

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

IARA MARIA DE OLIVEIRA SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE PRODUZIDA POR CULTIVO EM
ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus*

DOURADOS - MS

2019

IARA MARIA DE OLIVEIRA SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE PRODUZIDA POR CULTIVO EM
ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus*

Trabalho de Conclusão de Curso Submetido ao curso de Biotecnologia Bacharelado, na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), na Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

DOURADOS – MS

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237c Santos, Iara Maria Oliveira
CARACTERIZAÇÃO DE B-GLICOSIDASE PRODUZIDA POR CULTIVO EM ESTADO
SÓLIDO DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus* [recurso eletrônico] / Iara Maria Oliveira
Santos. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Celulases. I. Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

IARA MARIA OLIVEIRA SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE PRODUZIDA POR CULTIVO EM
ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Banca Examinadora da Universidade Federal da
Grande Dourados como exigência parcial para a
conclusão do ensino superior e obtenção do grau
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite – Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz – Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca – Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, MS 22 de novembro de 2019

À Deus, aos meus pais, à minha avó, meu namorado e aos meus amigos que me ajudaram, incentivaram e estiveram presentes sempre até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado e protegido por todo esse trajeto, pois sem Ele não seria possível.

A minha mãe Janice, pois, sem ela para me apoiar e estar presente em semanas de provas eu teria desistido faz tempo. Agradeço por ter segurado minha mão e sempre dizer que tudo iria dar certo.

Ao meu pai, Cícero, que nunca deixou faltar nada, mesmo com toda dificuldade sempre me ofereceu o melhor, sempre se preocupou e bastava uma ligação minha que ele já queria estar por perto para me ajudar.

Ao meu irmão, Higor, por ter me acolhido em sua casa, me ajudou e apoiou em todos os momentos.

À minha avó, Eunice, que mesmo distante e com todos os problemas sempre me ligava, apoiava e ajudava no que fosse preciso.

Ao meu namorado, Junior, que nunca deixou eu desistir da faculdade e sempre estava do meu lado para me abraçar e dizer que tudo iria melhorar. Você foi fundamental para que todo esse sonho se tornasse realidade.

A todos professores do curso de biotecnologia, em especial professora Dr. Alexeia, que nos meus momentos de desespero sempre tinha uma palavra amiga para me acalmar, ao professor Dr. Marcelo que sempre entendia os motivos das minhas faltas e estava disposto a conversar.

Ao laboratório de pesquisa em ciências da saúde, que me acolheu de início, em especial a Carol, Gleyce, Júlio, Michele, Leticia, Márcia e Tiago.

Às minhas amigas Andressa e Maria Carolina, por estarem sempre dispostas a me ajudarem nas matérias mais difíceis, por estarem ao meu lado, por compartilharem momentos bons e ruins, por todos os trabalhos juntas e por todo amor construído ao longo desses anos. Vocês foram fundamentais.

À Geisa, que mesmo eu chegando de paraquedas, me ajudou, ensinou e sempre se preocupou com minha saúde. Obrigada por tantos ensinamentos e por cada palavra de aconchego.

Ao meu orientador professor Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, por toda a paciência, ensinamentos e dedicação. Agradeço por ter sido muito mais que um orientador, e sim um amigo que sempre me incentivou e mostrou que a faculdade é importante, mas não mais que nossa vida e saúde mental.

À todos, meu muito obrigada.

RESUMO

As enzimas atuam como biocatalisadores agindo de forma com que as velocidades de alguns processos sejam aumentadas. Estes biocatalisadores são utilizados em diversos processos industriais, sendo possível destacar a produção de alimentos, fármacos, bebidas, biocombustíveis, papel e celulose. As celulasas ocupam cerca de 20% do mercado de enzimas e sua eficiência na hidrólise do material celulósico é o resultado de ações sinérgicas de um sistema enzimático composto por três enzimas o que eleva o custo do processo. A utilização do cultivo em estado sólido (CES) possibilita reduzir os custos desses biocatalisadores devido à utilização de resíduos agroindustriais como substrato. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a enzima β -glicosidase produzida por cultivo em estado sólido do fungo *Pycnoporus sanguineus* em farelo de trigo. A β -glicosidase apresentou atividade ótima em pH 4,0 e a temperatura de 70°C. A enzima se manteve estável em uma faixa de pH de 3,0 a 7,0 e manteve sua atividade (cerca de 93,88% de atividade residual) após 1h a 50°C. As características descritas para a enzima são dificilmente encontradas para biocatalisadores produzidos por fungos mesófilos, elevada estabilidade ao pH e temperatura, o que habilita sua utilização em condições industriais.

