

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

MARIA ALICE SILVESTRE

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE:
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO E
CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

FEVEREIRO/2013

MARIA ALICE SILVESTRE

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE:
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO E
CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO SIMÕES
RIBEIRO LEITE**

**Dissertação de mestrado submetida ao
programa de pós-graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, como um dos
requisitos necessários para a obtenção do
título de mestre em Ciência e Tecnologia na
área de concentração Ciência Ambiental.**

DOURADOS/MS

FEVEREIRO/2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S587b	Silvestre, Maria Alice. Bioprospecção de fungos com potencial para produção de β -glicosidase: avaliação dos parâmetros de cultivo e caracterização das enzimas produzidas. / Maria Alice Silvestre – Dourados, MS : UFGD, 2013. 26f. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) Universidade Federal da Grande Dourados. 1. β -glicosidase. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Fungos. I. Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. II. Título. CDD – 589.222
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “Bioprospecção de fungos com potencial para produção de β -glicosidase: avaliação dos parâmetros de cultivo e caracterização das enzimas produzidas”, de autoria de **Maria Alice Silvestre**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
(Orientador - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo
Membro Examinador (UFMS)

Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña
Membro Examinador (UFGD)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Rodrigo Simões Ribeiro Leite, orientador dessa dissertação, agradeço por todos os conhecimentos transmitidos, apoio e disposição para orientação ao longo do meu mestrado.

A Universidade Federal da Grande Dourados, a CAPES e ao programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental por propiciarem meu desenvolvimento acadêmico profissional. A FCBA e seus técnicos, pela disponibilidade dos espaços físicos e apoio para realização desse trabalho.

Aos amigos de pós-graduação, agradeço pelos bons momentos durante as aulas e pesquisas, especial ao André, por nunca me deixar em paz, obrigado pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica: Ana Carolina, Vinicius, Taísa, Marília, Rodrigo, Ândrea, Gabriela e Marta obrigada pela colaboração e amizade.

A Paula, que tornou os dias dentro do laboratório mais engraçados, obrigada pela ajuda e companhia durante esses dois anos de pesquisa.

A Bia, pelas tardes de café para espairecer.

Ao Manu, por sempre ter palavras de incentivo.

Aos meus irmãos Luna e Gabriel, meus cunhados Murilo e Maria Rita, e minha sobrinha Maia, vocês são lindos e fazem parte de quem eu sou.

Aos meus pais Célia e Rogério, meus orientadores na vida, obrigada por sempre me mostrarem os caminhos, me ensinarem a pensar criticamente e viver com amor.

Ao meu marido Victor, obrigado por me apoiar e acompanhar com paciência e carinho, durante a realização desse trabalho sua pessoa foi fundamental para meu equilíbrio.

Ao Hector, que ainda cresce dentro de mim, com muito amor.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1**– Seleção de microrganismos para produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo com 70% de umidade por 96 horas. Os isolados 20, 21 e 23 foram cultivados a 45°C e os outros isolados a 28°C. **10**
- Tabela 2:** Seleção de resíduo agroindustrial como substrato para a produção de β -glicosidase, o cultivo em estado sólido ocorreu por 96 horas nas respectivas temperaturas ótimas de crescimento de cada isolado.**12**
- Tabela 3:** Parâmetros de cultivo em estado sólido para produção de β -glicosidase à partir dos microrganismos selecionado.**16**
- Tabela 4:** Características bioquímicas das β -glicosidases produzidas em condições otimizadas de cultivo.**17**
- Tabela 5:** Atividade relativa das β -glicosidases de fungos termofílicos em substrato sintético (pNP β G) e substrato natural (Celbiose). As atividades relativas obtidas pela hidrólise da celbiose foram expressas em porcentagem da atividade enzimática obtida utilizando pNP β G como substratos.**19**
- Tabela 6:** Tipo de inibição da glicose sobre a atividade enzimática das linhagens avaliadas.**22**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da molécula de celulose (ÂNGELO, 2010).	2
Figura 2 – Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico sobre celulose (OGEDA; PETRI, 2010).	3
Figura 3 – Temperatura ótima de crescimento micelial, medida do diâmetro do alo da colônia em centímetros.	11
Figura 4: Produção de β -glicosidase em função da umidade em CES utilizando farelo de trigo como substrato, o cultivo ocorreu por 96 horas nas respectivas temperaturas ótimas de cada isolado.	13
Figura 5: Efeito do pH na produção de β -glicosidase utilizando farelo de trigo para o CES por 96 horas em temperatura ótima dos microrganismos e umidade de 65% (Is. 20), 60% (Is. 21) e 70% (Is. 23).	15
Figura 6: Tempo de cultivo para produção de β -glicosidases em farelo de trigo, com umidade de 65% (Is. 20), 60% (Is. 21) e 70% (Is. 23), pH 5,0 (Is. 20 e 21) e pH 4,0 (Is. 23).	16
Figura 7: Efeito de etanol sobre a atividade das β -glicosidases dos isolados 20, 21 e 23 em diferentes temperaturas (40, 50, 55 °C e * Temperatura ótima de atividade das enzimas).	20
Figura 8: Efeito de glicose sobre a atividade das β -glicosidases.	21

RESUMO

Neste trabalho foram isoladas 17 linhagens de fungos filamentosos morfologicamente distintos, sendo 4 termófilos. Devido a crescente busca por microrganismos termófilos, e a maior estabilidade estrutural de suas enzimas, as linhagens 20, 21 e 23 foram selecionadas para produção de β -glicosidase por Cultivo em Estado Sólido (CES). Dentre os subprodutos agroindustriais utilizados, o farelo de trigo foi o melhor substrato para produção de β -glicosidase em CES e a umidade ideal variou entre 60 e 75% para os diferentes isolados. O pH inicial ideal para a produção da enzima fica entre 4,0 e 5,0 e o tempo de cultivo para produção máxima de β -glicosidase pelos isolados 20, 21 e 23 foi respectivamente, 72, 96 e 96 horas. Ao final desta etapa obtivemos extratos onde a produção máxima de β -glicosidases foi de 6,0 U/mL, 6,81 U/mL e 11,75 U/mL respectivamente. Esses extratos foram caracterizados bioquimicamente e as β -glicosidases contidas neles apresentaram pH ótimo entre 4,5 e 5,5 e temperatura entre 60 e 70 °C. A β -glicosidase produzida pelo isolado 20 apresentou maior estabilidade térmica, mantendo-se estável até 70°C. Todas as enzimas apresentaram aumento da atividade catalítica com a presença de etanol na mistura de reação, indicando atividade transglicosilação. O perfil de inibição por glicose foi muito semelhante para todas as enzimas avaliadas. No entanto, o tipo de inibição apresentado pela enzima do isolado 20 é diferente dos demais por ser não competitiva. Todas as enzimas apresentaram potencial para hidrolisar celobiose, no entanto, a maior afinidade para esse substrato foi apresentada pelas β -glicosidases produzidas pelos isolados 20 e 23. Os resultados obtidos demonstram que as linhagens selecionadas apresentam potencial para produção de β -glicosidases por CES e as características das enzimas são apreciáveis para aplicação industrial, considerando principalmente a elevada estabilidade apresentada.

Palavras-chave: Celulases; Cultivo em Estado Sólido; Fungos Filamentosos.

ABSTRACT

In this work, 17 strains of morphologically distinct filamentous fungi were isolated, 4 of them being thermophiles. Due to the growing demand for thermophilic microorganisms, due to the greater structural stability of their enzymes, the isolates 20, 21 and 23 were selected to produce β -glucosidase by Solid State Cultivation (CES). Among the agro-industrial by-products used, wheat bran was the best substrate for the production of β -glucosidase in CES and ideal humidity ranged between 60 and 75% for the different isolates. The initial optimal pH for the enzyme production is between 4.0 and 5.0 and the culture time for maximum production of β -glucosidase by isolates 20, 21 and 23 was respectively 72, 96 and 96 hours. At the end of this step, extracts were obtained in which the maximum production of β -glucosidases was 6.0 U / mL, 6.81 U / mL and 11.75 U / mL respectively. These extracts were biochemically characterized and β -glucosidase contained therein had an optimum pH between 4.5 and 5.5 and temperature between 60 and 70 °C. The β -glucosidase produced by isolate 20 showed higher thermal stability, remaining stable up to 70 °C. All enzymes showed increased catalytic activity in the presence of ethanol in the reaction mixture, indicating transglycosylation activity. The inhibition by glucose profile was very similar for all the enzymes studied. However, the type of inhibition displayed by the enzyme from isolated 20 differs from others by being non-competitive. All enzymes showed potential to hydrolyze cellobiose, however, the highest affinity for this substrate was presented by β -glucosidase produced by isolates 20 and 23. The results demonstrate that the selected strains have potential for the production of β -glucosidase by CES and characteristics of enzymes for industrial application are appreciable, considering mainly the high stability they presented.

