com aproximadamente 45 kDa, 30 kDa e 25 kDa respectivamente, presentes no EbE, concentrado (10x) e no ultrafiltrado. No gel de zimograma correspondente a atividade de pectinase, podemos observar as bandas de número 4, 5 e 6 com aproximadamente 45 kDa, 35 kDa e 23 kDa respectivamente, presentes no EbE, concentrado (10x) e no ultrafiltrado.

Figura 21. Eletroforese SDS-PAGE 12% e zimografia do extrato bruto extracelular (EbE) corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 (**A e C**), vermelho congo 0,1% (**B**) e vermelho de rutênio 0,1% (**D**). Legendas: (MW) marcador de massa molecular, extrato bruto (EB), concentrado (C) – 10 vezes em cartucho 30.000 NMWC no sistema concentrador QuixStand Benchtop (GE Healthcare) e ultrafiltrado (U) obtido pelo mesmo sistema citado. Figuras (**A e B**) correspondem as atividades de mananase e (**C e D**) as atividades de pectinase.

6.2. Caracterização de mananase e pectinase do EbE de *A. brasiliensis* obtidas em biorreator

Para dar continuidade aos estudos bioquímicos, o próximo passo, foi realizar um novo cultivo de *A. brasiliensis* nas condições pré-estabelecidas (meio de cultura vogel com casca de soja 1% como fonte de carbono, durante 4 dias, 30 °C), porém esse novo cultivo foi produzido em biorreator de 5 L (BioFlo & Celligen 310, da New Brunswick), com o intuito de controlar automaticamente as condições do processo, como temperatura, pH, velocidade de agitação e vazão de alimentação de ar. Dessa forma foi possível padronizar as condições de cultivo de forma a melhorar e aumentar a produção enzimática, bem como a obtenção de maiores volumes de EbE. Após a padronização do cultivo, o EbE foi caracterizado bioquimicamente para as atividades de mananase e pectinase.

6.3. Efeito do pH e temperatura de mananase e pectinase do EbE de *A. brasiliensis*

A **Figura 22**, apresenta os gráficos do efeito de diferentes pHs e temperatura sobre as atividades de mananase e pectinase de *A. brasiliensis*. Para avaliar esse experimento foi utilizado tampão McIlvaine nas faixas de pH 2,5 a 8,0. Mananase (**Figura 22 A e B**) apresentou estabilidade nas faixas de pH 3,0 a 5,0, com maior atividade no pH 4,0 (2,512 UI/mL) e temperatura ótima a 70 °C (2,048 UI/mL). Pectinase (**Figura 22 C e D**) apresentou maior atividade em pH 3,5 (3,136 UI/mL) e temperatura ótima a 50 °C (4,357 UI/mL).

Figura 22. Efeito do pH e temperatura de mananase e pectinase do EbE de *A. brasiliensis*. **(A)** e **(C)** Efeito do pH de mananase e pectinase respectivamente **(B)** e **(D)** Efeito da temperatura de mananase e pectinase respectivamente.

6.3.1. Estabilidade ao pH e termoestabilidade

Para avaliação da estabilidade ao pH (**Figura 23 A e C**), o EbE foi incubado em tampão McIlvaine, nos pHs 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, e 8,0 durante 24 horas e foram retiradas alíquotas em tempos definidos para a realização dos ensaios enzimáticos. Podemos observar que mananase (**Figura 23-A**) apresentou ativação em 30 minutos de incubação nos pHs 3,0 e 5,0 (41%), se manteve estável em todos os pHs testados durante as 4 horas de incubação e apresentou novamente ativação em 5 horas de incubação nos pHs 3,0 (98%), 4,0 (86%), 5,0 e 6,0 (54%) e 7,0 (34%). Na **Figura 23-C**, a pectinase apresentou ativação no pH 3,0 (20 %) em 2 horas de incubação, e em pH 7,0 (29 %) em 3 horas de incubação, no entanto perdeu 50 % da atividade após 5 horas de incubação no pH 6,0 e após 24 horas de incubação em todos os pHs testados.

Figura 23. Estabilidade ao pH e termoestabilidade de mananase e pectinase do EbE de *A. brasiliensis*. (A) e (C) Estabilidade ao pH de mananase e pectinase respectivamente. (B) e (D) termoestabilidade de mananase e pectinase respectivamente. Legenda: (—●—) pH 3,0, (---●---) pH 4,0, (—●—) pH 5,0, (—■—) pH 6,0, (—■—) pH 7,0 e (---●---) pH 8,0. Temperatura: (—●—) 40 °C, (---●---) 50 °C, (—●—) 60 °C, (---■---) 70 °C e (—●—) 80 °C. Os ensaios foram realizados nas seguintes condições: mananase (pH 4,0, 70 °C) e pectinase (pH 3,5, 50 °C).

Nos experimentos de termoestabilidade, a atividade de mananase (**Figura 23-B**) apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C durante as 24 horas de incubação, a 70 °C e 80 °C perdeu 60 % da atividade em 3 horas de incubação e 80 % da atividade em 30 minutos de incubação respectivamente. A atividade de pectinase (**Figura 23-D**) apresentou termoestabilidade a 40 °C durante 24 horas de incubação, perdendo somente 13 % de atividade em 48 horas de incubação a 50 °C perdeu 19 % da atividade em 30 minutos de incubação e nas demais temperaturas testadas perdeu 80 % da atividade em 30 minutos de incubação.

6.3.2. Efeito de sais metálicos e EDTA

Foi avaliado o efeito de sais metálicos e EDTA nas atividades de mananase e pectinase de *A. brasiliensis*. Na **Figura 24-A** podemos observar que todos os 14 sais e o EDTA afetaram a atividade de mananase, inibindo a mesma. Na **Figura 24-B** a atividade de pectinase foi ativada por EDTA (110 %) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 %), MgCl_2 não apresentou efeito significativo enquanto todos os outros sais testados inibiram.

Figura 24. Efeito de sais metálicos e EDTA nas atividades de (A) mananase e (B) pectinase de *A. brasiliensis*.

**PARTE III. Imobilização
de mananases e
pectinases de
A. brasiliensis em
suportes iônicos**

7. Imobilização em suportes iônicos

A imobilização de enzimas tem se mostrado uma ferramenta de grande importância para aplicação industrial, pois permite o reuso desse biocatalisador em um processo controlado, além da melhoria na atividade, estabilidade e seletividade da enzima (Vici, 2015). Com base nesses pressupostos o EbE do fungo *A. brasiliensis* (cultivado em meio de cultura vogel com casca de soja 1% como fonte de carbono, durante 4 dias, 30 °C, em biorreator de 5 L) foi submetido a testes de imobilização com foco nas atividades de mananase e pectinase utilizando os suportes de troca aniônica DEAE-Celulose e Q-Sefarose e catiônica CM-Celulose. Adicionalmente foi realizada uma imobilização irreversível unipontual do EbE em BrCN-Sefarose (Brometo de cianogênio) com o intuito de simular a enzima livre em sua forma pura, sem sofrer influência de outras proteínas ou compostos químicos presentes nos extratos brutos (Vici, 2015), no entanto as enzimas estudadas não apresentaram atividade quando imobilizadas ao suporte, dessa forma os dados obtidos não serão apresentados. Em vista disso, os dados obtidos da caracterização bioquímica das enzimas imobilizadas foram comparados com as atividades das enzimas presentes no EbE.

O EbE do fungo *A. brasiliensis* foi imobilizado em DEAE-Celulose (**Figura 25**) e foram avaliados os efeitos das atividades de mananase e pectinase no processo. Na **Figura 25-A**, o perfil de imobilização mostra que a mananase perdeu ~ 15 % de atividade nos primeiros 30 minutos de incubação (suspensão) quando comparada com o controle (EbE livre), no entanto recuperou e ativou sua atividade (37 %) em 4 horas de incubação. Na **Figura 25-B** a atividade de pectinase manteve-se estável durante a primeira hora de imobilização, no entanto não houve ativação e a enzima foi desorvida do suporte com o passar do tempo de imobilização. Dessa forma, podemos concluir que a atividade de mananase teve um melhor desempenho de imobilização nesse suporte.

Quando EbE foi imobilizado em Q-Sefarose (**Figura 26**), observou-se na **Figura 26-A**, um aumento da imobilização com o passar do tempo, atingindo um rendimento máximo de 147 % de atividade de mananase em 5 horas de imobilização. Na **Figura 26-B**, houve uma ativação da atividade de pectinase com rendimento máximo de 41 % em 1 hora de imobilização e um decréscimo da atividade com o passar do tempo de incubação, apresentando 58 % de atividade em 24 horas.

Figura 25. Cinética de Imobilização de (A) mananase e (B) pectinase em DEAE-Celulose. Legenda: (—●—) suspensão, (---●---) sobrenadante. A reação ocorreu a 4 °C, em agitador de rolos. A taxa de imobilização é indicada pela queda na atividade do sobrenadante.

Figura 26. Cinética de imobilização de (A) mananase e (B) pectinase em Q-Sefarose. Legenda: (—●—) suspensão, (---●---) sobrenadante. A reação ocorreu a 4 °C, em agitador de rolos. A taxa de imobilização é indicada pela queda na atividade do sobrenadante.

Um perfil diferente foi observado quando EbE foi imobilizada em CM-Celulose, no qual apresentou dificuldade de ligação da enzima no suporte, isso mostra que tanto mananase quanto pectinase são enzimas que possuem carga negativa, tendo mais afinidade com suportes de carga positiva como foi mostrado nos perfis de imobilização nas **Figuras 25 e 26**. No entanto, podemos observar pelo perfil a possibilidade de cargas positivas presentes na estrutura de ambas as enzimas, pois como pode ser visualizado na **Figura 27-A**, houve ativação de 23% da atividade de mananase nos primeiros 30 minutos de incubação e na **Figura 27-B**, ativação de 35% de atividade de pectinase na primeira

hora de incubação. No entanto o sobrenadante também apresentou grande quantidade de enzima presente, provando que esse suporte não é eficiente para imobilização de ambas as enzimas estudadas.