Palavras-chave: Celulasas; bioprocesso em estado sólido; enzimas industriais.

ABSTRACT

Enzymes act as biocatalysts by increasing the speeds of some processes. These biocatalysts are used in various industrial processes, and it is possible to highlight the production of food, drugs, beverages, biofuels, paper and cellulose. Cellulases occupy about 20% of the enzyme market, and their efficiency in the hydrolysis of cellulosic material is the result of synergistic actions of an enzyme system composed of three enzymes which increases the cost of the process. The use of solid state cultivation (CES) makes it possible to reduce the costs of these biocatalysts due to the use of agroindustrial residues as substrate. The present work aimed to characterize the enzyme β -glycosidase produced by solid state cultivation of the fungus *Pycnoporus sanguineus* in wheat bran. The β -glycosidase showed optimal activity at pH 4.0 and 70°C. The enzyme remained stable at a pH range of 3.0 to 7.0 and maintained its activity (about 93,88% residual activity) after 1h at 50°C. The characteristics described for the enzyme are difficult to find for biocatalysts produced by mesophilic fungi, high stability at pH and temperature, which enables its use in industrial conditions.

Keywords: Cellulases; solid state bioprocess; industrial enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito de pH sobre a atividade da β -glicosidase produzida pelo fungo <i>Pycnopus sanguineus</i> por CES em farelo de trigo.	21
Figura 2. Efeito de temperatura sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida pelo fungo <i>Pycnopus sanguineus</i> por CES em farelo de trigo.....	22
Figura 3. Efeito de pH de estabilidade sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida pelo fungo <i>Pycnopus sanguineus</i> por CES em farelo de trigo.....	23
Figura 4. Efeito da termoestabilidade sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida pelo fungo <i>Pycnopus sanguineus</i> por CES em farelo de trigo.....	24

TABELA

Tabela 1. Alguns microrganismos produtores de enzimas utilizando-se resíduos agroindustriais. Adaptado de EMBRAPA (2005).....	17
---	----

ABREVIATÖES

NM – *Nanômetro*

CES – *Cultivo em estado sólido*

pH – *Potencial hidrogeniônico*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO LITERÁRIA	14
2.1 CELULASES.....	14
2.2 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE ENZIMAS MICROBIANAS	15
2.3 PROBLEMAS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS	16
3. OBJETIVO	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	18
4. METODOLOGIA	18
4.1 MICRORGANISMO	18
4.2 INÓCULO.....	18
4.3 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO.....	19
4.4 EXTRAÇÃO DA ENZIMA.....	19
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA β -GLICOSIDASE.....	19
4.6 EFEITOS DE pH E TEMPERATURA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÕES	23
7. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram a velocidade de reações químicas específicas. A eficiência da catálise enzimática depende especificamente da estrutura complexa da proteína enzimática. Por acelerar processos, existe uma ampla aplicabilidade em diferentes setores industriais, sendo possível destacar as indústrias alimentícias, bebidas, têxtil, papelaria e farmacêutica. Segundo Lemos et al. (2006), 85% das enzimas produzidas são para o uso industrial e outros 15% para fins analíticos e médicos. Apesar da utilização das enzimas provenientes de microrganismos em ampla escala, ainda existe uma grande diversidade de enzimas que podem ser descobertas, criando então novas tecnologias de alta eficiência industrial (OLIVEIRA et al., 2017).

Diante deste fato, a busca por microrganismos capazes de produzir enzimas, como as celulasas e hemicelulasas avançou muito nos últimos anos, pois a extração de enzimas de tecido animal e vegetal apresentam algumas dificuldades, sendo algumas delas o custo elevado e a dificuldade operacional (RODRIGUES et al., 2007)

As celulasas ocupam cerca de 20% do mercado mundial de enzimas e sua eficiência na hidrólise do material celulósico é o resultado da ação sinérgica de um sistema enzimático composto por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase (TIWARI et al., 2017; GARCIA et al., 2018; FLORENCIO et al., 2011). A utilização de enzimas microbianas, apresenta vantagens pois as mesmas possuem alta diversidade, custo reduzido, não sofrem influência de fatores climáticos, possuem especificidade, não são tóxicas e possuem um menor tempo de produção. O uso da catálise enzimática ao invés de catálise química também gera benefícios pois a catálise química pode inibir bioprocessos realizados posteriormente à hidrólise, devidos a formação de subprodutos indesejáveis, resultado da falta de especificidade dos catalisadores químicos (RABELO et al., 2010; DUBEY et al., 2019).