Keywords: Cellulases; Solid State Cultivation; Filamentous Fungi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. METODOLOGIA.....	6
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1) Isolamento e seleção de linhagens com potencial para produção de β-glicosidade	9
3.2) AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE β-GLICOSIDASE.....	11
3.2.1) Seleção do Substrato	12
3.2.2) Umidade ideal	13
3.2.3) Determinação do pH inicial para a produção das enzimas	14
3.2.4) Tempo de Cultivo.....	15
3.3) CARACTERIZAÇÃO DAS β-GLICOSIDASES PRODUZIDAS PELAS LINHAGENS ISOLADAS.	17
3.3.1) Efeito de pH e temperatura sobre a atividade das enzimas.....	17
3.3.2) Hidrólise de Celobiose	18
3.3.3) Efeito de etanol.....	19
3.3.4) Efeito de glicose.....	21
4) CONCLUSÕES	23
5) REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da biodiversidade e a bioprospecção de microrganismos tornaram-se um dos principais focos da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos em diferentes setores, tanto industriais como ambientais, crescem de forma acelerada no atual cenário mundial. A diversidade metabólica e a adaptabilidade genética dos microrganismos permitiu seu uso como fonte inesgotável de produtos bioativos utilizados em processos biotecnológicos (OLIVEIRA, 2006).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular, genômica, metagenômica e bioinformática, o processo de busca e descoberta de produtos naturais a partir de recursos microbianos vem sofrendo profundas alterações, principalmente no estudo de microrganismos não cultiváveis. As técnicas tradicionais de isolamento e cultivo associadas às novas tecnologias permitem uma exploração mais abrangente, pois se estima que apenas 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. Dessa forma será possível ampliar o conhecimento sobre a diversidade microbiana, capacidade metabólica e características fenotípicas dos microrganismos (PEIXOTO, 2008; OLIVEIRA, 2006).

Entre os inúmeros microrganismos não patogênicos utilizados industrialmente, os fungos filamentosos se destacam pela facilidade de cultivo e alta eficiência na produção de enzimas extracelulares (GUIMARÃES, 2006).

Os fungos são microrganismos eucariontes que contribuem para a estabilidade de ecossistemas, por serem altamente eficientes na degradação de diversos substratos, sendo responsáveis pela produção de uma ampla gama de metabólitos primários e secundários que são utilizados na área médica, industrial, agrícola ou ambiental (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Fatores ambientais apresentam profunda influência sobre o crescimento dos fungos; temperatura, teor de umidade, pH e aeração afetam o crescimento de modo que distintas espécies têm diferentes valores ótimos. A maior parte dos fungos descritos são mesófilos, crescem em temperaturas ótimas entre 15 e 40°C, mas também existem espécies termófilas e psicrofilas, isto é, adaptadas a altas e baixas temperaturas, respectivamente (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

Dentre as 50.000 espécies de fungos descritas, existem cerca de 30 que possuem capacidade de crescer em temperaturas acima de 40 °C, chamados de termófilos. A capacidade de crescer em temperaturas elevadas está relacionada a adaptações na estrutura de membrana plasmática, proteínas e DNA (GOMES et al., 2007).

Os fungos termófilos desenvolvem-se naturalmente em processos de compostagem, sucedendo os mesófilos na fase de alta temperatura (acima de 40°C), e assimilando carbono a partir de polissacarídeos constituintes da biomassa vegetal, como amido, celulose, hemicelulose e pectina, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares (MAHESHWARI et al., 2000; GOMES, et al., 2007).

A celulose é o principal polímero presente na parede celular vegetal e a substância orgânica renovável mais abundante na natureza, podendo ser utilizada como fonte de carbono em bioprocessos a fim de obter enzimas degradadoras de celulose (celulases). A molécula de celulose é composta de unidades de β -D-glicose (Figura 1), sintetizado principalmente pelas células vegetais para constituição da parede celular, caracterizada pela sua organização molecular e recalcitrância das regiões cristalinas (ÂNGELO, 2010).

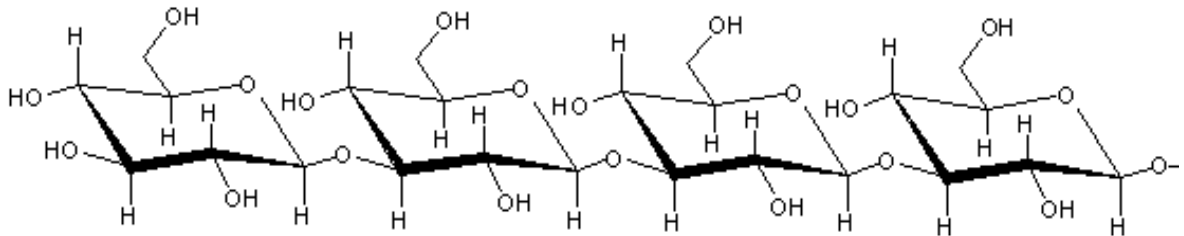


Figura 1: Estrutura química da molécula de celulose (ÂNGELO, 2010).

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (OGEDA; PETRI, 2010).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, essas enzimas são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico (Figura 2) e são divididas em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que

atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).

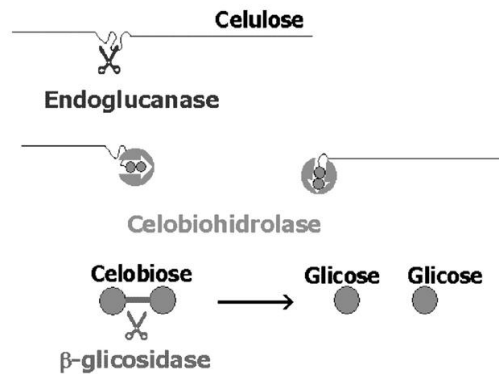


Figura 2 – Representação esquemática da ação catalítica do complexo celulolítico sobre celulose (OGEDA; PETRI, 2010).

As β -glicosidases são um grupo de enzimas bem heterogêneo que podem ser classificadas em três categorias com base na especificidade do substrato: (1) arilo- β -glicosidases, que atuam sobre substratos do grupo aril-glucósidos; (2) celobiasas verdadeiras, que hidrolisam a celobiose para liberar glicose; (3) enzimas com baixa especificidade ao substrato, que são ativas sobre uma grande variedade de substratos. Estas enzimas possuem dois modos de ação que determinam sua aplicação: (1) atividade hidrolítica, onde catalisam a hidrólise da ligação β 1,4-glicosídica em oligossacáridos de cadeia curta; (2) atividade de transglicosilação ou glicosil transferase, que consiste na capacidade de síntese de ligações glicosídicas (BHATIA et al., 2002).

A alta atividade de hidrólise associada à tolerância a glicose, calor, álcool e ácidos são características importantes para enzimas potencialmente aplicáveis em processos industriais e a bioprospecção de linhagens fúngicas com boa produção de β -glicosidase tem-se concentrado nesses parâmetros (KRISCH et al., 2012).

As β -glicosidases tem papel crucial na degradação da celulose, devido à propriedade de hidrolisar a celobiose, dissacarídeo de glicose formado pela ação de enzimas despolimerizantes sobre a cadeia de celulose. O acúmulo de celobiose no meio reacional inibe a atividade de enzimas celulolíticas, desta forma, a β -glicosidase possibilita a continuidade do processo catalítico porque degrada o principal inibidor das

celulases, liberando monossacarídeos fermentescíveis para a produção de etanol (PARRY et al., 2001).

A função desempenhada pelas β -glicosidases no processo de degradação enzimática da celulose faz com que esta enzima apresente grande potencial para a indústria de etanol, contribuindo para viabilizar a obtenção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais ricos em celulose (LEITE et al., 2007).

As β -glicosidases também apresentam aplicabilidade na indústria de sucos e bebidas, por atuarem em sinergia com outras enzimas celulolíticas para desestruturar a matriz da parede celular dos vegetais, o que facilita a ruptura da célula vegetal aumentando a extração do suco. Durante o processo de vinificação a adição de celulases auxilia a extração de antocianinas e terpenos, que estão presentes na casca da uva e são os compostos responsáveis pela coloração e aroma do vinho (LEITE et al., 2007). As celulases são utilizadas no processamento de frutas, hortaliças e grãos tornando-se indispensáveis para a hidrólise de parede celular das plantas, no aumento do rendimento e na redução da viscosidade de derivados de frutas (COURI et al, 2000).