Figura 27. Cinética de imobilização de (A) mananase e (B) pectinase em CM-Celulose. Legenda: (—●—) suspensão, (---●---) sobrenadante. A reação ocorreu a 4 °C, em agitador de rolos. A taxa de imobilização é indicada pela queda na atividade do sobrenadante.

As **Tabelas 6 e 7** apresentam a taxa de imobilização de EbE para as atividades de mananase e pectinase respectivamente nos suportes testados além da atividade final dos derivados.

Podemos observar na **Tabela 6** que a taxa de imobilização de mananase após 24 horas foi de 94,5 % em DEAE-Celulose e 93,8 % em Q-Sefarose. Quando avaliada a taxa de imobilização de pectinase (**Tabela 7**) observamos 75,2 % em DEAE-Celulose e 86,5 % em Q-Sefarose.

Tabela 6. Taxa de imobilização de EbE_Man em diferentes suportes e atividade final dos derivados.

Suporte	Imobilização após 24 horas (%)	Atividade dos derivados UI/g
DEAE-Celulose	94,5	2,1
Q-Sefarose	93,8	1,4
CM-Celulose	0	-

Tabela 7. Taxa de imobilização de EbE_Pec em diferentes suportes e atividade final dos derivados.

Suporte	Imobilização após 24 horas (%)	Atividade dos derivados UI/g
DEAE-Celulose	75,2	1,1
Q-Sefarose	86,5	2,0
CM-Celulose	0	-

8. Caracterização bioquímica dos derivados

Com o intuito de conhecer melhor as características das enzimas estudadas nos derivados por meio de caracterização bioquímica, foram selecionados os suportes que apresentaram um melhor perfil de imobilização, ou seja, os suportes de troca aniônica DEAE-Celulose e Q-Sefarose para dar continuidade aos experimentos. Os mesmos foram comparados com as atividades de mananase e pectinase do EbE.

8.1.Efeito do pH

A **Figura 28**, apresenta o efeito de diferentes pHs sobre a atividade de mananase e pectinase no EbE nos derivados DEAE-Celulose e Q-Sefarose. Para esse experimento foi utilizado o tampão McIlvaine nas faixas de pH 2,5 a 8,0. Na **Figura 28 A e B** podemos

observar que as maiores atividades de mananase foram alcançadas em pH 4,0 tanto no EbE (2,512 UI/mL) quanto nos derivados DEAE-Celulose (5,401 UI/mL) e Q-Sefarose (6,132 UI/mL). Podemos observar também que o EbE_Mananase manteve atividade em ampla faixa de pH, diferentemente de quando imobilizada, que perdeu sua atividade nas faixas de pH 7,0 a 8,0.

Na **Figura 28-C**, o EbE_Pectinase alcançou maior atividade em pH 3,5 (3,136 UI/mL) e quando imobilizado apresentou maior atividade na faixa de pH 3,0 a 4,5 em DEAE-Celulose (2,787 UI/mL) e no pH 4,5 em Q-Sefarose (4,922 UI/mL). Quando observamos os perfis das **Figura 28 B e D**, concluímos que o derivado Q-Sefarose apresentou as maiores atividades para ambas as enzimas estudadas.

Figura 28. Efeito do pH de (A) EbE_Mananase, (C) EbE_Pectinase e dos derivados correspondentes as atividades de (B) mananase e (D) pectinase. Legenda: (—●—) DEAE-Celulose, (---●---) Q-Sefarose.

8.2.Efeito da temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura, os derivados foram submetidos a ensaios enzimáticos em diferentes temperaturas nas faixas de 40 °C a 80 °C. Na **Figura 29-A** a maior atividade no EbE-Mananase foi alcançada a 70 °C (2,048 UI/mL), e quando imobilizada (**Figura 29-B**) as maiores atividades de mananase foram alcançadas a 65 °C e 75 °C, com DEAE-Celulose e Q-Sefarose apresentando atividades de 7,327 UI/mL e 6,027 UI/mL respectivamente. Na **Figura 29-C**, A a maior atividade no EbE-Pectinase foi alcançada a 50 °C (4,357 UI/mL), no entanto quando imobilizada (**Figura 29-D**) alcançou maior atividade a 65 °C, com DEAE-Celulose e Q-Sefarose apresentando atividades de 5,099 UI/mL e 6,457 UI/mL respectivamente.

Figura 29. Efeito da temperatura de (A) EbE_Mananase, (C) EbE_Pectinase e dos derivados correspondentes as atividades de (B) mananase e (D) pectinase. Legenda: (—●—) DEAE-Celulose, (---●---) Q-Sefarose.

8.3.Avaliação da termoestabilidade

Para realizar os experimentos de termoestabilidade o EbE e os derivados foram incubados nas temperaturas de 40 °C a 80 °C durante 24 horas (**Figura 30**). Podemos observar que a atividade de mananase (**Figura 30-A**) apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C durante as 24 horas de incubação e a 70 °C e 80 °C perdeu 60 % da atividade em 3 horas de incubação e 80 % da atividade em 30 minutos de incubação respectivamente. Quando o EbE foi imobilizado em DEAE_Mananase (**Figura 30-C**) e Sefarose_mananase (**Figura 30-E**) se manteve estável a 40 °C durante as 24 horas de incubação e perdeu 50 % de atividade a 60 °C, 70 °C e 80 °C em DEAE_Mananase (**Figura 30-C**) e a 70 °C e 80 °C em Q-Sefarose_Mananase (**Figura 30-E**) após 30 minutos de incubação.

O EbE_Pectinase (**Figura 30-B**) apresentou termoestabilidade a 40 °C durante 24 horas de incubação, perdendo somente 13 % de atividade em 48 horas de incubação. A 50 °C perdeu 19 % da atividade em 30 minutos de incubação e nas demais temperaturas testadas perdeu 80 % da atividade em 30 minutos de incubação. Quando o EbE foi imobilizado em DEAE_Pectinase (**Figura 30-C**) ativou em 1 horas de incubação a 40 °C e 3 horas de incubação a 40 °C, no entanto diminuiu sua atividade nas horas posteriores. Nas temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C perdeu 50 % da atividade em 30 minutos de incubação. O derivado Q-Sefarose_Pectinase (**Figura 30-F**) apresentou estabilidade durante 1 hora de incubação a 60 °C e ativação de 11 % a 80 °C em 30 minutos de incubação perdendo 77 % de atividade em 2 horas de incubação. A 50 °C ativou 26 % em 4 horas de incubação.

Figura 30. Avaliação da termoestabilidade de (A) EbE_Mananase, (B) EbE_Pectinase, (C) DEAE_mananase, (D) DEAE_Pectinase, (E) Q-Sefarose_Mananase e (F) Q-Sefarose_Pectinase. Nas temperaturas de (- ♦ - ♦ -) 40°C, (— ■ —) 50°C, (— ▲ —) 60°C, (— ▼ —) 70°C e (— ● —) 80°C.

8.4.Avaliação da estabilidade ao pH

Na **Figura 31-A** podemos observar que a atividade do EbE_Mananase se manteve estável em todas as faixas de pH e em 5 horas de incubação foi ativada nas faixas de pH 3,0 a 7,0. Em DEAE-Mananase (**Figura 31-C**) foi ativada no pH 4,0 mantendo-se estável durante 4 horas de incubação e atingindo ativação de 207 % em 24 horas de incubação. Nos pHs 5,0 e 6,0 também foi ativada e se manteve estável durante 3 horas de incubação, no entanto apresentou uma diminuição na eficiência enzimática no tempo 4 horas e recuperou sua atividade com 24 horas de incubação. Nos pHs 3,0 e 7,0 se manteve estável, porém não houve ativação da enzima, e em pH 8,0 perdeu sua atividade desde os primeiros 30 minutos de incubação. Em contraste, quando imobilizada em Q-Sefarose (**Figura 31-C**), foi ativada somente com 4 horas de incubação no pH 5,0, no entanto não perdeu sua atividade quando incubada em pH 8,0.

O EbE_Pectinase (**Figura 31-B**) foi ativado em pH 3,0 com 2 horas de imobilização (20 %) e em pH 7,0 com 3 horas de imobilização (29 %). Em pH 6,0 perdeu 53 % da atividade em 5 horas de incubação e após 24 horas perdeu 50 % de atividade em todos os pHs testados. Quando imobilizada em DEAE-Celulose (**Figura 31-D**), não foi ativada em nenhum dos pHs testados, perdendo o rendimento logo nos primeiros 30 minutos de incubação, no entanto, apresentou estabilidade nos pHs 3,0 e 6,0 durante as 24 horas de incubação. Quando imobilizada em Q-Sefarose (**Figura 31-F**), pectinase foi ativada no pH 5 com 30 minutos de incubação, mantendo sua atividade estável durante as 24 horas de incubação. Em pH 6,0 perdeu um pouco do rendimento nos 30 minutos de incubação, porém recuperou sua atividade entre 1 e 2 horas de incubação, decaindo novamente nos tempos posteriores. Dentre todos os pHs testados, foi menos resistente ao pH 3,0.

Dessa forma podemos observar que tanto mananase, quanto pectinase são enzimas resistentes a pHs ácidos, característica que já está comprovada em testes bioquímicos realizados nesse trabalho, além disso, há na literatura muitas enzimas fúngicas ácidas amplamente utilizadas na indústria.

Figura 31. Avaliação da estabilidade ao pH dos derivados (A) EbE_Mananase, (B) EbE_Pectinase, (C) DEAE_mananase, (D) DEAE_Pectinase, (E) Q-Sefarose_Mananase e (F) Q-Sefarose_Pectinase. Legenda: (—●—) pH 3,0, (---●---) pH 4,0, (—●—) pH 5,0, (—■—) pH 6,0, (—■—) pH 7,0 e (---●---) pH 8,0. Foi utilizado tampão McILvaine.