Entretanto, um dos desafios industriais para se trabalhar com enzimas são encontrar biomoléculas capazes de suportar variações de temperaturas e pH sem perder sua estrutura proteica e conseqüentemente sua atividade catalítica. Além disso, o alto custo de produção desses biocatalisadores também é um outro problema (GARCIA et al., 2018).

O custo da produção enzimática pode ser reduzido com a utilização de resíduos agroindustriais como substrato em cultivos em estado sólido (CES). Além de reduzir os custos, uma outra vantagem é a diminuição desses compostos na natureza, visto que o Brasil é um país de grande produção agrícola (SADH et al., 2018; GONÇALVES et al., 2013; STROPARO et al., 2012).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi a caracterização da enzima β -glicosidase, produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* por cultivo em estado sólido utilizando-se farelo de trigo como substrato.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Celulases

As celulases são enzimas que hidrolisam materiais lignocelulosicos, onde atuam sinergicamente três enzimas, sendo elas: endo-glucanases (EC 3.2.1.4), exo-glucanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (GARCIA et al., 2015; CERDA et al., 2017). Cada enzima possui especificidade, ou seja, atua em diferentes locais da molécula de celulose para que a mesma seja hidrolisada. A endo-glucanase atua internamente hidrolisando cadeias de celulose, resultando em uma diminuição do seu grau de polimerização, a exo-glucanase atua nas extremidades da cadeia de celulose e libera a celobiose como produto principal e as β -glicosidases atuam especificamente em oligossacarídeos e celobiose, liberando glicose (KUHAD et al., 2011; GARCIA et al., 2015; SANTOS et al., 2016). As celulases possuem uma ampla utilização industrial como biopolimento em indústria têxtil, liberação de açúcares fermentáveis para a produção de etanol de álcool, indústria do vinho, extração e processamento de sucos de frutas e vegetais. As celulases são as terceiras enzimas mais utilizadas mundialmente (BEHERA et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2018; MORAIS et al., 2018).

A parede celular vegetal é constituída de três polímeros principais, celulose, lignina e hemicelulose, esse conjunto denomina-se lignocelulose. A celulose é um homopolissacarídeo linear composto de unidades de glicose unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas, e é utilizado principalmente como matéria prima na indústria de papel (COSTA et al., 2019; LIMA et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Existem diversos microrganismos na natureza que são capazes de degradar os materiais lignocelulósicos, através da produção das enzimas celulolíticas e os que ganham destaques são os fungos filamentosos, por produzirem em grandes quantidades. Embora haja algumas enzimas produzidas ainda por animais e vegetais, a maioria das enzimas utilizadas em processos industriais são provenientes de microrganismos, por uma maior facilidade operacional e menor custo (SILVA et al., 2018; LIU et al., 2018).

2.2 Aplicações industriais de enzimas microbianas

As enzimas possuem aplicações em vários processos industriais, seja nas indústrias alimentícias, farmacêutica, bebidas, papel e celulose, biocombustíveis entre outras finalidades. A utilização de enzimas apresenta vantagens comparada ao emprego de catalisadores químico, pois não são consumidas durante a formação de produto, são altamente seletivas, são naturais, não provocam reações secundárias indesejáveis e sua ação pode ser controlada ajustando a temperatura, pH e concentração enzimática. Sendo assim, é muito vantajoso utilizar enzimas, pois elas reduzem o impacto ambiental e não causam riscos quando em contato com ser humano (MILETIC et al., 2012).

Na indústria alimentícia, as enzimas são amplamente utilizadas na produção de sucos, cervejas, processamento de carnes, fabricação de vinhos entre outros. Uma das enzimas mais utilizadas são as proteases, utilizadas para produzir queijos. Há muito tempo, para a fabricação de coalhos, utilizavam-se a renina, enzima extraída do quarto estômago de ruminantes. Devido à dificuldade na extração e a dependência de um animal ser gerado durante de 280 a 290 dias para a fabricação enzimática, novas alternativas foram estudadas e entre elas a produção de proteases de origem microbiana. Um dos fungos mais utilizados para a produção de proteases visando a obtenção de queijo é a espécie de *Rhizomucor miehei* (GARCIA et al., 2011; FERNANDES et al., 2017).