A hidrólise de isoflavonas glicosiladas de soja é uma importante aplicação de β -glicosidase na indústria de alimentos, por aumentar a biodisponibilidade das isoflavonas ao intestino humano (SINGHANIA et al., 2009).

Com crescimento da indústria de alimentos e biocombustíveis houve também um aumento da geração de resíduos agroindustriais, que geralmente não recebem a devida atenção, no sentido de serem usados ou reciclados, evitando o desperdício e consequentes problemas ambientais devido ao acúmulo de matéria orgânica no meio ambiente (SINGHANIA et al., 2009). Esses resíduos são ricos em material lignocelulósicos constituídos por lignina, hemicelulose e celulose, unidas entre si por ligações covalentes e não covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

As características dos resíduos agroindustriais permitem sua utilização como substratos para o crescimento microbiano, pois se assemelham com o habitat natural desses microrganismos sendo ideais para obtenção de produtos com alto valor agregado, como as enzimas, antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento de plantas, ácidos orgânicos, biopesticidas, incluindo micopesticidas e herbicidas, biossurfactantes, biocombustíveis, compostos de aroma, etc (PANDEY et al., 2000; SINGHANIA et al., 2009; BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

O Cultivo em Estado Sólido (CES) é um bioprocesso onde o crescimento microbiano e as formações de produtos ocorrem na superfície do substrato sólido e na ausência de água livre, devido a seus aspectos físico-químicos é um processo que apresenta diversas vantagens para obtenção de produtos de origem microbiana. Os substratos tradicionalmente utilizados são produtos agrícolas, resíduos agroindustriais e florestais. Dentre os produtos agrícolas e seus resíduos os mais utilizados são: arroz, trigo, painço, cevada, milho e soja, farelo de trigo, bagaço de cana, sabugo e palha de milho, farelo de soja entre outros (PANDEY et al., 2000; PANDEY, 2003).

Os fungos filamentosos são os que melhor se adaptam ao CES, devido a sua morfologia, visto que o crescimento em hifas permite melhor colonização do substrato e melhor adaptabilidade aos aspectos físico-químicos do processo (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

O substrato ideal deve não só servir como suporte para as células, mas também, fornecer nutrientes para que a cultura microbiana se desenvolva nele. Com essas características, o farelo de trigo tem sido o principal subproduto utilizado em pesquisas com CES, principalmente para produção de enzimas de interesse industrial (COURI et al, 2000; PANDEY et al., 2000).

A aplicação do CES para produção de enzimas microbianas tem recebido grande atenção, visto que, as quantidades de enzimas secretadas por fungos filamentosos neste sistema frequentemente superam as secretadas em Cultivo Submerso (CS). Além disso, apresentam características diferentes (peso molecular, parâmetros cinéticos e condições ótima) em relação às obtidos em CS. O CES é favorecido pelo reduzido teor de água, o que gera um processo industrial limpo, com baixos níveis de água residual e com economia energética no processo de recuperação (*downstream*) (VINIEGRA-GONZALEZ, 1997; BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

A utilização de fungos filamentosos termófilos em CES é uma alternativa para superar alguns entraves da aplicação industrial da β -glicosidase, considerando a redução do custo de produção e a estabilidade estrutural das enzimas produzidas por linhagens termófilas. Além disso, diminuem problemas com contaminação devido a baixa atividade de água, desfavorecendo o crescimento de leveduras e bactérias. Nesse sentido, objetivou-se com esse trabalho prospectar fungos filamentosos na região de Dourados-MS, visando isolar linhagens termófilas com potencial para produção de β -glicosidase por CES e caracterizar as enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas.

2. METODOLOGIA

2.1) Isolamento dos fungos

Para o isolamento das linhagens de fungos filamentosos foram coletadas amostras de pilhas de compostagem, pilhas de bagaço de cana-de-açúcar (Usina São Fernando Açúcar e Álcool Ltda.) e serapilheira de fragmento de floresta estacional semidecidual atlântica (Mata do Azulão), todas localizadas na região de Dourados-MS. As amostras foram diluídas seriadamente e 100 µL foi inoculado em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose acrescido de 0,25 g/L de tetraciclina. As placas foram incubadas a 28 e 45°C a fim de isolar linhagens mesófilas e termófilas, e as colônias foram replaqueadas para obter colônias puras. Para manter a viabilidade os microrganismos foram mantidos a 4°C em tubos de ensaio com meio Sabouraud Dextrose inclinado, que foram repicados mensalmente. Cada isolado também foi mantido com óleo mineral sobre o micélio, estes foram repicados a cada ano.

2.2) Seleção das linhagens com potencial para produção de β-glicosidase

2.2.1) Preparo do inóculo

Os microrganismos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantido por 48 horas nas respectivas temperaturas de crescimento dos isolados. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente composta de sulfato de amônia 0,1%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,1% e nitrato de amônia 0,1% (m/v), previamente autoclavada. A inoculação do fungo no substrato se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão para os frascos Erlenmeyer contendo farelo de trigo.

2.2.2) Cultivo em Estado Sólido

Para seleção das linhagens promissoras os isolados foram cultivados em Estado Sólido (CES) por 96 horas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g de farelo de trigo umedecidos com solução nutriente (descrita no item anterior) até obter 70% de

umidade. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado a 121°C durante 20 minutos.

2.2.3) Extração da enzima

A enzima foi extraída pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer contendo o substrato com o fungo cultivado. Os frascos foram mantidos em agitação por 1 hora a 150 rpm, em seguida foram filtrados e posteriormente centrifugados a 1500 xg. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

2.2.4) Determinação da atividade de β -glicosidase nos extratos enzimáticos

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50 μ L do extrato enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP β G, Sigma), a reação enzimática ocorreu por 10 minutos a temperatura de 50°C e foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2000 mM. O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

2.3) Determinação da temperatura ótima dos fungos termófilos

Para determinar a temperatura ótima de crescimento das linhagens selecionadas, os isolados foram cultivados em temperaturas que variaram de 25 a 60 °C, por repique de ponto central em placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose, e o diâmetro do alo formado pelo micélio foi medido a cada 24 horas durante 96 horas.

2.4) Avaliação dos parâmetros de cultivo

As linhagens selecionadas foram cultivadas em diferentes resíduos agroindustriais a fim de estabelecer o substrato ideal para produção de β -glicosidase por CES, os resíduos avaliados foram sabugo de milho, bagaço de cana, palha de milho, casca de arroz, farelo de soja e farelo de trigo. A umidade do substrato foi variada de 50 a 90%, utilizando a solução nutriente anteriormente descrita. A fim de estabelecer o pH ideal para o processo foi utilizada solução nutriente com pH variando de 4,0 a 7,0 para

umedecer o substrato. O tempo de cultivo para a máxima produção de β -glicosidase foi avaliado a cada 24 horas durante 168 horas. Cada parâmetro de cultivo foi avaliado separadamente, os respectivos ótimos foram adotados nos ensaios posteriores, sendo que no último ensaio todas as características ideais para produção da enzima foram adotadas.

2.5) Caracterização bioquímica das β -glicosidasas produzidas

2.5.1) Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0), nesta etapa foi utilizado tampão McIlvaine a 0,1M. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas (35 a 70°C), no respectivo pH ótimo da enzima. A estabilidade da enzima ao pH foi avaliada incubando-a por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram McIlvaine 0,1M (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0 - 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 - 10,5). A termoestabilidade foi estudada incubando a enzima por 1 hora em valores de temperatura que variaram de 30 a 70°C. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima.

2.5.2) Avaliação do potencial de hidrólise de celobiose pelas enzimas produzidas

O potencial das enzimas de hidrolisar celobiose foi avaliado através do Kit enzimático colorimétrico (Glicose-PP Analisa), incubando 100 μ L do extrato enzimático em tampão acetato de sódio 50 mM com 0,5% de Celobiose (Fluka), a reação ocorreu a 50°C por 10 minutos e foi paralisada em banho de gelo. Para quantificar a glicose liberada foi adicionado 1 mL da solução de cor do kit glicose-oxidase na reação anterior, que reagiu a 37°C por 10 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo. A glicose liberada foi quantificada por espectrofotometria a 505 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de produto por minuto de reação.