8.5.Avaliação da dessorção dos derivados em diferentes pHs

Foram realizados ensaios para avaliar a dessorção dos derivados, utilizando tampão McILvaine em diferentes pHs durante 24 horas. Na **Figura 32-A** podemos observar que a atividade do derivado DEAE_Mananase apresentou estabilidade quando incubada nos pHs nas faixas de 3,0 a 7,0 durante 24 horas de incubação e ativação na segunda hora de incubação, porém dessorveu já nos primeiros 30 minutos em pH 8,0. Na **Figura 32-C**, a

atividade do derivado Q-sefarose_ mananase também apresentou estabilidade quando incubada nos pHs nas faixas de 3,0 a 7,0 durante 24 horas de incubação e foi dessorvida nos primeiros 30 minutos em pH 8,0.

Na **Figura 32-B** podemos observar que a atividade de DEAE_Pectinase dessorveu gradualmente no pH 3,0 perdendo a atividade em 4 horas de incubação e nos pHs 4,0 e 5,0 houve dessorção em 2 horas de incubação. A atividade de Q-Sefarose_Pectinase (**Figura 32-D**) dessorveu em 30 minutos de incubação no pH 3,0 e nos pHs 4,0 e 5,0 dessorveu em 2 horas de incubação.

Figura 32. Avaliação da dessorção dos derivados em diferentes pHs (A) DEAE_mananase, (B) DEAE_Pectinase, (C) Q-Sefarose_Manase e (D) Q-Sefarose_Pectinase. Legenda: (—●—) pH 3,0, (---●---) pH 4,0, (—●—) pH 5,0, (—■—) pH 6,0, (—■—) pH 7,0 e (- - -● - -) pH 8,0.

8.6. Efeito de sais metálicos e EDTA

Foi avaliado o efeito de sais metálicos e EDTA nas atividades de mananase e pectinase do EbE, e dos derivados DEAE e Q-Sefarose (**Figura 33**).

Figura 33. Efeito de sais metálicos e EDTA nas atividades (A) EbE_Manase, (B) DEAE_Manase, (C) Q-Sefarose_Manase, (D) EbE_Pectinase, DEAE_Pectinase e (F) Q-Sefarose_pectinase.

Como já foi mencionado na primeira parte dos resultados, esse experimento é importante para observar o efeito modulador positivo ou negativo desses sais no sítio ativo das enzimas estudadas. Na **Figura 33-A** correspondente a atividade de mananase do EbE, podemos observar que todos os 14 sais e o EDTA afetaram a atividade de mananase, inibindo a mesma. Quando imobilizada em DEAE (**Figura 33-B**), foi inibida somente por HgCl₂. Quando imobilizada em Q-sefarose (**Figura 33-C**), foi ativada por BaCl₂, ZnSO₄, AlCl₃, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, MgCl₂ e CoCl₂. Na **Figura 33-D** a atividade de pectinase foi ativada por EDTA (110 %) enquanto (NH₄)₂SO₄ ativou somente 3 %, MgCl₂ não apresentou efeito significativo enquanto todos os outros sais testados a inibiram. Quando imobilizada em DEAE (**Figura 33-E**), a atividade de pectinase foi ativada somente por AgNO₃ (34 %), enquanto todos os outros sais testados a inibiram. No derivado Q-sefarose (**Figura 33-F**) a atividade de pectinase foi inibida por todos os sais testados.

Figura 34. Diagrama de Venn ilustrando o efeito dos sais e EDTA para as atividades de mananase e pectinase. Legenda: (A) ativação e (B) inibição das amostras de EbE_mananase, DEAE_Mananase e Q-Sefarose_Mananase, (C) ativação e (D) inibição das amostras de EbE_pectinase, DEAE_Pectinase e Q-sefarose_pectinase.

8.7. Dosagens enzimáticas dos derivados

Com o intuito de obter conhecimento sobre quais outras enzimas além de mananase e pectinase estariam presentes nos derivados DEAE_mananase, DEAE_Pectinase, Q-Sefarose_Mananase e Q-Sefarose_pectinase, foram realizados ensaios para 13 atividades enzimáticas diferentes. Todos os ensaios foram realizados de acordo com o item 3.6.

Figura 35. Dosagens enzimáticas dos derivados (A) DEAE_mananase, (B) DEAE_Pectinase, (C) Q-Sefarose_Mananase e (D) Q-Sefarose_pectinase. Legenda da esquerda para a direita: (■) Pectinase, (■) Mananase, (■) β -mananase, (■) Xilanase, (■) Amilase, (■) Fpase, (■) Cmcase, (■) Avicelase, (■) β -glicosidade, (■) Arabinofuranosidase, (■) Celobiohidrolase, (■) β -xilosidase, (■) Arabinanase, (■) Lipase.

Na **Figura 35** podemos observar que algumas enzimas presentes no EbE de *A. brasiliensis* (**Figura 20**) se ligaram aos suportes de troca aniônica DEAE-Celulose e Q-Sefarose sendo co-imobilizadas. O derivado DEAE_Mananase (**Figura 35-A**) co-imobilizou mananase (2,547 UI/mL) pectinase (6,099 UI/mL), xilanase (2,455 UI/mL) e

amilase (0,941 UI/mL), o derivado DEAE_Pectinase (**Figura 35-B**) co-imobilizou pectinase (2,575 UI/mL) mananase (2,022 UI/mL), xilanase (1,625 UI/mL), arabinanase (0,701 UI/mL) e amilase (0,469 UI/mL). O derivado Q-Sefarose_Manase (**Figura 35-C**) co-imobilizou pectinase (2,685 UI/mL) mananase (2,310 UI/mL), xilanase (1,368 UI/mL) e β -xilosidase (0,469 UI/mL) e o derivado Q-Sefarose_pectinase (**Figura 35-D**) co-imobilizou pectinase (1,617 UI/mL) mananase (1,375 UI/mL), xilanase (0,707 UI/mL) e β -xilosidase (0,129 UI/mL). Dentre o pool de enzimas presentes no EbE as enzimas pectinase, mananase e xilanase apresentaram maior afinidade de ligação aos suportes testados.

8.8.Dessorção dos devidados em NaCl

Foram realizados ensaios para avaliar a dessorção dos derivados em diferentes concentrações de NaCl conforme **Figura 36**. Podemos observar que a mananase imobilizada em DEAE apresentou um pico de dessorção na concentração de 1,5 M de NaCl e a mananase imobilizada em Q-sefarose apresentou um pico de dessorção na concentração de 2 M. A pectinase imobilizada em DEAE apresentou um pico de dessorção na concentração de 2 M e quando imobilizada em Q-sefarose dessorveu na concentração de 1,5 M. Dentre os quatro derivados analisados, podemos observar que o suporte Q-sefarose teve uma maior afinidade de ligação com a pectinase, que não se desligou com eficiência do suporte.

Figura 36. Avaliação da dessorção dos derivados em diferentes concentrações de NaCl. Legenda: (—●—) DEAE_mananase, (—■—) DEAE_Pectinase, (---●---) Q-Sefarose_Manase e (---■---) Q-Sefarose_Pectinase.

PARTE IV – Análise do potencial de aplicação no processo de clarificação de sucos de frutas

8.9. Aplicação na clarificação de sucos de fruta

Mananases e pectinases são carboidrases utilizadas sozinhas ou em consórcios enzimáticos na indústria de alimentos, com aplicação na redução da viscosidade, melhoria na eficiência da filtração e clarificação de sucos de frutas, resultando no aumento do rendimento. A imobilização de enzimas tem se mostrado uma ferramenta de grande importância para aplicação industrial, pois permite o reuso desse biocatalisador em um processo controlado, além da melhora na atividade, estabilidade e seletividade da enzima, como vimos nos resultados apresentados anteriormente. Em virtude disso, foi selecionado o derivado da imobilização do EbE em Q-sefarose por 1 hora, denominado de QsMP. Desta forma, foi realizado um experimento para avaliar o efeito de QsMP, na redução da viscosidade e turbidez de sucos de frutas. Para esse experimento, foram utilizadas polpas das frutas de maçã fuji e uva integral.

A **Figura 36**, encontra-se o resultado obtido com a aplicação do derivado QsMP no clareamento dos sucos testados, no qual é visível e perceptível o clareamento e queda da viscosidade principalmente no suco de maçã fuji (**Figura 36-A**), que apresentou eficiência na redução da turbidez logo na primeira aplicação e nos dois reusos (45 %, 60 % e 49 % respectivamente), no entanto no suco de uva (**Figura 36-B**) apresentou uma redução de apenas 20 % somente no primeiro uso, perdendo sua eficiência nos reusos seguintes.

Figura 37. Aplicação de QsMP na clarificação dos sucos de (A) maçã fuji e (B) uva integral. (1), controle, (2) primeiro uso de QsMP, (3) primeiro reuso de QsMP, (4) segundo reuso de QsMP, (5) terceiro reuso de QsMP. Os experimentos foram realizados sob agitação de 100 rpm, 37°C, por 5 horas. À polpa da fruta foram adicionadas 0,1g de QsMP por mL.

A turbidez dos sucos de maçã e uva foram analisados por meio de absorvância de luz em diferentes comprimentos de onda utilizando espectrofotômetro (**Figura 37**). Os usos e reusos do derivado QsMP nos sucos apresentaram diferentes valores de absorvância. O suco de maçã apresentou uma maior diferença na absorvância entre 320 e 360 nm (**Figura 37-A**) e nesses comprimentos de onda a absorção de luz das amostras tratadas mostrou diminuição de em 75%.

Figura 38. Estimativa da turbidez dos sucos. Valores para absorvância das amostras dos sucos de maçã fuji (**A**) e uva integral (**B**). Legenda: (—●—) controle, (---●---) primeiro uso, (—●—) primeiro reuso, (---●---) segundo reuso e (—●—) terceiro reuso.