Outra aplicação industrial de enzimas microbianas consiste na fabricação de xaropes de glicose que são utilizados como ingredientes edulcorantes em diferentes alimentos. A produção de xarope de glicose pode ser obtida pela hidrólise enzimática do amido. Um dos fungos capazes de realizar esta hidrólise por meio da enzima amilase é o *Aspergillus foetidus* (GRIEBELER et al., 2015; FERNANDES et al., 2017).

As lipases são utilizadas nas indústrias de detergentes, biodiesel, panificação, laticínios, óleos e gorduras, tratamento de águas e efluentes, cosméticos e perfumaria, couro e outros.

As xilanases são utilizadas na indústria de papel e celulose, o seu uso faz com que os produtos químicos sejam diminuídos no branqueamento da polpa de celulose para obtenção de papel branco. Como é possível observar, vale ressaltar que algumas enzimas possuem mais de uma aplicação, podendo uma única atuar em diferentes setores industriais (ATALAH et al., 2019; KAUSHAL et al., 2018).

A β -glicosidase (EC 3.2.1.21) é uma enzima celulolítica que atua juntamente com a endoglucanase (EC 3.2.1.4) e exoglucanase (EC 3.2.1.74), para que ocorra a hidrólise da celulose para a fabricação de etanol de segunda geração a partir da celulose (AGRAWAL et al., 2016).

A β -glicosidase pode ser utilizada para a liberação de compostos aromáticos em frutas e produtos de fermentação, enriquecimento de sabores, melhoria das propriedades sensoriais de sucos cítricos. Essa enzima está entre as mais utilizadas para produção de suco e bebidas (ANDRADES et al., 2019).

Um outro papel importante para as β -glicosidases é a sua capacidade de desglicolisar as isoflavonas que também são chamadas de fitoestrogênio. Esse flavonóide possui um papel importante na fase de menopausa das mulheres e são encontrados na soja e seus derivados. As β -glicosidases convertem as isoflavonas em agliconas antes da absorção intestinal. Esse processo faz com que a absorção seja mais eficiente no organismo (OH MIN et al., 2018; MORAIS et al., 2018; COTA et al., 2004).

Muitos microrganismos são capazes de produzir as β -glicosidases. Os mais destacados são os fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium decumbens*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Paecilomyces sp.* (SINGHANIA et al., 2012).

2.3 Problemas na produção de enzimas

As enzimas microbianas, como mencionado anteriormente, possuem uma ampla utilização industrial, porém os custos de produção das mesmas são muito elevados. Isso muitas vezes inviabiliza a aplicação desses biocatalisadores em determinados processos. Alguns tipos de cultivos microbianos, como é o caso do

cultivo submerso (CS), possuem custo elevado de aeração e agitação especialmente no uso de meios com alta viscosidade, menor produtividade enzimática e utiliza grande quantidade de água (PELIZER et al., 2015).

Pensando em reduzir o custo de produção e também os impactos ambientais, muitos estudos têm sido realizados sobre o Cultivo em Estado Sólido (CES) utilizando resíduos agroindustriais como substratos. Esses resíduos são provenientes de processamento industrial podendo destacar farelo de trigo, farelo de soja, casca arroz, bagaço de cana-de-açúcar e outros. Na Tabela 1, pode-se observar a utilização de alguns deles para a produção de enzimas microbianas. Esses resíduos geralmente são descartados após a extração do produto de interesse, como por exemplo a fabricação de etanol, açúcar e energia que são provenientes da cana-de-açúcar. Como o agronegócio é um setor que cresce constantemente no mundo todo, concomitantemente a geração de resíduos também cresce (GARCIA et al., 2018).

Tabela 1. Alguns microrganismos produtores de enzimas utilizando-se resíduos agroindustriais como substrato.

Enzimas	Microrganismos	Substratos
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus tamari</i>	Farelo de trigo/sabugo de milho/bagaço de cana
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo/resíduo de chá
Proteases	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
Lipases	<i>Pinicillium restrictum</i>	Torta de babaçu

Fonte: Comunicado técnico online, Embrapa, 2005. Adaptado pelo autor.

Sendo assim, o CES pode ser definido como cultivo de microrganismos em uma matriz sólida, chamado de substrato, sem a presença de água livre entre as partículas, somente com a umidade necessária para que o microrganismo cresça. Esse substrato necessita atender as necessidades exigidas pelo microrganismo para que haja crescimento microbiano. Os microrganismos que mais se adaptam a essa técnica são os fungos filamentosos, devido à similaridade com seu *habitat* natural, porém outros podem ser utilizados (PANDEY et al., 2003). Outros fatores importantes

para se avaliar são pH, umidade, temperatura, tamanho das partículas e concentração do inoculo (LIMA et al., 2019).