2.5.3) Efeito da concentração de etanol e glicose sobre a atividade das β -glicosidases

A atividade enzimática foi avaliada adicionando diferentes concentrações de etanol (0 – 30%) e de glicose (0 – 100 mM) na mistura de reação para dosagem de atividade de β -glicosidase. Os ensaios foram realizados em condições ótimas de temperatura e pH de cada enzima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1) ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LINHAGENS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE B-GLICOSIDADE

Posteriormente ao processamento das amostras foram isolados 17 fungos morfológicamente distintos, sendo 13 mesófilos e 4 termófilos. Os microrganismos isolados foram depositados no banco de cultura do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, seguindo a sequência numérica estabelecida em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa. Para avaliar a produção de β -glicosidase todos os fungos foram cultivados em estado sólido por 96 horas utilizando farelo de trigo como substrato, com umidade inicial de 70%.

Dentre os fungos mesofílicos, obtidos a 28°C, os isolados 12 e 25 se destacaram para produção de β -glicosidase, pois produziram cerca de 4,50 e 7,32 U/mL respectivamente. Todos os isolados obtidos a 45°C apresentaram potencial para produção de β -glicosidase com aproximadamente 4,81 U/mL, 4,92 U/mL, 1,80 U/ml, 4,22 U/mL e 2,08 U/ml, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1– Seleção de microrganismos para produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo com 70% de umidade e tempo de cultivo 96 horas.

Isolados	Local de coleta	Temperatura de isolamento (°C)	β-glicosidase (U/mL)
Is.11	Bagaço de Cana	28	0,84
Is.12	Pilha de Compostagem	28	4,50
Is.13	Pilha de Compostagem	28	3,43
Is.14	Serapilheira	28	0,74
Is.15	Pilha de Compostagem	28	2,55
Is.16	Cama de Frango	28	0,37
Is.17	Cama de Frango	28	0,79
Is.18	Cama de Frango	28	0,28
Is.19	Cama de Frango	28	0,33
Is.20	Serapilheira	45	4,81
Is.21	Bagaço de Cana	45	4,92
Is.22	Bagaço de Cana	45	1,80
Is.23	Bagaço de Cana	45	4,22
Is.24	Cama de Frango	45	2,08
Is.25	Pilha de Compostagem	28	7,32
Is.26	Pilha de Compostagem	28	1,12
Is.27	Pilha de Compostagem	28	1,75

Com o objetivo de confirmar a termofilia dos microrganismos obtidos em temperatura de 45°C, os isolados foram submetidos a temperaturas entre 25 e 60°C para determinar a temperatura ótima de crescimento, para isso, o crescimento micelial foi acompanhado pela medição do diâmetro em centímetros.

Os isolados 20 e 23 atingiram a borda da placa de Petri de 9 cm após 48 horas de cultivo a 50 e 40°C, respectivamente. Para o isolado 21 a temperatura de 45°C foi ideal para o crescimento em diâmetro. O isolado 22 apesar de crescer em 45°C não é termófilo, visto que sua temperatura ótima de crescimento foi 35 °C (Figura 3).

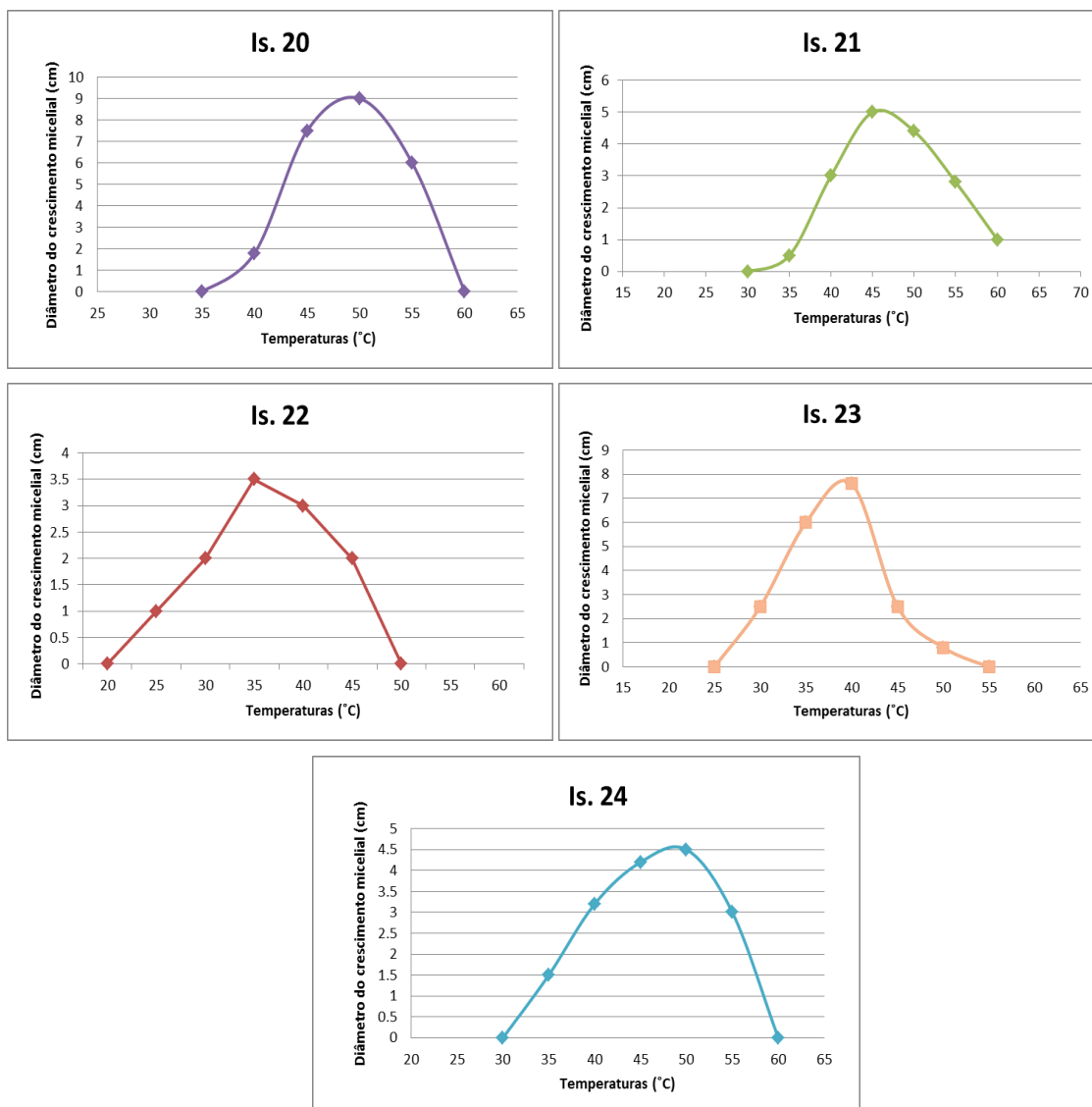


Figura 3 – Temperatura ótima de crescimento micelial dos isolados obtidos a 45°C, medida do diâmetro do alo da colônia em centímetros.

Os resultados obtidos confirmam a temofilia dos isolados 20, 21, 23 e 24, considerando o padrão de Madigan et al. (2004) que definem que microrganismos termófilos são aqueles que apresentam crescimento entre 40 e 60°C. Devido ao potencial para produção enzimática aliado a característica de termofilia, os isolados 20, 21 e 23 foram selecionados para a continuidade do trabalho.

3.2) AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE

O estabelecimento de relações entre o metabolismo dos microrganismos e os fatores físico-químicos que afetam a produção de enzima ajuda a desenvolver modelos

apropriados de biorreatores assim como outros bioprocessos para aplicação de enzimas na indústria (SINGHANIA et al., 2009). Os fatores avaliados foram o tipo de substrato sólido utilizado no processo de cultivo, temperatura, pH inicial do processo, teor de umidade e tempo de cultivo.

3.2.1) Seleção do Substrato

Nesta etapa do trabalho foi utilizado como substrato para o crescimento microbiano: sabugo de milho, bagaço de cana, palha de milho, casca de arroz, farelo de soja e farelo de trigo nas mesmas condições de cultivo para os 3 isolados, levando em conta sua temperatura ótima de crescimento.

O farelo de trigo foi o melhor substrato para a produção de β -glicosidase. Os isolados 20, 21 e 23, quando cultivados em farelo de trigo, produziram 4,48 U/mL, 4,92 U/mL, 9,95 U/mL, respectivamente. Os mesmos microrganismos, quando cultivados nos outros substratos testados, apresentaram uma produção de β -glicosidase inferior a 40% da obtida no cultivo em farelo de trigo, exceto o isolado 20 que produziu 4,31 U/mL, quando cultivado em sabugo de milho. Os microrganismos utilizados neste trabalho não produziram β -glicosidase nos cultivos realizados em bagaço de cana e casca de arroz (Tabela 2).