V. DISCUSSÃO

Em virtude da crescente produção agrícola associada com os avanços tecnológicos, todos os anos, milhões de toneladas de resíduos vegetais são gerados em diversas regiões do planeta. E apesar dos diversos destinos, grande parte destes subprodutos são descartados no ambiente, causando considerável impacto ambiental, incluindo proliferação de pragas agrícolas (Gomes, 2017; MAPA, 2018). Felizmente, esses resíduos estão sendo amplamente reaproveitados por meio de processos industriais, como fonte de carbono para produção de enzimas de interesse biotecnológico.

Enzimas são biocatalisadores biodegradáveis, que colaboram com o meio ambiente e reduzem os gastos de energia da produção industrial. E enzimas microbianas são amplamente utilizadas na indústria, pois apresentam propriedades tais como atividade em ampla faixa de temperatura e pH, especificidade. Podem atuar purificadas ou em consórcios enzimáticos de forma sinérgica, imobilizadas, além de serem facilmente produzidas e economicamente viáveis. Após as proteases, celulasas e hemicelulasas são as principais enzimas aplicadas industrialmente (Said & Pietro, 2004; Polizeli *et al.*, 2005; Dhawan & Kaur 2007; Siqueira & Filho, 2010; Chauhan *et al.*, 2012).

Mananases e pectinases são carboidrases que estão ganhando significativo interesse na área biotecnológica devido ao aumento da demanda pela utilização de fontes biorenováveis. São amplamente utilizadas sozinhas ou em consórcios enzimáticos tanto na indústria de alimentos (redução da viscosidade de agentes espessantes, melhora na eficiência da filtração e clarificação de sucos de frutas), como também para aplicação em processos têxteis, biobranqueamento de polpa de celulose, entre outros (Moreira & Filho 2008; Malgas *et al.*, 2015).

Inicialmente optou-se por trabalhar com mananase, utilizando a casca de soja como fonte de carbono indutora, pois durante o mestrado foi possível obter ótimos resultados com o fungo *Aspergillus foetidus* (Marco *et al.*, 2015). Foi então realizada uma seleção de 13 fungos potencialmente produtores de mananases, no qual 4 foram selecionados (*Talaromyces pinophilus*, *Aspergillus unguis*, *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus clavatus*) como melhores produtores de mananase. Há na literatura, relatos que mananases são produzidas por uma vasta gama de fungos filamentosos especialmente pela espécie *Aspergillus* em processos fermentativos distintos (Germec *et al.*, 2017).

Além do gênero *Aspergillus* ser conhecido como um considerável fungo industrial para produção em larga escala de numerosas enzimas (Ozturk *et al.*, 2010). Adicionalmente, o meio de fermentação é um dos componentes mais onerosos, interferindo no valor final do produto, por isso é importante buscar substratos de baixo custo para o processo fermentativo, como resíduos agroindustriais, por exemplo (Vici, 2010).

Após a seleção, os 4 fungos foram cultivados em 7 diferentes meios de cultura, para avaliar o crescimento e buscar a melhor meio para otimização da produção de mananases. Esses meios de cultura variam na composição de íons, no tipo e na concentração da fonte de nitrogênio. Os cultivos foram preparados de forma submersa no qual o substrato fica dissolvido ou suspenso no líquido, geralmente água deionizada, que compõe de 90 a 99% da massa total do meio. Nessa técnica é possível acompanhar com facilidade a formação do produto e consumo do substrato, além do controle do pH, temperatura, crescimento celular, oxigenação e esterilidade. Entretanto, grande volume de resíduo é gerado, e a separação do extrato bruto do meio de cultivo depende de filtração à vácuo (Mitchell *et al.*, 2000; Vici, 2015).

Os cultivos foram deixados durante uma semana em shaker com temperatura controlada de 30 °C e agitação de 120 rpm. Alíquotas foram tiradas diariamente sempre no mesmo horário e ensaios enzimáticos foram realizados. Esse experimento é importante, para avaliar se a quantidade de nitrogênio e principalmente de fonte de carbono disponível no meio influenciam no crescimento do fungo, uma vez, que curtos períodos de incubação podem não resultar na produção máxima do metabólito de interesse e cultivos incubados por um longo período podem levar ao esgotamento dos nutrientes e uma perda na produção enzimática além da morte celular do organismo (Pelczar *et al.*, 1996; Pinheiro, 2014).

Como observado na **Figura 13 A-D**, três fungos, apresentaram maior produção de mananases em meio de cultivo Vogel, que de acordo com o item 3.3, se diferencia dos demais meios testados por apresentar alguns componentes como biotina (vitamina H) e as fontes de nitrogênio extrato de levedura, peptona e os sais de Vogel conjuntamente. Provavelmente esses componentes adicionais contribuíram para um maior crescimento micelial e estimularam ligeiramente a produção de mananases. Somente *A. clavatus* teve um maior desempenho em MIs - meio de cultura utilizado na produção de β -mananases

pelo fungo *A. foetidus*, também cultivado em casca de soja (Marco *et al.*, 2015), que tem como diferencial em sua composição $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio quando comparado com os outros meios de cultivo testados.

Após definir o melhor meio de cultura para cada fungo estudados, os passos seguintes foram: estudos de caracterização bioquímica, no qual foram realizados, experimentos de pH (efeito e estabilidade), temperatura (efeito e estabilidade), dosagem de proteínas totais e atividade específica no EbE. Além de efeito da atividade de mananase em relação ao tempo de ensaio, efeito de sais e dosagens de outras enzimas presentes no EbE.

A determinação do efeito da temperatura e pH é um dos parâmetros estabelecidos para aplicação industrial de enzimas, portanto é uma etapa importante no processo de seleção e otimização da atividade enzimática. Nos experimentos de efeito de pH e temperatura, podemos observar que os 4 fungos estudados (**Figura 14**) apresentaram maiores atividades de mananase em pH ácido (3,5 - 4,0) e em altas temperaturas (65 °C e 70 °C). No trabalho de Norita *et al.* (2010), o fungo *Aspergillus niger*, também apresentou maior atividade de mananase em pH 3,5. Em Li *et al.* (2012) uma β -mannanase de *Aspergillus niger* expressa em *Pichia pastoris*, teve maior atividade em pH 3,5 a 70 °C. Marco *et al.* (2015) reportaram que a atividade de mananase de *Aspergillus foetidus* foi maior a 60 °C em pH 4,0. Além disso, nesse estudo, mananase de *A. brasiliensis*, também apresentou maior estabilidade nas faixas de pH ácida (2,5 – 4,5) e aumento da atividade nos pHs 3,0 e 3,5.

Vários gêneros de fungos filamentosos são descritos na literatura por produzirem β -mananases altamente termofílicas e/ou termoestáveis e em pH ácido (Eneyskaya *et al.*, 2009; Kote *et al.*, 2009; Blibech *et al.*, 2010; Norita *et al.*, 2010; Rashid *et al.*, 2010; Chauhan *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Na **Figura 16** podemos observar que os 4 fungos estudados apresentaram atividade de mananase estável as temperaturas de 40 °C e 50 °C, porém somente a atividade de mananase de *A. brasiliensis* hiperativou a 70 °C e se manteve estável nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C durante 24 horas. O aumento da temperatura aumenta a taxa de reação enzimática devido ao aumento da energia cinética das moléculas presentes na reação. Dessa forma, enzimas que demonstram características de ativação e estabilidade em temperaturas elevadas apresentam interesse industrial, pois as mesmas

poderiam, por exemplo, aumentar a velocidade da reação, diminuindo o tempo de reação no reator (Kubicek, 2013; Marco, 2013).

Está amplamente discutido na literatura o efeito da ativação de enzimas por íons metálicos. Essas enzimas funcionam como co-fatores e são denominadas metaloenzimas (Vici, 2015). Porém, alguns sais podem inibir a atividade enzimática, muitas vezes por interferir na estrutura da proteína. Por exemplo, nas **Figuras 18, 24 e 33**, vimos que HgCl_2 inibiu as atividades de mananase e pectinase presentes no EbE e também quando imobilizadas nos suportes de troca aniônica DEAE-Celulose e Q-sefarose, o que pode indicar a presença de sítios tióis próximos ao sítio catalítico. Podemos observar também que a mananase presente no EbE não foi ativada por nenhum dos compostos testados, não apresentando característica de metaloproteína, porém quando imobilizada em DEAE, mananase foi parcialmente ativada por todos os sais e EDTA, com exceção de HgCl_2 . COCl_2 ativou 54 % a mananase imobilizada em DEAE e BaCl_2 ativou 32 % a mananase imobilizada em Q-sefarose (**Figura 33**). O efeito dos sais metálicos na atividade de mananase pode estar relacionada com as cargas elétricas presentes na superfície da enzima (Zhao et al. 2011).

O agente quelante EDTA hiperativou 210 % a pectinase no EbE apresentando característica de metaloproteína. De acordo com Losonczy et al. (2005), o EDTA melhora a eficácia das enzimas pectinases e xilanases comerciais, e sua aplicação na solução enzimática também tem um efeito significativo sobre a eficiência do processo químico subsequente. O EDTA aplicado simultaneamente com a enzima contribui na criação de áreas livres e acessíveis para a enzima presente, indicando o efeito sinérgico da enzima com o EDTA. No entanto o inverso foi observado na pectinase imobilizada em DEAE e Q-sefarose, no qual o EDTA apresentou efeito inibitório (**Figura 33**), possivelmente pelo fato da pectinase estar aderida ao suporte, reduzindo sua área livre e acessível para interagir com o EDTA. A pectinase foi inibida por todos os sais testados quando imobilizada em Q-sefarose e em DEAE a pectinase imobilizada foi ativada somente por AgNO_3 .