Dessa forma, o CES em resíduos agroindustriais possui vantagens de redução dos custos do processo de produção enzimática, facilidade de acesso aos substratos, menor risco de contaminações, menor quantidade de água e também menor quantidade de resíduos descartados no meio ambiente, diminuindo assim a poluição ambiental. Além disso, possui vantagens como redução da necessidade de energia, alta produtividade e efeitos não inibitórios para produção enzimática (CERDA et al., 2017; LIMA et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a enzima β -glicosidade produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* por cultivo em estado sólido em farelo de trigo.

3.2 Objetivo específico

- Avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática da β -glicosidade;
- Avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da β -glicosidade;
- Avaliar a estabilidade estrutural da enzima em função do pH;
- Avaliar a estabilidade estrutural da enzima em função da temperatura.

4. METODOLOGIA

4.1 Microrganismo

O fungo filamentoso basídio *Pycnoporus sanguineus*, também conhecido popularmente como orelha de pau, foi isolado do cerrado localizado no Centro-Oeste Brasileiro na Região de Dourados, MS, Brasil. O microrganismo foi mantido em meio de ágar Dextrose Sabouraud, após seu crescimento até a completa colonização do meio, a cepa foi armazenada a 4°C.

4.2 Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, inclinados, contendo 40 mL de ágar Dextrose Sabouraud e mantidos a 28°C. A suspensão fúngica foi obtida pela adição de 25 mL de solução nutriente e suave raspagem da superfície do meio de cultura. A solução nutriente foi composta por 0,1% de sulfato de amônio; 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônio (MERHEB-DINI et al., 2009). Como inóculo, 5 mL dessa suspensão foram transferidos para cada frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo farelo de trigo como substrato.

4.3 Cultivo em Estado Sólido

A enzima foi produzida pelo cultivo do fungo em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5g de substrato (farelo de trigo) lavado e seco a 60°C por 24h. A umidade inicial foi ajustada para 70% e o cultivo transcorreu por 96h a 25°C. Todo o material foi previamente autoclavado por 20 min a 121°C.

4.4 Extração da enzima

A extração da enzima do substrato miceliado foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada e agitação constante a 100 rpm por 1h. A amostra foi filtrada em tecido de nylon e centrifugada em 3000x g por 5 min. O sobrenadante foi considerado o extrato enzimático e foi utilizado nas etapas seguintes.

4.5 Determinação da atividade da β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi determinada com 50 μ L de extrato enzimático, 250 μ L de tampão de acetato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e 250 μ L de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (4 mM, pNPG, Sigma) durante 10 min de reação a 50°C. A reação enzimática foi interrompida com 2 mL de carbonato de sódio (2 M). O produto liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação.

4.6 Efeito de pH e temperatura na atividade enzimática

O pH ótimo foi determinado medindo a atividade enzimática a 50°C dentro do intervalo de pH 3.0–8.0, com incrementos de 0,5, utilizando solução tampão de McIlvaine 0,1 M (McIlvaine, 1921). A temperatura ótima foi obtida pela determinação