Tabela 2: Seleção de resíduo agroindustrial como substrato para a produção de β -glicosidase, o cultivo em estado sólido ocorreu por 96 horas nas respectivas temperaturas ótimas de crescimento de cada isolado com umidade de 70%.

Substrato	Is.20 (U/mL)	Is.21 (U/mL)	Is.23(U/mL)
Sabugo de milho	4,31	0,07	3,08
Bagaço de cana	0,13	0	0,03
Palha de milho	1,59	0,51	1,37
Casca de arroz	0	0	0,11
Farelo de soja	0,9	0,86	3,8
Farelo de trigo	4,48	4,92	9,95

Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que relatam a utilização de subprodutos agroindustriais para a produção de β -glicosidase por fungos termófilos. O farelo de trigo, palha de trigo e farelo de soja foram os melhores substratos para produção de β -glicosidase para o fungo *Thermoascus aurantiacus* a produção da enzima nesses substratos foi de aproximadamente 5,0 U/mL, assim como

neste trabalho, a produção da enzima nos outros substratos testados foi inferior ao da obtida com o farelo de trigo (KALOGERIS et al., 2003; LEITE et al., 2008). O farelo de trigo tem sido o subproduto mais usado por induzir uma ampla variedade de enzimas celulolíticas e apresentar custo relativamente baixo. Esse substrato complexo é rico em proteínas (14%), hidratos de carbono (27%), minerais (5%), gordura (6%) e vitamina B o que provavelmente favorece o crescimento e a produção de enzimas pelos microrganismos (PANDEY et al., 2000; DELABONA et al., 2012).

3.2.2) Umidade ideal

O teor de umidade do meio de cultivo foi variado de 50 a 90%, sendo que teores de umidades entre 60-75% foram os mais propícios para a produção de β -glicosidase. Dentre os microrganismos selecionados o isolado 21 foi o que apresentou melhor potencial para produção de β -glicosidase em baixa umidade; a maior produção da enzima foi constatada em 60% de umidade onde se obteve 6,29 U/mL. O isolado 23 foi o que apresentou melhor produção de β -glicosidase em 70% de umidade, pois obteve 9,25 U/mL da enzima. O isolado 20 teve produção ótima da enzima com 65% de umidade obtendo 4,16 U/mL de β -glicosidase (Figura 4).

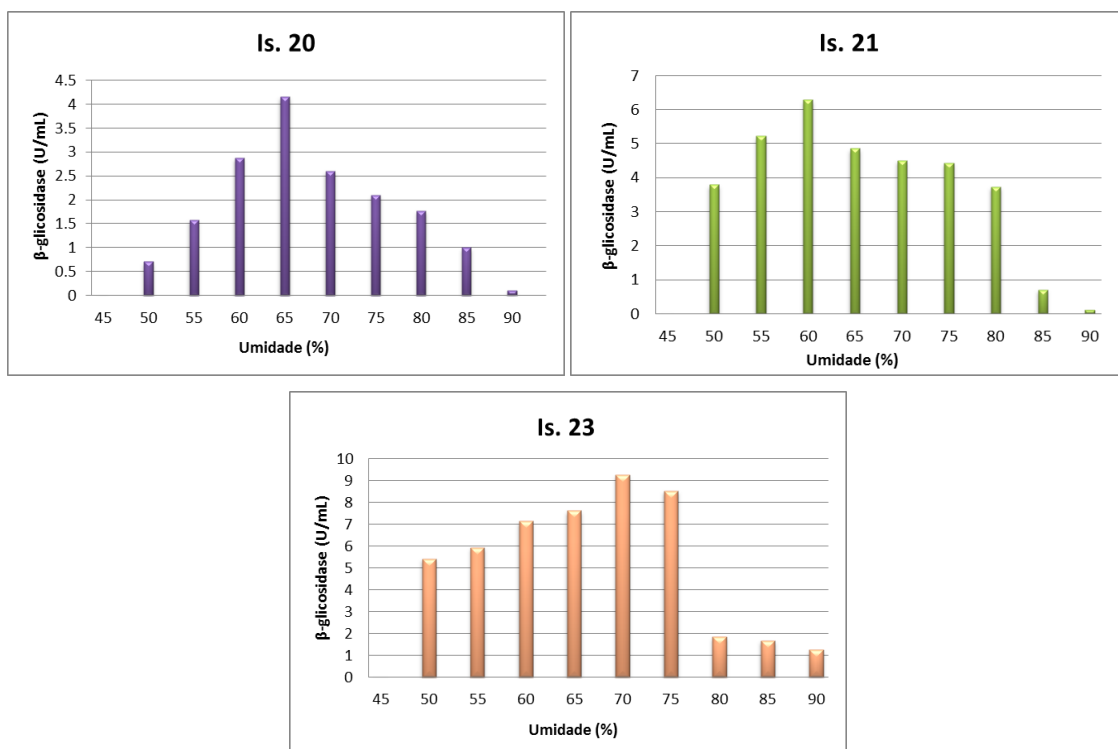


Figura 4: Produção de β -glicosidase em função da umidade em CES utilizando farelo de trigo como substrato, o cultivo ocorreu por 96 horas nas respectivas temperaturas ótimas de cada isolado.

Na ausência de água livre entre as partículas do meio o microrganismo consegue ter melhor aproveitamento do substrato por crescer de forma mais homogênea, em concentrações superiores a 80% ocorre a compactação do substrato dificultando a transferência de massas e conseqüentemente o crescimento do fungo (SINGHANIA et al., 2009).

Leite et al. (2008) obtiveram 5,8 U/mL de β -glicosidase pelo fungo *T. aurantiacus* cultivado em farelo de trigo com umidade de 60%; Kalogeris et al. (2003) apresentaram resultados semelhantes ao de Leite et al. (2008), com outra linhagem do mesmo microrganismo cultivado em palha de trigo como substrato com 80% de umidade. Delabona et al. (2013) mostraram que para as diferentes linhagens mesofílicas de *Aspergillus* 50% de umidade foi ideal para atingir a máxima produção de β -glicosidase.

O teor de umidade adequado no cultivo em estado sólido é variável e dependente da natureza do material, das necessidades do microrganismo e da expressão de metabólitos desejados (PANDEY et al., 2000), geralmente fungos precisam de menor umidade, sendo que 40-60% de umidade pode ser suficiente (SINGHANIA et al., 2009). O teor de umidade em processos de CES pode variar entre 30-85%, mimetizando as condições encontradas na natureza (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010). O baixo grau de umidade em CES é uma vantagem para aplicação industrial, pois diminui os problemas com contaminação, e gera pequenas quantidades de água residual (BON et al., 2008).

3.2.3) Determinação do pH inicial para a produção das enzimas

A variação do pH do meio de cultivo se deu pelo ajuste do pH da solução nutriente. O pH 5,0 foi ideal para os isolados 20 e 21 e para o isolado 23 foi o pH 4,0; sendo que a produção enzimática de β -glicosidase foi de 4,61 U/mL, 4,85 U/mL e 9,77 U/mL respectivamente (Figura 5). Esses resultados estão de acordo com os citados na literatura, principalmente quando comparados com estudos anteriores que utilizaram os fungos *T. aurantiacus* e *Aspergillus terreus*. Para esses microrganismos o pH inicial ideal para produção de β -glicosidase foi de 4,0 e 5,5, respectivamente (SHAHRIARINOUR et al., 2011).

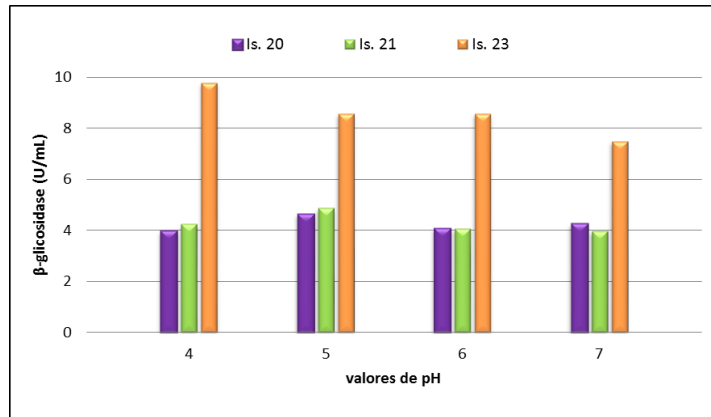


Figura 5: Efeito do pH na produção de β -glicosidase utilizando farelo de trigo para o CES por 96 horas nas temperaturas e umidades ótimas de cada microrganismo.