Com o intuito de obter conhecimento sobre quais outras enzimas além de mananase estariam presentes nos EbE dos 4 fungos estudados, foram realizados ensaios para 13 atividades enzimáticas diferentes. Observou-se na **Figura 20**, alta atividade de pectinase nos 4 EbE estudados. Como foi citado no item 1.6 a casca de soja possui em sua

constituição 12,8% de pectina e cerca de 8% de manana em uma relação galactose/manose de 2:3 (Whistler & Saarnio, 1957), sendo então, um ótimo indutor de enzimas como pectinases e mananases. Dessa forma, ficou definido dar continuidade aos estudos com o fungo *A. brasiliensis*.

Com o fungo definido, experimentos de otimização utilizando a metodologia de Plackett e Burman PB 12 (resultados não apresentados), foram realizados, com o intuito de avaliar um número maior de parâmetros, bem como a interação entre eles, sobre a produtividade do fungo para uma maior produção de mananases e pectinases, porém esses testes não apresentaram resultados significativos, então ficou decidido dar continuidade os estudos com meio de cultura Vogel utilizado inicialmente.

Os inóculos foram produzidos em fermentador de 5 L, com o intuito de padronizar as condições de cultivo para melhorar e aumentar a produção enzimática, bem como a obtenção de maiores volumes de EbE. Foi observado o deslocamento do pH ótimo da mananase de pH 3,5 em tampão acetado de sódio 50 mM para pH 4,0 em tampão MacIlvaine. Esse fenômeno pode estar relacionado tanto pela diferença de sais presentes no meio já que o tampão MacIlvaine é composto por ácido cítrico 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M como também pela força iônica presente no meio. Dessa forma, as interações iônicas estão entre as forças que estabilizam a molécula da proteína e permitem que uma enzima reconheça e interaja ao seu substrato (Nelson & Cox, 2014). Também foi observado um deslocamento da temperatura ótima da mananase de 65 °C (1,115 UI/mL) quando o cultivo foi realizado em Erlenmeyers para 70 °C (2,048 UI/mL) quando o cultivo foi realizado em fermentador de 5 L. Nos experimentos de estabilidade ao pH e temperatura, a mananase apresentou perfil similar tanto no cultivo em Erlenmeyer quanto no cultivo em fermentador. A pectinase foi estudada somente após os cultivos realizados em fermentador, não sendo possível comparar seu perfil em Erlenmeyers.

O cultivo foi então, concentrado (10x) em membrana cartucho 30.000 NMWC no sistema concentrador QuixStand Benchtop (GE Healthcare e dialisado para ser preparado para a segunda parte do estudo que consistiu em testes de imobilização, caracterização bioquímica e aplicação no clareamento de sucos de frutas.

O EbE do fungo *A. brasiliensis* foi submetido a testes de imobilização para avaliar o efeito das atividades de mananase e pectinase. A imobilização reversível foi realizada nos

suportes de troca aniônica DEAE-Celulose e Q-Sefarose e catiônica CM-Celulose, e a imobilização irreversível foi realizada em BrCN (Brometo de cianogênio), na qual foi utilizada apenas com o objetivo de simular as características da enzima pura, no entanto esse experimento não apresentou eficiência na ligação das enzimas estudadas ao suporte. De acordo com Voet & Voet (2013) muitas proteínas são incapazes de se ligarem aos seus ligantes acoplados a brometo de cianogênio devido a interferências espaciais (estéricas) com a matriz de agarose. Em virtude disso, ficou definido utilizar o EbE para comparar o comportamento das enzimas estudadas na forma livre e quando imobilizada.

A técnica de imobilização do extrato bruto, é interessante, pois permite que a enzima aderida ao suporte fique mais estável por mais tempo, além de ser mais resistente em temperaturas elevadas e com mais tempo de armazenamento. Já que enzimas em solução não são muito estáveis a temperaturas elevadas nem ao tempo de armazenamento. Essas características, junto a possibilidade do reuso dos derivados, por mais de um ciclo, tem despertado interesse e motivado pesquisas com diversas enzimas com aplicação industrial (Silva, 2009; Vici, 2015).

A imobilização foi realizada durante 24 horas e as dosagens foram feitas entre 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas de acordo com o item 3.6 A taxa de imobilização foi calculada subtraindo-se da atividade inicial da suspensão a atividade residual do sobrenadante (24 horas de imobilização). No qual foi avaliada a taxa de imobilização de mananase (**Tabela 6**) de 94,5 % em DEAE-Celulose e 93,8 % em Q-Sefarose. Quando avaliada a taxa de imobilização de pectinase (**Tabela 7**) observamos 75,2 % em DEAE-Celulose e 86,5 % em Q-Sefarose.

A celulose é o polímero natural mais abundante e tem sido amplamente utilizado para imobilizar várias enzimas produzidas por fungos (Al-Adhami *et al.*, 2002; Mislovicova *et al.*, 2004; Bryjak *et al.*, 2007; Labus *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2011). Os suportes celulósicos modificados com dietilaminoetil (DEAE) têm maior capacidade de armazenamento (Al-Adhami *et al.*, 2002) e tem sido amplamente utilizado para imobilização de enzimas.

Nas **Figuras 28 e 29** correspondentes ao efeito do pH e efeito da temperatura a mananase apresentou aumento da atividade enzimática de 2,048 UI/mL a 70 °C no EbE para 7,327 UI/mL na faixa de 65 °C a 70 °C e o pH 4,0 se manteve, porém, também houve

aumento da atividade de mananase quando imobilizada. A pectinase também apresentou aumento da atividade quando imobilizada em DEAE, além do aumento da temperatura que se deslocou de 50 °C no EbE (4,357 UI/mL) para 65 °C em DEAE (5,099 UI/mL) e pH de 3,5 para uma faixa de pH 3 – 4,5.

Os resultados da termoestabilidade (**Figura 30**) mostram que tanto a mananase quanto a pectinase não apresentaram perfis de aumento de estabilidade quando imobilizadas em ambos os suportes DEAE e Q-sefarose, comparadas com o EbE. Essa característica pode estar relacionada com a diminuição da mobilidade da enzima quando imobilizada no suporte, além disso há outras enzimas competindo pelas ligações no suporte podendo interferir na estabilidade. Em contraste os experimentos de estabilidade ao pH (**Figura 31**) mostraram que mananase e pectinase foram estáveis tanto no EbE quanto imobilizadas, com exceção de DEAE_Mananase que perdeu estabilidade em pH 8,0. Assim como nos experimentos de dessorção em diferentes pHs (**Figura 32**) no qual DEAE_Mananase e Q-Sefarose_Mananase apresentaram estabilidade quando incubada nos pHs nas faixas de 3,0 a 7,0 durante 24 horas de incubação, porém dessorveu em pH 8,0. A pectinase apresentou uma menor estabilidade e dessorveu em menos tempo em ambos os derivados.

Foram realizados ensaios enzimáticos nos derivados estudados para 13 enzimas que foram dosadas no EbE (**Figura 35**). Pode-se constatar que não somente mananases e pectinases, mas também xilanases e outras enzimas em menor concentração co-imobilizaram nos derivados estudados. Essas enzimas podem estar competindo ou atuando sinergicamente umas com as outras. No entanto, mesmo havendo competição, podemos concluir nesse estudo que a imobilização aumentou a atividade das mananases e pectinases estudadas, além do aumento da temperatura, pH, estabilidade ao pH e testes de reuso no processo de clarificação de sucos de frutas. As mananases e pectinases também foram avaliadas em relação a dessorção em diferentes concentrações de NaCl, no qual o derivado Q-Sefarose_Pectinase apresentou forte ligação ao suporte.

O derivado Q-Sefarose_Pectinase foi então denominado QsMP e escolhido para análise do potencial no processo de clarificação de sucos de frutas. E o resultado obtido foi promissor e visivelmente mostrado na **Figura 30-A**, redução da turbidez e queda da viscosidade com a aplicação do derivado QsMP no suco de maçã fuji. No suco de uva o derivado apresentou somente eficiência na redução da turbidez no primeiro uso do

derivado. De acordo com a literatura, as antocianinas são responsáveis pela pigmentação das uvas tintas (Liu, 2002), e o derivado foi capaz de hidrolisar as antocianinas durante a primeira aplicação. No entanto, nos reusos não foi possível obter os mesmos resultados de clarificação do suco de uva.

Os resultados obtidos nesse estudo confirmam que a busca por novas fontes de enzimas, assim como estudos bioquímicos por meio da imobilização utilizando caldos enzimáticos, são de grande importância para diversos tipos de aplicação industrial.