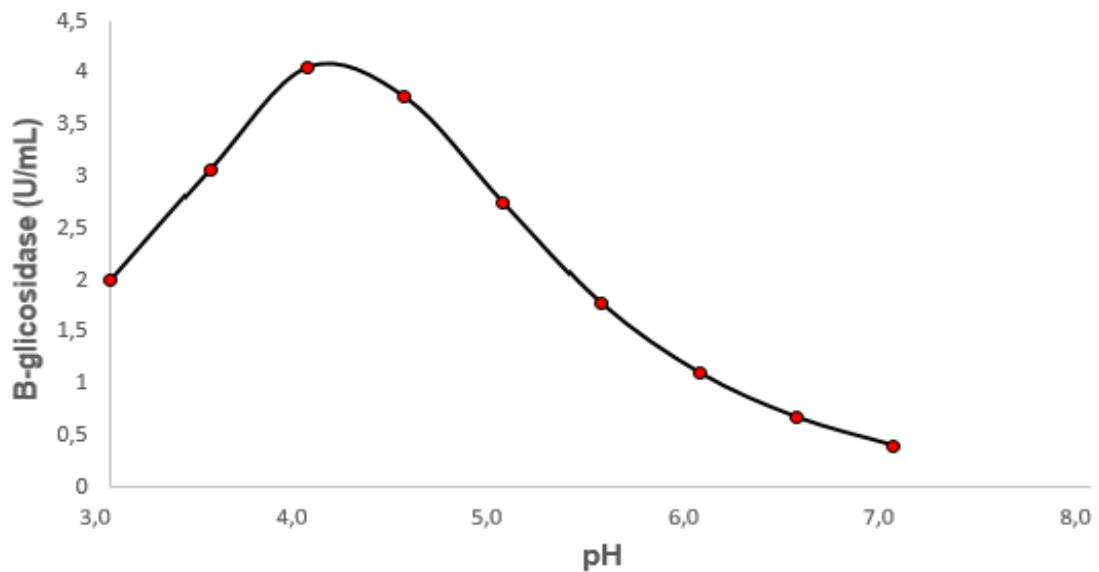
da atividade enzimática na faixa de 30-85°C, com incrementos de 5°C, no pH ótimo da enzima. A estabilidade do pH foi determinada incubando a enzima durante 24h a 25°C em diversos valores de pH, utilizando as seguintes soluções tampão: 0,1 M McIlvaine (pH 3,0-8,0), 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0-8,5) e 0,1 M de glicina-NaOH (pH 8,5-10,5), com incrementos de 0,5. A termoestabilidade foi determinada incubando a enzima durante 1h em temperaturas entre 30 e 70°C, com incrementos de 5°C. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A β -glicosidase produzida pelo fungo *P. sanguineus* apresentou maior atividade catalítica em pH 4,0. Quando o pH 5,0 foi atingido, observa-se que a atividade enzimática começa a diminuir progressivamente (**Figura 1**). Trabalhos anteriores, relataram a atividade ótima de β -glicosidase produzida por *Lichtheimia ramosa* em pH 5,5 (GARCIA et al., 2018; GARCIA et al., 2015). Um outro estudo realizado por Santos et al. (2016) mostrou a atividade ótima de β -glicosidase produzida por *Gongronella butleri* em pH 4,5. Baffi et al. (2011) demonstrou a atividade ótima β -glicosidase produzida por *Sporidiobolus pararoseus* em pH 5,5. Leite et al. (2008) descreveu a atividade para β -glicosidase em pH 4,5 e 4,0 em um estudo com os fungos *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans*, respectivamente.

Dessa forma é possível inferir que as β -glicosidasas fúngicas apresentam atividade ótima em valores de pH que variam de 4,0-5,5.

Figura 1. Efeito de pH sobre a atividade da β -glicosidase produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* por CES em farelo de trigo.

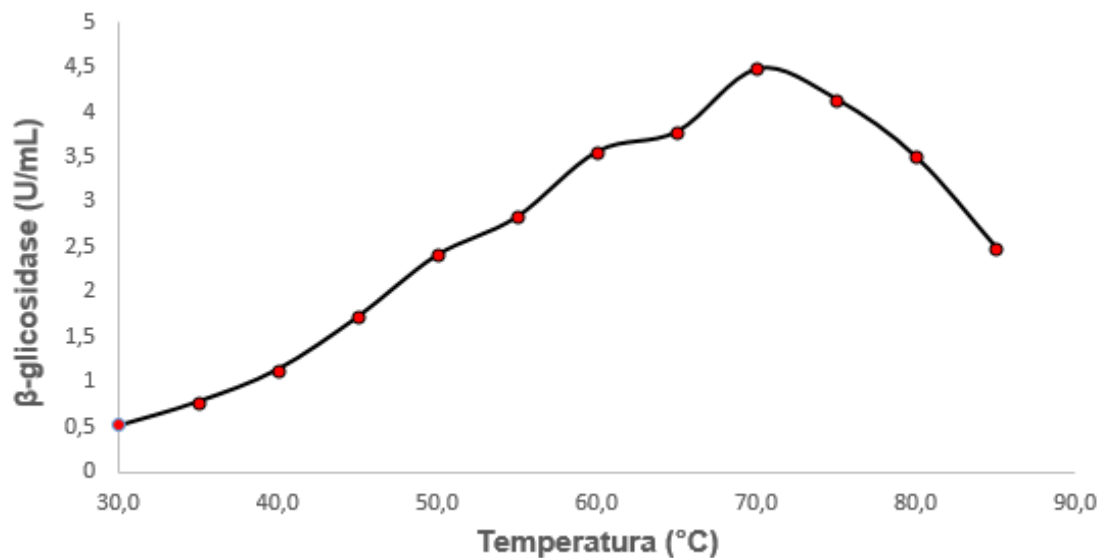


Fonte: a autora. Ensaio realizado com tampão MClivaine 0,1 M a 50°C.