Geralmente o pH ótimo para produção de celulases por linhagens fúngicas varia entre 4,0 e 5,0 confirmando a preferência destes microrganismos por ambientes mais ácidos. Em valores de pH acima de 5,0 os fungos filamentosos não conseguem se desenvolver de forma adequada e conseqüentemente a produção de enzimas é reduzida. Os valores de pH para CES normalmente se refere ao inicial do processo de cultivo, visto que, o pH pode variar consideravelmente dependendo da fonte de nitrogênio e o tempo de cultivo (KALOGERIS et al., 2003).

3.2.4) Tempo de Cultivo

A produção enzimática foi avaliada a cada 24 horas, por um período de 168 horas de cultivo. A maior produção de β -glicosidase pelas linhagens selecionadas foi entre 72 a 120 horas, tempo este, considerado curto para produção enzimática (Figura 6).

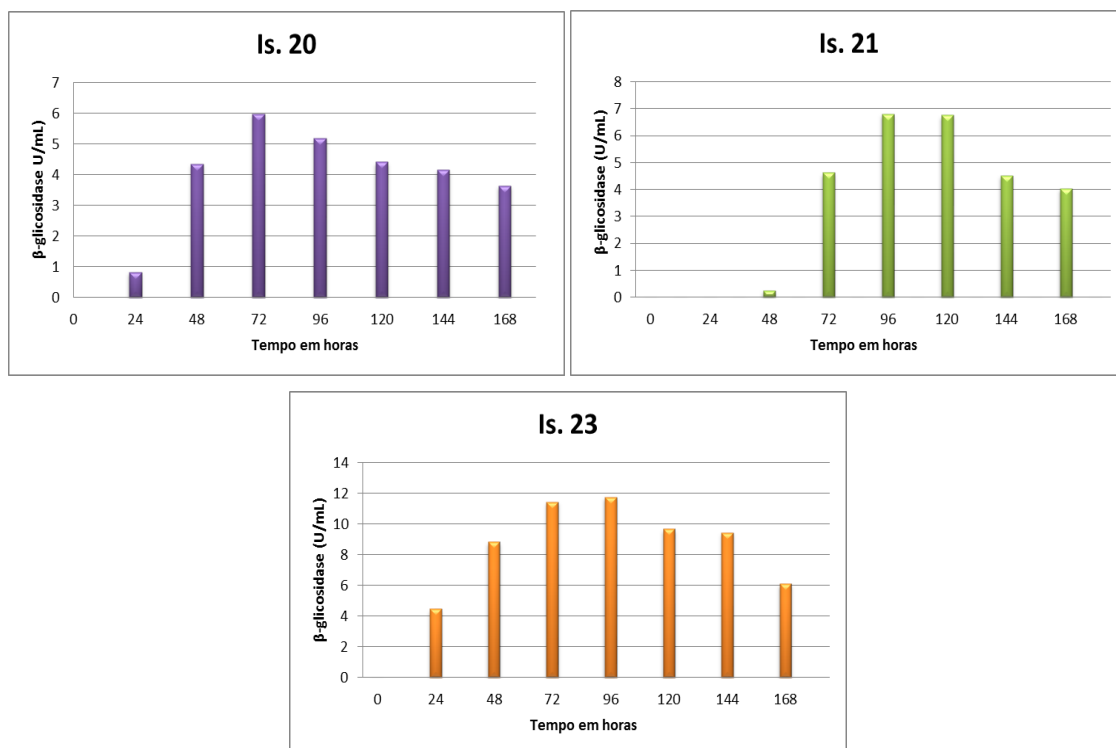


Figura 6: Tempo de cultivo para produção de β -glicosidases em farelo de trigo, com temperatura, umidade e pH ótimos para a produção da enzima.

Ao final da otimização do processo de cultivo foi obtido a maior produção de β -glicosidases para todas as linhagens selecionadas. O isolado 20 apresentou produção de máxima de 6,0 U/mL após 72 horas de cultivo. Dentre as linhagens selecionadas o isolado 23 foi o microrganismo que apresentou a maior produção de β -glicosidase, cerca de 11,7 U/mL após 96 horas de cultivo (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros de cultivo em estado sólido para produção de β -glicosidase à partir dos microrganismos selecionados.

Isolados	Substrato	Umidade	pH inicial	Tempo de cultivo	U/mL
Is. 20	Farelo de trigo	65%	5,0	72	6,0
Is. 21	Farelo de trigo	60%	5,0	96	6,81
Is. 23	Farelo de trigo	70%	4,0	96	11,75

Os resultados obtidos são bastante promissores quando comparados com trabalhos anteriores. No estudo realizado por Leite et al. (2008) os pesquisadores obtiveram a máxima produção da enzima (7,0 U/mL) em 72 horas utilizando o *T.*

aurantiacus. Delabona et al. (2012) obtiveram 10,5 U/mL de β -glicosidase cultivando o *Aspergillus fumigatus* por 96 horas, ambos utilizando o farelo de trigo como substrato. Gao et al. (2012) cultivaram o fungo uma linhagem de *Fusarium proliferatum* NBRC109045 em palha de milho associada a farelo de trigo por 240 horas e obtiveram 3,31 U/ml de β -glicosidase.

3.3) CARACTERIZAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES PRODUZIDAS PELAS LINHAGENS ISOLADAS.

3.3.1) Efeito de pH e temperatura sobre a atividade das enzimas

As β -glicosidases avaliadas apresentaram melhor atividade nos valores de pH 4,5 e 5,5 com ampla estabilidade estrutural ao pH, visto que a enzima do isolado 21 manteve-se estável após 24 horas de incubação em uma faixa de pH 3,5 a 10,0. Em comparação, a enzima do isolado 20 apresentou estabilidade de pH 4,5 – 8,0, mantendo 83% de sua atividade original após 24 horas de incubação em pH 8,0. A β -glicosidase do isolado 23 mostrou ser estável a faixa de pH 3,5 – 6,0 mantendo 89% de sua atividade original após 24 horas de incubação em pH 6.5 (Tabela 4).

Valores de pH ótimos próximos a 4,0 e 5,0 são comumente observados para β -glicosidases produzidas por fungos filamentosos. O pH ótimo da β -glicosidases produzida pelo fungo *T. aurantiacus* foi 4,5 e sua estabilidade foi mantida do pH 4,5 ao 8,0 (LEITE et al., 2008). O pH ótimo para as enzimas produzidas pelos fungos *Rhizomucor miehei* e *A. fumigatus* P40M2 foi 5,0 e 4,0, respectivamente, mantendo-se estáveis em uma faixa de pH de 4,0-6,0 e de 3,0-6,0 respectivamente (KRISCH et al., 2012; DELABONA et al., 2013). Os resultados demonstram que enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas apresentam estabilidade estrutural igual ou superior às descritas na literatura, o que confirma o potencial industrial das β -glicosidases produzidas.

Tabela 4: Características bioquímicas das β -glicosidases produzidas em condições otimizadas de cultivo.

Microrganismos	pH ótimo	Temperatura ótima	Estabilidade de pH	Estabilidade de temperatura
Is.20	4,5	75 °C	4,0 – 8,0	40 – 70 °C
Is.21	5,5	60 °C	4,0 – 10,5	40 – 55 °C
Is.23	4,5	70 °C	3,0 – 6,0	40 – 60 °C

Os valores de temperatura ótima das β -glicosidases produzidas pelos isolados 20 e 23 foram 75°C e 70°C, respectivamente. A β -glicosidase do isolado 20 se destaca devido à alta temperatura para atividade enzimática e maior termoestabilidade, sendo que, após 1 hora de incubação a 70°C a enzima manteve 88% da sua atividade original. A enzima do isolado 23 também apresentou elevada temperatura ótima, 70°C, no entanto sua estabilidade térmica foi menor do que a da enzima do isolado 20, mantendo-se estável após 1 hora a 60°C, cerca de 90% de sua atividade original foi recuperada. A β -glicosidase do isolado 21 apresenta atividade ótima a 60°C e a estabilidade foi de 40 a 55°C, a enzima manteve 77% de sua atividade original após 1 hora a 55°C, respectivamente (Tabela 4).