VI. CONCLUSÕES

- ✓ Por meio dos experimentos realizados foi possível constatar que a casca do grão da soja utilizada como fonte de carbono é uma ótima indutora na produção de mananases e pectinases;
- ✓ Dentre os 13 fungos inicialmente selecionados, 4 fungos (*Talaromyces pinophilus*, *Aspergillus unguis*, *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus clavatus*) foram os melhores produtores de mananases e pectinases;
- ✓ A caracterização bioquímica foi imprescindível para otimizar a eficiência das atividades enzimáticas de mananase e pectinase;
- ✓ O fungo selecionado para dar continuidade ao estudo, *Aspergillus brasiliensis*, apresentou uma atividade de mananase inicial de ~ 0,292 UI/mL e após a otimização bioquímica alcançou atividade de mananase de ~ 2,904 UI/mL UI/mL;
- ✓ Quando o EbE foi testado para avaliar a presença de outras enzimas presentes no meio líquido, a atividade de pectinase se destacou com ~3,750 UI/mL;
- ✓ O experimento de zimografia mostrou a presença de múltiplas mananases de tamanhos entre 25 kDa e 45 kDa e pectinases de tamanhos entre 23 kDa, 35 kDa e 45 kDa;
- ✓ A maior atividade no EbE-Mananase foi alcançada a 70 °C e quando imobilizada foram alcançadas a 70 °C e 75 °C, com DEAE-Celulose e Q-Sefarose respectivamente;
- ✓ As maiores atividades de mananase foram alcançadas em pH 4,0 tanto no EbE quanto nos derivados DEAE-Celulose e Q-Sefarose;
- ✓ A maior atividade no EbE-Pectinase foi alcançada a 50 °C, aumentando a temperatura de reação para 65 °C quando imobilizada em DEAE-Celulose e Q-Sefarose;
- ✓ EbE_Pectinase alcançou maior atividade em pH 3,5, aumentando o pH para 4,5 quando imobilizado em ambos os derivados DEAE-Celulose e Q-Sefarose;
- ✓ Os estudos de termoestabilidade mostraram que as tanto as enzimas em seu estado livre quanto imobilizadas apresentaram perfis similares, mantendo maior estabilidade nas temperaturas de 40 °C e 50 °C;
- ✓ Os estudos de estabilidade ao pH mostraram que as tanto as enzimas em seu estado livre quanto imobilizadas apresentaram menor estabilidade ou perda da atividade em pHs de faixa neutra e básica;
- ✓ Os resultados de dessorção em diferentes pHs mostraram que a mananase se manteve estável em pHs mais ácidos, perdendo sua eficiência no pH 8,0;

- ✓ O efeito de sais mostrou que ambas as enzimas estudadas tanto em sua forma livre presente no EbE quanto nos derivados DEAE-Celulose e Q-sefarose, foram altamente inibidas por HgCl_2 indicando a presença de sítios tióis próximo ao sítio catalítico;
- ✓ Pode-se constatar que não somente mananases e pectinases, mas também xilanases e outras enzimas em menor concentração co-imobilizaram nos derivados estudados;
- ✓ As mananases e pectinases também foram avaliadas em relação a dessorção em diferentes concentrações de NaCl, no qual o derivado Q-Sefarose_Pectinase apresentou forte ligação ao suporte;
- ✓ Os experimentos realizados utilizando o derivado QsMP apresentou resultados promissores no efeito de clarificação do suco de maçã fuji e reúso do processo;
- ✓ Estudos que utilizam caldos enzimáticos impuros ou parcialmente purificados como coquetéis ou consórcios enzimáticos de forma a atuar sinergicamente em um processo controlado, são muito promissores para a indústria que busca eficiência e praticidade nas conversões químicas industriais (Marco, 2014).
- ✓ Nesse trabalho, podemos observar que tanto o EbE quanto os derivados estudados e Q-sefarose apresentaram ser promissores, produzindo elevadas atividades de pectinases e mananases e mantendo sua estabilidade em altas temperaturas e pHs ácidos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, J. M. E. Ethylene in plant biology. 2nd Ed. San Diego Academic Press, New York, 1992.

ABREU, H. S.; OERTEL, A. C. Estudo químico da lignina de *Paullinia rubiginosa*. **Cern.**, v.5, n.1, p. 52-60, 1999.

ADAMS, P.R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathol.**, v. 112, p 35-37, 1990.

ADEMARK, P.; VARGA, A.; MEDVE, J.; HARJUNPAA, V.; DRAKENBERG, T.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a β -mannanase. **J. Biotechnol.**, v. 63, n. 3, p. 199-210, 1998.

AL-ADHAMI, A. J. H.; BRYJAK, J.; GREB-MARKIEWICZ, B.; PECZYNSKA-CZUCH, W. Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. **Process Biochem.** 37:1387– 1394, 2002.

ALMEIDA, P. A. **Diversidade do potencial amilolítico em fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis***. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.

AHLAWAT, S.; DHIMAN, S. S.; BATTAN, B.; MANDHAN, R. P.; SHARMA, J. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process. Biochem.**, v. 44, p.521-526, 2009.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. **Int J Biol Macromol.**, v. 95, p. 974-984, 2017.

AREVALO-GALLEGOS, A.; AHMAD, Z. ; ASGHER, M.; PARRA-SALDIVAR, R.; IGBAL, H. M. N. Lignocellulose: a sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach-a review. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 99, p. 308-318, 2017.

BHARDWAJ, V.; DEGRASSI, G.; BHARDWAJ, R. K. Microbial Pectinases and their applications in industries: A review. **Int. Research J. Engineering Technol.** (IRJET), v. 4, I:8, p. 1-8, 2017.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv.**, v. 15, p. 583-620, 1997.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMA, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **AMB Express**, v. 2, n. 65, p. 2-19, 2012.

BIEN-CUONG, D.; THI-THU, D.; BERRIN, J. G.; HALTRICH, D.; KIM-ANH, T.; SIGOILLOT J. C.; YAMABHAI, M. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. **Microb. Cell. Fact.**, v. 8, n.59, p.1-12, 2009.

BLIBECH, M.; GHORBEL, R. E.; CHAARI, F.; DAMMAK, I.; BHIRI, F.; NEIFAR, M.; CHAABOUNI, S. E. Improved mannanase production from *Penicillium occitanis* by Fed-batch fermentation using Acacia seeds. **ISRN Microbiol.**, v. 2011, p. 1-5, 2011.

BOTHAST, R. J.; SCHLINDER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 19-25, 2005.

BOURGAULT, R.; OAKLEY, A. J.; BEWLEY, J. D.; WILCE, M. C. Three-dimensional structure of (1,4)- β -D-mannan mannanohydrolase from tomato fruit. **Protein Sci.**, v. 14, p. 1233-1241, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRYJAK, J.; ANIULYTE, J.; LIESIENE, J. Evaluation of man-tailored cellulose-based carriers in glucoamylase immobilization. **Carbohydr Res.** 342:1105–1109, 2007.
- BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C. Galactomannan from Brazilian legume seeds. **Rev. Bras. Bot.**, v. 13, p.109-112, 1990.
- BUCKERIDGE, M. S.; REID, J. S. G. Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo-(1/4)- β -D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. **Plant.**, v. 192, p. 502-511, 1994.
- BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI, V. R.; ROCHA, D. C.; DIETRICH, S. M. C. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. **Phytochem.**, v.38, p. 871-875, 1995.
- BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 12, p. 137-162, 2000.
- BUCKERIDGE, M. S. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant. Physiol.**, v. 154, p. 1017-1023, 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 glycol-genomics. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 233-238, 2009.
- CANTERI, M. H.G.; MORENO, L. ; WOSIACKI, G. ; SCHEER, A.P. Pectina: da Matéria prima ao produto final. **Polímeros**, v.22, n.2, 2012.
- CARBINATTO, F. M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, 2010.
- CARPITA, N. C.; MCCANN, M. the Cell Wall. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. John Wiley & Sons, New Jersey, 2002.
- CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass Bioenergy**, v.35, p. 4675-4683, 2011.
- CASTRO, V. F.; CELESTINO, J.; QUEIROZ, A. A. A.; GARCIA, F. G. Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia. **Rev. Bras. Fís. Med.**, v. 4, n. 1, p.79- 82, 2010.
- CAZY. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 27 jul. 2018.
- CHAUHAN, P. S.; PURI, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 93, n. 5, p. 1817-1830, 2012.
- CHANDRA, M. R. S.; LEE, Y. S.; PARK, I. H.; ZHOU, Y.; KIM, K. K.; CHOI, Y. L. Isolation, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3. **J Korean Soc. App. Biol Chem.**, v. 54, n.3, p.325–331, 2011.
- CHEMICAL STRUCTURE OF COTTON FIBRE. onlinetextileacademy.com, 2017. Disponível em: <<https://www.onlinetextileacademy.com/chemical-structure-of-cotton-fibre/>> Acesso em: 27 de out de 2018.
- CYBERCOLLOIDS. Disponível em: <<http://www.cybercolloids.net/>>. Acesso em: 27 jul. 2018.
- DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 31, p. 241-312, 1975.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.121, p. 404-427, 1964.

DEY, P. M. Biochemistry of plant galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 35, p. 341-376, 1978.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 54, p. 597-606, 2006.

DHAWAN, S.; KAUR, J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 27, n. 4, p. 197-216, 2007.

EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>> Acesso em: 17 out. 2018.

ENEYSKAYA, E. V.; SUNDQVIST, G.; GOLUBEV, A. M.; IBATULLIN, F. M.; IVANEN, D. R.; SHABALIN, K. A.; BRUMER, H.; KULMINSKAYA, A. A. Transglycosylating and hydrolytic activities of the β -mannosidase from *Trichoderma reesei*. **Biochimie.**, v. 91, p.632–638, 2009.

ENDRESS, H. U.; MATTES, F. Pectin. In: CHO, S. S.; SAMUEL, P. *Fiber Ingredients: Food Applications and Health-Benefits*. 1. Ed. CRC Press, 2009, p. 135 – 160.

FERNANDES, T. G.; LÓPEZ, J. A.; SILVA, L. A.; POLIZELI, M. L. T. M.; SILVA, D. P.; RUZENE, D. S.; CARVALHO, M. L. S.; CARVALHO, Í. F. Prospecting of soybean hulls as an inducer carbon source for the cellulase production. **Prep. Biochem Biotechnol.**, v. 48, n.8, P.743-749, 2018.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. EDUCS, p. 215-242, 2010.

FERREIRA, H. M.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydr. Polym.**, v. 57, n. 1, p. 23-29, 2004.

FILHO, E. X. F. Hemicellulases and biotechnology. In: PANDALAI, S. G. Recent Research Developments in Microbiology., Trivandrum, p.165-176, 1998.

Enzimas em Alimentos: Natureza e função das enzimas nos alimentos. **Food Ingredients Brasil**, 2015. Disponível em: <http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060596305001464873911.pdf>. Acesso em: 18 de novembro de 2018.

GANTER, J. L. M. S.; MILAS, M.; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydr. Polym.**, v. 17, p. 171-175, 1992.

GANTER, J. L. M. S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; REICHER, F. Structural studies on galactomannanas from brazilian seeds. **J. Carbohydr. Chem.**, v. 12 (6), p. 753-767, 1993.