A β -glicosidase de *P. sanguineus* apresentou maior atividade catalítica a 70°C. Observa-se que mesmo aos 80°C a atividade catalítica ainda permanece elevada (**Figura 2**). Outros estudos demonstraram que temperaturas ótimas para β -glicosidase produzida por outras linhagens fúngicas mesófilas como *Aspergillus niger*, *Gongronella butleri* e *Aspergillus terreus* foram obtidas em valores entre 60-65°C inferiores ao descrito no presente trabalho (SANTOS et al., 2016; YAN et al., 2016; FUJITA et al., 2015).

Enzimas que apresentam atividade catalítica em temperatura elevada são apreciadas para aplicação industrial considerando que elevadas temperaturas favorecem a solubilidade dos substratos, sendo possível aumentar a concentração desses no meio de reação, o que favorece a maior formação de produto (GOMES et al., 2007).

Figura 2. Efeito de temperatura sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* por CES em farelo de trigo.

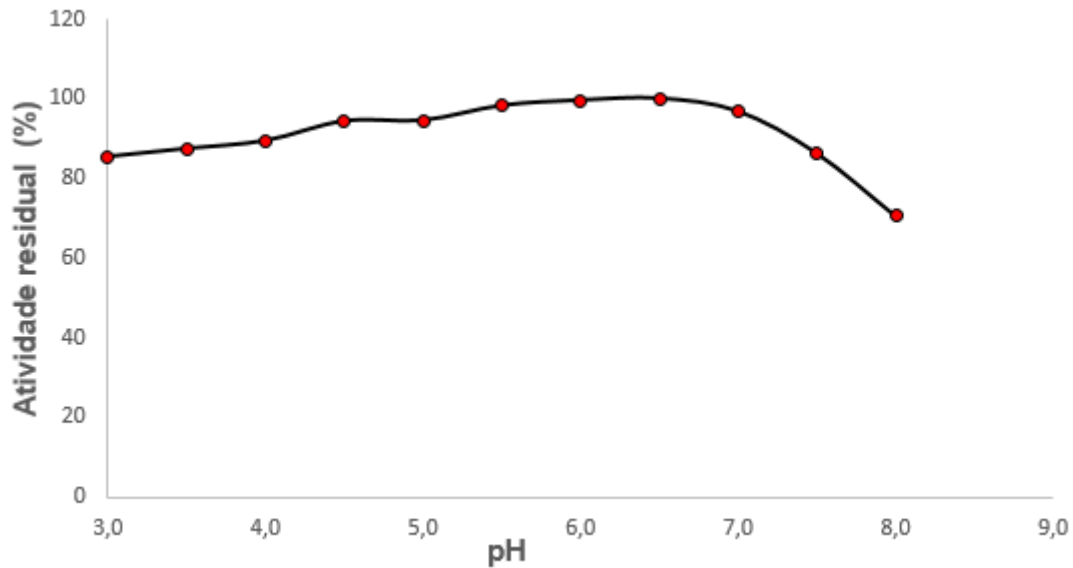


Fonte: a autora. Ensaio realizado no pH ótimo da enzima.

A β -glicosidase produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* apresentou estabilidade estrutural após 24h de incubação em faixa de pH de 3,0-7,0 (**Figura 3**). Um estudo realizado com o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 demonstrou-se que atividade de β -glicosidase se manteve estável em uma faixa de pH de 4,5-9,5. Outro estudo realizado com fungo *Thermoascus aurantiacus* demonstrou-se que a faixa de estabilidade estrutural da β -glicosidase foi 4,5-6,5 e com fungo *Aureobasidium pullulans* foi de 4,0-9,5 (PEREIRA et al., 2015; LEITE et al., 2007).

Dessa forma, é possível inferir que a β -glicosidase avaliada no presente trabalho apresenta estabilidade estrutural em ampla faixa de pH, podendo até mesmo ser comparada a estabilidade descrita para enzimas produzidas por linhagens termófilas, como *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e *Thermoascus aurantiacus*.