O isolado 20 possui estabilidade térmica semelhante a do fungo termófilo *T. aurantiacus* que tem atividade ótima a 75°C e mantém 85% de sua atividade original após 1 hora a 70 °C (LEITE et al., 2008). Outros trabalhos realizados com β -glicosidases microbianas, tanto mesófilas como com termófilas, relatam que essas enzimas apresentam atividade ótima entre 50 e 75°C e estabilidade térmica entre 50 e 80°C (LEITE et al., 2007; LEITE et al., 2008; KRISCH et al., 2012; DELABONA et al., 2013). A estabilidade térmica da enzima refere-se à resistência a desnaturação em função da temperatura. Enzimas termófilas apresentam atividade máxima em elevadas temperaturas, podendo variar entre 50 e 65°C. Elevadas temperaturas dos processos industriais favorecem a formação de produto em menor tempo, justificando a incessante busca por microrganismos termófilos e suas enzimas (DELABONA et al., 2012; DELABONA et al., 2013; GOMES et al., 2007).

3.3.2) Hidrólise de Celobiose

As atividades enzimáticas obtidas com substrato sintético (pNP β G) foram utilizadas como padrões para comparação com as obtidas utilizando celobiose como substrato.

Tabela 5: Atividade relativa das β -glicosidases de fungos termofílicos em substrato sintético (pNP β G) e substrato natural (Celobiose). As atividades relativas obtidas pela hidrólise da celobiose foram expressas em porcentagem da atividade enzimática obtida utilizando pNP β G como substratos.

Substratos	Atividade Relativa (%)		
	Is. 20	Is. 21	Is. 23
pNP β G 4mM	100	100	100
Celobiose 0.5%	68,5	32,6	95,1

As atividades relativas obtidas com a hidrólise da celobiose para as enzimas dos isolados 20 e 23 corresponderam a 68,5 e 95,1% das atividades utilizando pNP β G. A enzima produzida pelo isolado 21 apresentou potencial reduzido para a hidrólise da celobiose, por ter atividade inferior a 40% da obtida com pNP β G (Tabela 5). Esses dados nos mostram que as enzimas apresentam considerável potencial para a hidrólise da celobiose. As β -glicosidases de fungos termófilos são caracterizadas por uma baixa especificidade de substrato. Estudos anteriores com a β -glicosidases purificada mostraram que a enzima tem ampla especificidade em relação aos substratos, no entanto pNP β G e celobiose são os preferidos (ZANOELO et al., 2004). Na maioria dos casos as enzimas apresentam atividade catalítica muito maior com substrato artificial como o pNP β G do que com celobiose (SINGHANIA et al., 2012)

Os resultados obtidos indicam que as enzimas produzidas apresentam potencial para hidrolisar diferentes substratos glicosídeos, obviamente com diferentes afinidades. No entanto, a confirmação desta hipótese só será possível com a purificação destas proteínas. Segundo Bathia et al. (2002) a maioria das β -glicosidases microbianas apresentam baixa especificidade, isto é, hidrolisam diferentes substratos com diferentes afinidades.

3.3.3) Efeito de etanol

As β -glicosidases deste trabalho tiveram seu potencial catalítico avaliados na presença de etanol em diferentes temperaturas. Todas as enzimas foram inibidas em concentrações acima de 5% de etanol, quando incubadas em temperaturas superiores a 60°C. No entanto, em temperaturas inferiores foi possível observar considerável estabilidade enzimática em misturas reacionais contendo até 30% de etanol (Figura 7).

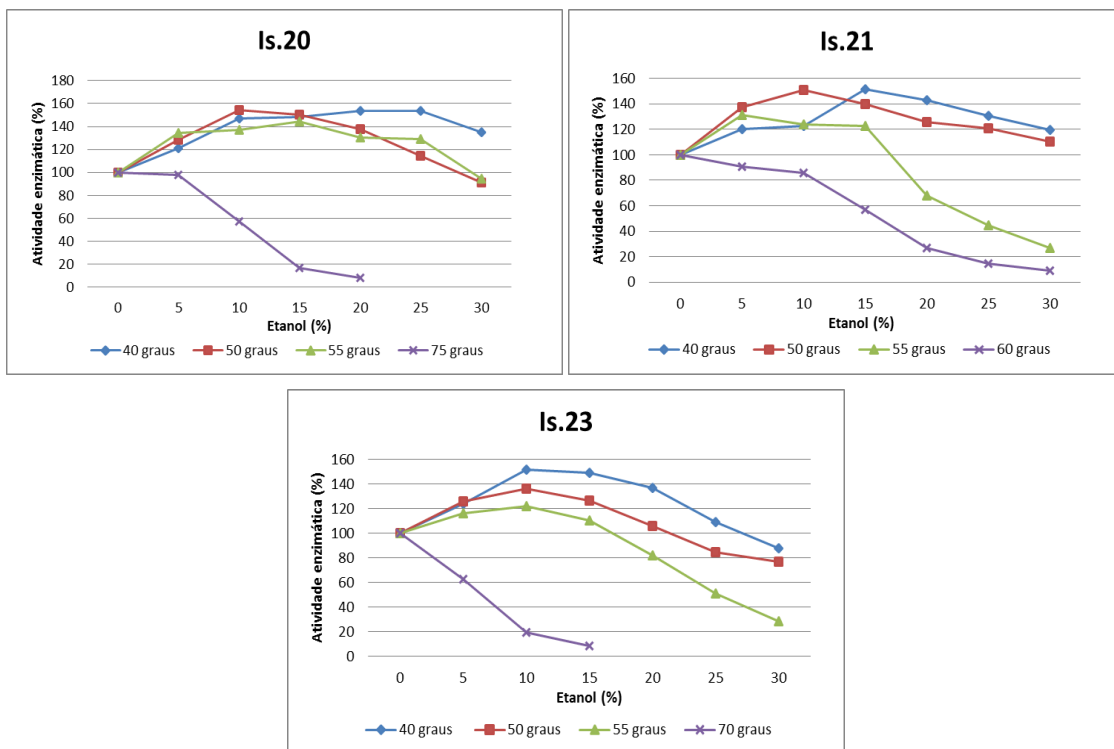


Figura 7: Efeito de etanol sobre a atividade das β -glicosidases em diferentes temperaturas (40, 50, 55°C e * Temperatura ótima de atividade das enzimas).

A estabilidade enzimática a solventes orgânicos está intimamente relacionada com a temperatura. Em temperaturas elevadas, as proteínas apresentam uma maior flexibilidade, permitindo a interação do etanol com resíduos internos hidrofóbicos da molécula. Essas interações causam alterações irreversíveis na estrutura protéica, resultando na perda da atividade enzimática (LUCARINI et al., 2005).

Todas as β -glicosidase produzidas apresentaram aumento na sua velocidade catalítica com adição de etanol na mistura de reação, principalmente quando incubadas em temperaturas inferiores.

A ativação da β -glicosidase por etanol é comum e já foi citada por outros autores. O aumento do potencial catalítico pelo etanol está associado com a atividade de transglicosilação ou glicosil transferase, onde o etanol pode agir como aceptor para o cátion glicosil intermediário, durante a hidrólise do substrato, isso explica o aumento das atividades das β -glicosidases (Figura 7). Na presença de álcoois a β -glicosidase pode catalisar a síntese de alquil-glicosídeos, usando diferentes doadores de açúcar tais como a celobiose e o pNP β G (PARRY et al., 2001; BHATIA et al., 2002; BARBAGALLO et al., 2004; LEITE et al., 2008; HARNPICARNCHAI et al., 2009; KRISCH et al., 2012).

A estabilidade ao etanol é uma característica enzimática bastante apreciável em processos de sacarificação e fermentação simultâneas, onde se associa ao processo de hidrólise enzimática microrganismos fermentadores, que converterão os açúcares fermentescíveis em etanol, reduzindo o efeito inibidor dos produtos de hidrólise sobre as enzimas. No entanto, para a viabilidade deste processo é imprescindível que as enzimas envolvidas apresentem tolerância à presença de etanol no meio reacional (LEITE et al., 2008; CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Considerando que em processos fermentativos tradicionais de produção alcoólica, onde a *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada como agente fermentador, concentrações superiores a 10% de etanol são extremamente nocivas para o próprio microrganismo fermentador (GU et al., 2001), é possível afirmar que as β -glicosidases produzidas pelos microrganismos selecionados apresentam estabilidade suficiente para serem aplicadas em processos de sacarificação e fermentação simultânea.