GARMUS, T. T.; BEZERRA, J. R. M. V.; RIGO, M.; CÓRDOVA, K. R. V. Elaboração de biscoitos com adição de farinha de casca de batata (*Solanum tuberosum* L.). **Rev. Bras. Tecnol. Agroind.**, v. 3, p. 56-65, 2009.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GLOBAL PECTINASE MARKET RESEARCH REPORT. (2017). Disponível em: <<http://www.marketresearchstore.com/report/global-pectinase-marketresearch-report>>. Acesso em: 12 de jun de 2018.

GOMES, H. A. R. **Perfil e caracterização de holocelulases secretadas por *Penicillium fellutanum* com ênfase em mananase**. 2014 (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. **Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, n. 4, p. 375-84, 2005.

GUISAN, J. M.; POLO, E.; AGUADO, J.; ROMERO, M. D.; ALVARO, G.; GUERRA, M. J. Immobilization-stabilization of thermolysin onto activated agarose gels. **Biocatal Biotransfor**, v. 15, n. 3, p. 159-173, 1997.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. New Jersey: Humana Press, 2006. 449 p.

HAYWORTH, D. **Covalent Immobilization of Affinity Ligands**. Disponível em: < <http://www.piercenet.com/method/covalent-immobilization-approaches> >. Acesso em: out de 2018.

HENDRIKS, A T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

INOUE, H.; YANO, S.; SAWAYAMA, S. Effect of β -mannanase and β -mannosidase supplementation on the total hydrolysis of softwood polysaccharides by the *Talaromyces cellulolyticus* cellulase system. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 176, p. 1673-1686, 2015.

JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. cellulase production and enzymatic hydrolysis of some selected local lignocellulosic substrates by a strain of *Aspergillus niger*. **Res J Bio Sci**, v.2, n.1, p. 13-16, 2007.

JACKSON, M. E. Mannanase, Alpha-galactosidase and Pectinase. In: BEDFORD, M.; PARTRIDGE, G. (Org.). **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. 2. ed. Oxford: CABI, 2010. 319p.

JANA, U. K.; SURYAWANSHI, R. K.; PRAJAPATI, B. P.; SONI, H.; KANGO, N. Production optimization and characterization of mannoooligosaccharide generating β -mannanase from *Aspergillus oryzae*. **Bioresour. Technol.**, v.268, p. 308-314, 2018.

JARAMILLO, P. M. D. **Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de Pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo**. 2014, 165 (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 47, p. 221-268, 2000.

JORDÃO, R.C.C. **Imobilização de lacases a partículas magnéticas de Polisiloxano - Álcool Polivinílico**. 2010. (Mestrado). Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, Brasil.

JOVANOVIĆ, I.; MAGNUSON, J. K.; COLLART, F.; ROBBERTSE, B.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; BAKER, S. E. Fungal glycoside hydrolases for saccharification of lignocellulose: outlook for new discoveries fueled by genomics and functional studies. **Cellul.**, v. 16, n. 4, p. 687-697, 2009.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour Technol**, v. 77, n. 3, p. 215–27, 2001.

KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. **Annu Rev Food Sci Technol.**, v.4, p.21-34, 2013.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus sp.* **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p 242-243, 1995.

KOTE, N. V.; PATIL, A. G. G.; MULIMANI, V. H. Optimization of the production of thermostable endo- β -1,4 mannanases from a newly isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 152, p. 213-223, 2009.

KUBICEK, C. P. **Fungi and lignocellulosic biomass**. John Wiley & Sons, Inc., 2013.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 2007.

KULCINSKAJA, E.; ROSENGREN, A.; IBRAHIM, R.; KOLENOVA, K.; STALBRAND, H. Expression and characterization of a *Bifidobacterium adolescentis* β -mannanase carrying mannan-binding and cell association motifs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 1, p. 133-140, 2013.

LABUS, K.; TUREK, A.; LIESIENE J.; BRYJAK, J. Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. **Biochem Eng J.** 56:232–240, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nat.**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSSON, A. M.; ANDERSON, L.; XU, B.; MUÑOZ, I. G.; USÓN, I.; JANSON, J. C.; STALBRAND, H.; STAHLBERG, J. Three-dimensional crystal structure and enzymic characterization of β -mannanase Man5A from blue mussel *Mytilus edulis*. **J. Mol. Biol.**, v. 357, p. 1500-1510, 2006.

LIAO, H.; LI, S.; ZHENG, H.; WEI, Z.; LIU, D.; RAZA, W.; SHEN, Q.; XU, Y. A new acidophilic thermostable endo-1,4- β -mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2: cloning, characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnol** 14:90, 2014.

LIEPMAN, A. H.; NAIRN, C. J.; WILLATS, W. G. T.; SORENSEN, I.; ROBERTS, A. W.; KEEGSTRA, K. Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. **Am. Soc. Plant Biolog.**, v. 143, p. 1881-1893, 2007.

LIMA, D. U. **Interação molecular entre celulose e hemiceluloses e suas implicações biológicas e tecnológicas**. 2002. (Doutorado). Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

LISBOA, C. G. S.; TONINI, P. P.; TINE', M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S. Endo β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. **Braz. J. Plant Physiol.**, v: 18, p.269.280, 2006.

LORENTZ, R.H. **Seleção de isolados de *Paenibacillus spp* com atividade enzimática e antimicrobiana**. 2005. 103 (Mestrado). Departamento de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

LOSONCZI, A.; CSISZ'AR, E.; SZAK'ACS, G.; BEZ'UR, L. Role of the EDTA Chelating Agent in Bioscouring of Cotton. **Text Res J.**, vol. 75, 5: pp. 411-417, 2005.

LU, H.; LUO, H.; SHI, P.; HUANG, H.; MENG, K.; YANG, P.; YAO, B. A novel thermophilic endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* XZ3: functional roles of carbohydrate-binding module and Thr/Ser-rich linker region. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, p. 2155-2163, 2014.

MACDOUGALL, A. J.; RING, S. G. Pectic Polysaccharides. In: TOMASIK, P. (Ed.) *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides*. CRC Press, Boca Raton, 2004, p. 181 – 195.

MAKKY, E. A.; YUSOFF, M. M. Bioeconomy: pectinases purification and application of fermented waste from *Thermomyces lanuginosus*. **J Med Bioeng**, Singapore, v. 4, n. 1, p. 76-80, 2015.

MALGAS, S.; VAN DYK, S. J.; PLETSCHE, B. I. β -Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism - A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. **Enz. Microb. Technol.**, v. 70, p. 1-8, 2015.

MARCO, J.C.I.; NETO, G.P.S.; CASTRO, C.F.S.; MICHELIN, M.; POLIZELI, M.L.T.M.; FILHO, E.X.F. Partial purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Aspergillus foetidus*. **Appl. Sci.**, v. 5, p. 881-893, 2015.

MARTINS, P. A. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico**. 2012. (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

MARTINEZ, J. C. (2008). Fontes alternativas de energia para bovinos leiteiros - Parte 4. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao/fontes-alternativas-de-energia-para-bovinos-leiteiros-parte-4-42182n.aspx>>. 15 de abril de 2018.

MATEO, C.; PESSELA, B. C.; FUENTES, M.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; BETANCOR, L.; ALONSO-MORALES, N.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Very strong but reversible immobilization of enzymes on supports coated with ionic polymers. In: GUISAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press, 2006. p.205-216.

MCCLEARY, B.V. Comparison of endolytic hydrolases that depolymerize 1,4- β -D-mannan, 1,5- α -L-arabinan, and 1,4- β -D-galactan. **ACS. Symp. Ser.**, v. 460, p. 437-449, 1991.

MCILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparasions. **J Bio Chem.**, Bethesda, v.49, p.185-186, 1921.

MERÍN, M. G.; MORATA DE AMBROSINI VI. Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-*Saccharomyces* yeasts for enzymatic production during winemaking. **Lett Appl Microbiol.**, v. 60, p.467-474, 2015.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SØRENSEN, H. R. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. **J. Cereal Sci.**, v. 50, n. 3, p. 337-344, 2009.

MILLER, M. C.; KLYOSOV, A. A.; MAYO, K. H. Structural features for α -galactomannan binding to galectin-1. **Glycobiol.**, v. 22, n. 4, p. 543-551, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>> Acesso em: 02 mar. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2017-a-2027-versao-preliminar-25-07-17.pdf>> Acesso em: 02 abril 2018.

MISLOVICOVA´ D.; MASAROVA, J.; VIKARTOVSKA, A.; GERMEINER, P.; MICHALKOVA, E. Biospecific immobilization of mannan-penicillin G acylase neoglycoenzyme on Concanavalin A-bead cellulose. **J Biotechnol.** 110:11-19, 2004.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 79, n. 2, p. 165-78, 2008.

MOREIRA, L. R. S.; MILANEZI, N. V. G.; FILHO, E. X. F. Enzymology of plant cell wall breakdown: An update. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Routes to Cellulosic Ethanol**: Springer New York, p. 73-96, 2011.

MORRILL, J.; KULCINSKAJA, E.; SULEWSKA, A.M.; LAHTINEN, S.; STALBRAND, B. S.; HACHEM, M. A. The GH5 1,4- β -mannanase from *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BI-04 possesses a low-affinity mannan-binding module and highlights the diversity of mannanolytic enzymes. **BMC Biochem.**, p.16-26, 2015.

MOU, H.; ZHOU, F.; JIANG, X.; LIU, Z. Production, purification and properties of β mannanase from soil bacterium *Bacillus circulans* M-21. **J Food Biochem.**, v. 35, p.1451–1460, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed., Artmed, 2014.

NORITA, S.; ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A. B. Evaluation of the activities of concentrated crude mannan-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger*. **Mal. J Microbiol.**, v. 6, n. 2, p.171–180, 2010.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresour. Technol.**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward and industrial metabolism. **Biochem.**, v. 91, p. 659-664, 2009.