3.3.4) Efeito de glicose

A glicose é um forte inibidor da β -glicosidase, seu efeito sobre a ação das enzimas foi estudado a partir da cinética da atividade residual em função da concentração da glicose de 0 a 100 mM. As enzimas avaliadas apresentaram um perfil de inibição muito semelhante, sendo que todas tiveram sua atividade reduzida em aproximadamente 50% com 30 mM de glicose no meio reacional (Figura 8).

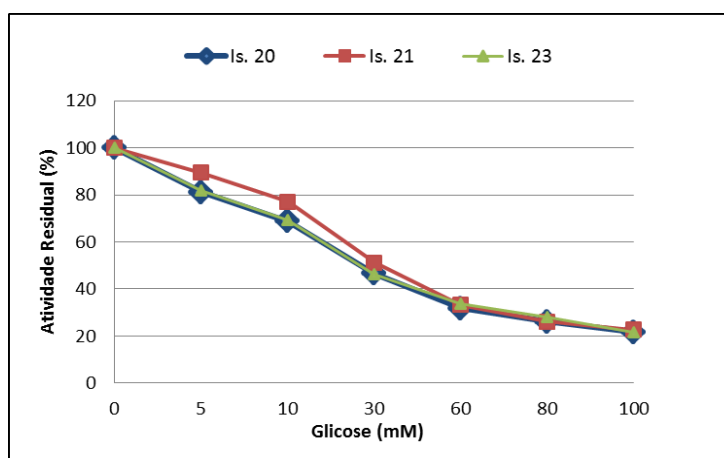


Figura 8: Efeito de glicose sobre a atividade das β -glicosidases.

Em concentrações de 100 mM de glicose restaram cerca de 20% da atividade original das enzimas dos isolados 20, 21 e 23 (Figura 8). Quando a concentração do substrato foi igualada a concentração da glicose, a inibição das β -glicosidase foi completamente revertida, exceto a do isolado 20 (Tabela 6).

A inibição das β -glicosidases por glicose pode ser competitiva ou não competitiva. A inibição competitiva é revertida pelo aumento da concentração do substrato, o mesmo não acontece na inibição não competitiva. Isso ocorre porque na inibição competitiva o inibidor e o substrato competem pelo sítio ativo da enzima, e na inibição não competitiva o inibidor se liga em outra parte na enzima diminuindo a taxa de formação do produto (LEITE et al., 2008). Portanto, os resultados indicam que a inibição provocada por glicose nas β -glicosidases dos isolados 21 e 23 é competitiva, e a inibição do isolado 20 é não competitiva (Tabela 6).

Tabela 6: Tipo de inibição da glicose sobre a atividade enzimática das linhagens selecionadas.

Enzimas	At. Residual (%)	At. Residual (%)	At. Residual (%)	Tipo de Inibição
	pNP β G 4 mM	pNP β G 4 mM Glicose 30 mM	pNP β G 30 mM Glicose 30 mM	
Is. 20	100	46.5	55.3	Não-Competitiva
Is. 21	100	51.1	96.3	Competitiva
Is. 23	100	46.3	97.1	Competitiva

Um dos principais obstáculos na utilização das β -glicosidases em processos industriais é a forte inibição da enzima por glicose. A elevada concentração de glicose pode bloquear o a entrada do substrato no sítio ativo da enzima, ou impedir o substrato hidrolisado de sair (SINGHANIA et al., 2012). Neste sentido, muitos trabalhos prospectam β -glicosidases que não sejam inibidas pelo produto da reação, pois poderiam auxiliar no processo de sacarificação enzimática do material celulósico (ZANOELO et al., 2004).

Por outro lado, a reversibilidade da inibição por glicose apresentada pelas enzimas dos isolados 21 e 23 associada a elevada estabilidade ao etanol, confirmam que estas β -glicosidases são promissoras para a aplicação em processos de sacarificação e fermentação simultâneos (LEITE et al., 2008). No entanto, novos ensaios são necessários para confirmação desta hipótese.

4) CONCLUSÕES

As linhagens selecionadas apresentaram-se viáveis para a produção de β -glicosidase por cultivo em estado sólido. As condições de cultivo ideais para a produção de β -glicosidase foram: farelo de trigo como substrato, umidade entre 60 e 75% e pH entre 4,0 e 5,0. Estas condições confirmam que fungos filamentosos preferem ambientes mais ácidos e são adaptados a crescerem na ausência de água livre, utilizando substratos sólidos para a fixação e nutrição de sua estrutura micelial.

As análises do efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das β -glicosidases, mostraram características diferentes para as enzimas avaliadas, no entanto, todas apresentaram estabilidade estrutural, o que é esperado para enzimas produzidas por linhagens termófilas.

Dentre os microrganismos avaliados no presente trabalho destaca-se o isolado 23, devido sua elevada produção enzimática em reduzido período de tempo. A β -glicosidase produzida por esta linhagem apresentou expressivo potencial para hidrolisar celobiose, elevada estabilidade a presença de etanol na mistura de reação e sua inibição por glicose foi completamente revertida com o aumento da concentração de substrato, características bastante apreciáveis para a aplicação em processos de sacarificação da celulose.

5) REFERÊNCIAS

- ÂNGELO, R.S. Enzimas Hidrolíticas. *In*: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educus, c. 8, p 263-285, 2010.
- BARBAGALLO, R.N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeast employable for enological applications. **Enzyme and Microbial technology**, v. 35, p. 58-66, 2004.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- BON, E.P.S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSCHALK, L.M F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J.C.; FERRARA, M.A. Bioprocessos para produção de enzimas. *In*: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. ; CORCO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Cap. 5. Interciência, Rio de Janeiro – RJ, 2008.
- CARDONA C.A.; SÁNCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.
- CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- COURI, S.; TERZI, S. da C.; SAAVEDRA PINTO, G.A.; FREITAS, S.P.; COSTA, A.C.A. da. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v.36, p.255-261, 2000.
- DELABONA, P.D.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.
- DELABONA, P.D.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236-242, 2013.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: Educus, 2010.

GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia de fungos: crescimento, morfologia e diferenciação *In*: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Educs, c. 3, p 91-122, 2010.

GAO, Z.; HOP, D.V.; YEN, L.T.H.; ANDO, K.; HIYAMUTA, S.; KONDO, R. The production of β -glucosidases by *Fusarium proliferatum* NBRC109045 isolated from Vietnamese forest. *AMB Express*, v. 2, n.49, p. 1-13, 2012.

GOMES, E.; GUEZ, M.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GUIMARAES, L.H.S.; PEIXOTO, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIN, V.C.; ZANOELO, F.F.; JUNIO, A.B.; POLIZELLI, M. L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

GU Y.; QIAO M.; ZHOU Q.; ZHOU Z.; CHEN G. Hyperproduction of Alcohol Using Yeast Fermentation in Highly Concentrated Molasses Medium. **Tsinghua Science and Technology**, v. 6, p. 225-230, 2001

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 2, p. 61-69, 2009.

KALOGERIS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KATAPODES, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MADRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1099-1104, 2003.

KRISCH, J.; BENCSIK, O.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C.; TAKÓ, M. Characterization of a β -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete *Rhizomucor miehei*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 555-560, 2012.

MADIGAN, M. J.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

LEITE, R. S. R.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1101-1106, 2007.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

LUCARINI, A.C.; KILIKIAN, B.V.; PESSOA, A. Precipitação *In*: **Purificação de produtos biotecnológicos**, Barueri, Manole, cap. 5, p. 89-113, 2005.

- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 64, n.3, p. 461–488, 2000.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Biomass Enzymatic Hydrolysis. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, V.M. de; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Revista MultiCiencia: Construindo a História dos Recursos Naturais**, n.7, 2006.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.
- PARRY, N.J.; BEEVER, D.E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biochemical Journal**, v. 353, n. 1, p. 117-127, 2001.
- PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; TAKETANI, R.G. Bioprospecção da diversidade microbiana cultivável e não cultivável. In: Itamar Soares de Melo; João Lúcio Azevedo. (Org.). **Microbiologia Ambiental** - 2 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 1, p. 83-106, 2008.
- SHAHRIARINOUR, M.; WAHAB, M.N.A.; MOHAMAD, R.; MUSTAFA, S.; ARIFF, A.B. Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 38, p. 7459-746, 2011.
- SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.
- SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SUKUMARAN, R.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, *article in press*, 2012.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring, p. 5-22. In: ROUSSOUS, S. et al. (Eds.) **Advances in solid-state fermentation**. Dordrecht: kluwer Academic Publishers, 1997.
- ZANOELO, F.F.; POLIZELLI, M.L.T.M.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 137-143, 2004.