OLANIYI, O. O.; AROTUPIN, D. J. Fermentation products of β -mannanase producing bacteria inhibit selected poultry borne pathogens. **Br. Microbiol. Res. J.**, v. 3, n. 4, p. 612-622, 2013.

OLIVEIRA, A. N.; PAULA, D. A.; OLIVEIRA, E. B.; SARAIVA, S. H.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M. Optimization of pectin extraction from *Uba* mango peel through surface response methodology. **Int J Bio Macromol.**, v. 113, p. 395-402, 2018.

OSKAY, M.; YALÇIN, H. T. Screening of Yeast Strains for Pectinolytic Activity: Effects of Different Carbon and Nitrogen Sources in Submerged Fermentations. **OnLine Journal of Biological Sciences.**, v. 15, n. 3, p. 89-96, 2015.

OSLEN, H. S. **Enzymes at work-a concise guide to industrial enzymes and their use**. Novozymes A/S Bagsvaerd, Denmark. 58p, 2000.

OSUNA, Y.; SANDOVAL, J.; SAADE, H.; LÓPES, R. G.; MARTINEZ, J. L.; COLUNGA, E. M.; LA CRUZ, G.; SEGURA, E. P.; ARÉVALO, F. J.; ZON, M. A.; FERNANDÉZ, H.; ILYINA, A. Immobilização of *Aspergillus niger* lipase on chitonsan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, v. 38, p. 1437-1445, 2015.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Comparative studies of pectinase production by *Bacillus subtilis* strain Btk 27 in submerged and solid-state fermentations. **Biomed Res Int.**, v. 2018, 10p, 2018.

PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. “ β -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme”. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, R. Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpinaceae. **Phytochem.**, v. 49, n.3, p. 737-743, 1998.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F. R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 44, p. 107-112, 2001.

PETKOWICZ, C. L. O.; SCHAEFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* is not a reserve polysaccharide. **Carbohydr. Polym.**, v. 69, p. 659-664, 2007.

PHAM, T. A.; BERRIN, J. G.; RECORD, E.; TO, K. A.; SIGOILLOT, J. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: role of a carbohydrate-binding module. **J. Biotechnol.**, v. 70, p. 148-163, 2011.

PINHEIRO, V. E.; DESAGIACOMO, C. C. V.; MICHELIN, M.; MALLER, A.; MONTEIRO, L. M. O.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. *Neosartorya glabra* polygalacturonase produced from fruit peels as inducers has the potential for application in passion fruit and apple juices. **Braz. J. Food Technol.**, v. 20, e2016163, 2017.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M.; DAMASIO, A.; MALLER, A.; CABRAL, H.; POLIZELI, A. Pectinases produced by microorganisms. In: POLIZELI, M. L. T. M.; Rai, M. (Org.). *Fungal Enzymes*. 1ed. Boca Raton USA: CRC Press, 2013, v. 1, p. 316-340.

POTTERS, G.; VAN GOETHEM, D.; SCHUTTE, F. Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. **Nat. Educ.**, 3(9), 14, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of Plants**. 8. ed. New York: W.H., Guanabara Koogan, 2014.

RECHIA, C. G. V.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Polysaccharides from the seeds of *Senna multijuga*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n.6, p. 409-412, 1995.

REICHER, F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; FONTANA, J. D.; CORRÊA, J. B. C. Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 28, p. 353-361, 1991.

REID, J. S. G.; MEIER, H. Chemotaxonomic aspects of the reserve galactomannan in leguminous seeds. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 62, p. 89-92, 1970.

REHMAN, H. U.; QADER, S. A. U.; AMAN, A. Polygalacturonase: production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. **Carbohydr. Polym.**, v. 90, p. 387-391, 2013.

RESTLE, J.; FATURI, C.; FILHO, D. C. A.; BRONDANI, I. L.; SILVA, J. H. S.; KUSS, F.; SANTOS, C. V. M.; FERREIRA, J. J. Substituição do grão de sorgo por casca de soja na dieta de novilhos terminados em confinamento. **R. Bras. Zootec.**, v. 6, p. 1009-1015, 2004.

RIZZATTI, A. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G.; POLIZELI, M. L. Purification and properties of a thermostable extracellular beta-D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.

ROBOZ, E.; BARRAT, R. W.; TATUM, E. L. Breakdown of pectic substances by a new enzyme from *Neurospora*. **J Biol Chem**, v. 195, p. 459-471, 1952.

RODRÍGUEZ-GACIO, M. C.; IGLESIAS-FERNANDEZ, R.; CARBONERO, P.; MATILLA, A. J. Softening-up mannan-rich cell walls. **J. Exp. Bot.**, v. 63, p. 3976-3988, 2012.

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; BARFKNECHT, D. M.; SILVEIRA, M. M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT – F Sci Technol**, 44, p. 2217-22, 2011.

SANTI, L.; BERGER, M.; ORLANDO, W. B. S. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biológico. **Rev Cad Pedagóg**, v.11, n.1, 2014.

SANTOS, I. D. **Holocelulose e extrativos na densidade básica e contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal**. 2008. (Mestrado). Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasil.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SAID, S.; PIETRO, R. C.L.R. 2004. Enzimas Termoestáveis Industrialmente Importantes. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto. Legis Suma, 2004. Cap. 2, p. 9-20.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Ann. ver. plant bio.**, v. 61, p. 263-89, 2010.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S. M.; AYUB, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p.2898-2904, 2008.

SCIUTO, D. L. **Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja - purificação parcial e caracterização de uma endoglicinase**. 2015 (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasil.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quím. Nova.**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SINGHA, R.; KRISHNAA, B. B.; KUMARA, J.; BHASKARA, T. Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment. **Biol. Technol.**, p. 1-10, 2015.

SIQUEIRA, F. G.; FILHO, E. X. F. Plant Cell Wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. **Bent. Sci. Publ.**, v. 7, n. 1, p. 55-60, 2010.

SONGSIRIRITTHIGUL, C.; BURANABANYAT, B.; HALTRICH, D.; YAMABHAI, M. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. **Microb. Cell. Fact.**, v. 9, n. 20, p.1-13, 2010.

SOUZA, A. H. C. B. **Guia técnico ambiental da indústria de papel e celulose**. Papel e Celulose, São Paulo, 2008.

SRERE, P. A.; UYEDA, K. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. **Methods Enzymol.**, v. 44, p. 11-19, 1976.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. Seed galactomannans: An overview. **Chem. Biodiv.**, v. 2, n. 3, p. 295-317, 2005.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nat.**, v. 9, p. 433-443, 2008.

STRULLU-DERRIEN, C.; STRULLU, D-G. Mycorrhization of fossil and living plants. **Comptes Rendus Palevol**, v. 6, n. 6-7, p. 483-494, 2007.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TARIK, A.; LATIF, Z. Isolation and biochemical characterization of bacterial isolates producing different levels of polygalacturonases from various sources. **African J. Microbiol. Res.**, V. 6(45), p. 7259-7264, 2012.

TIMELL, T.E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Sci. Technol.**, v. 1, p. 45-70, 1967.

UENOJO, M.; PASTORE, M. Pectinases: Aplicações Industriais e Perspectivas. **Quím. Nov.**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VAN DE VELDE, F.; LOURENÇO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; BAKKER, M. Carrageenan: a food grade and biocompatible support for immobilization techniques. **Adv. Synth. Catal.**, v. 344, p. 815-835, 2002.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VAN ZYL, W. H.; ROSEA, S. H.; TROLLOPEB, K.; GÖRGENSB, J. F. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochem.**, v. 45, n. 8, p. 1203-1213, 2010.

VARGA, J.; KOCSUBE', S.; TOTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **Int. J. Syst. Evol. Micr.**, v. 57, p.1925-1932, 2007.

VICI, A. C. **Clonagem, expressão e imobilização de uma lipase de *Beauveria bassiana* com aplicação em biocatálise**. 2015. (Doutorado). Departamento de Bioquímica e Imunologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4 ed. Artmed, 2013.

VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **Am. Nat.**, v. 98, p. 435-446, 1964.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiol. Mol. Bio. Rev.**, v. 65, n. 4, p. 497-522, 2001.

WANG, C.; LUO, H.; NIU, C.; SHI, P.; HUANG, H.; MENG, K.; BAI, Y.; WANG, K.; HUA, H.; YAO, B. Biochemical characterization of a thermophilic β mannanase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with high specific activity. **Appl Microbiol Biotechnol** 99:1217–1228, 2015.

WEINGARTNER, V. **Produção, Purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *Aspergillus niger***. 2010. (Doutorado). Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

WHISTLER, R. L.; SAARNIO, J. Galactomannan from soy bean hulls. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, n. 22, p. 6055-6057, 1957.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons, p.148, 1975.

YAMABHAI, M.; SAL-UBOL, S.; SRILA, W.; HALTRICH, D. Mannan biotechnology: from biofuels to health. **Crit. Rev. Biotechnol.**, p. 1-11, 2014.

YAMASHITA, B. B. V. G. **Extração sequencial de compostos fenólicos e pectina da casca da manga assistida por ultrassom**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Porto alegre, 2017.

YAMAURA, I.; NOZAKY, Y.; MATSUMOTO, T.; KATO, T. Purification and some properties of an endo-1,4- β -D-mannanase from a marine mollusc, *Littorina brevicula*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, n. 4, p. 674-676, 1996.

YANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, B.; YANG, X.; DONG, Y.; QIU, D. A *Verticillium dahliae* pectate lyase induces plant immune responses and contributes to virulence. **Front Plant Sci.**, v.9, p.1–15, 2018.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C.; SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scient.**, v. 23, n. 4, p. 937-943, 2001.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. **Bioresour. Technol.**, p. 3-13, 2015.

ZHAO, W.; ZHENG, J.; ZHOU, H. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS513.88: constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*. **Bioresour Technol** 102:7538–7547, 2011.