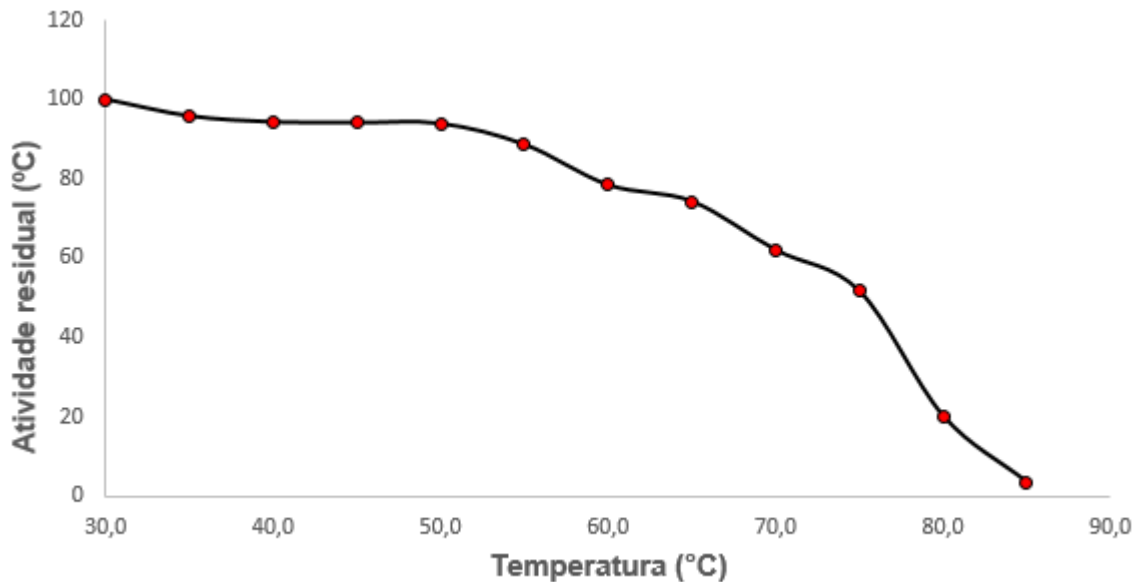
Figura 3. Efeito de pH de estabilidade sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* por CES em farelo de trigo.



Fonte: a autora. Ensaio realizado com soluções tampões MClvaine 0,1 M, Tris-HCl 0,1 M e glicina-NaOH 0,1 M durante 24h a 25°C.

A enzima manteve cerca de 93,88% sua atividade inicial após ser incubada por 1h a 50°C (**Figura 4**). A partir de 60°C a enzima começa a perder a sua atividade. Um estudo realizado por Cysneiros et al. (2013), utilizando o fungo *Humicola grisea* demonstrou-se a atividade de β -glicosidase em 98% após 3h de incubação à 40°C e 88,2% após 4h em 40°C, o que confirma a termoestabilidade da enzima produzida pelo fungo *P. sanguineus*.

Figura 4. Efeito da termoestabilidade sobre a atividade enzimática de β -glicosidase produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* por CES em farelo de trigo.



Fonte: a autora. Ensaio realizada com incubação a 1h nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados desse estudo foi possível inferir que a β -glicosidase produzida pelo fungo *P. sanguineus* apresenta potencial para ser utilizada em processos que exigem temperaturas mais elevadas e faixa de pHs mais ácidos. A β -glicosidase também apresentou uma estabilidade estrutural ampla em faixa de pH e temperatura. O cultivo em estado sólido favorece a redução dos custos da produção da enzima e a diminuição desse resíduo no meio ambiente e merece destaque para obtenção de enzimas industriais.

7. REFERÊNCIAS

ATALAH J., CÁCERES-MORENOS P., ESPINA G., BLAMEY J. M. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 478-488, 2019.

AGRAWAL R., VERMA A. K., SATLEWAL A. Application of nanoparticle-immobilized thermostable β -glucosidase for improving the sugarcane juice properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 472-482, 2016.

ANDRADES D., GRAEBIN N. G., AYUB M. A. Z., FERNANDEZ-LAFUENTE R., RODRIGUES R. C. Physico-chemical properties, kinetic parameters, and glucose inhibition of several beta-glucosidases for industrial applications. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 82-89, 2019.

BEHERA B.C., SETHI B.K., MISHRA R.R., DUTTA S.K., THATOI H.N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 197-210, 2017.

BAFFI M. A., TOBAL T., HENRIQUE J., LAGO G., LEITE R. S. R., BOSCOLO M., GOMES E., SILVA R. A Novel β -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 7, p. 997-1002, 2011.

CERDA A., MEJÍAS L., GEA T., SÁNCHEZ A. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1059-1068, 2017.

CYSNEIROS C.S.S., FERREIRA, R. N., OLIVEIRA, M. A., FAVORETTO, A. O., ARNHOLD, E., ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 426-435, 2013.

CAVALCANTE P. A. W., COÊLHO D. F., SILVA C. F., ABUD A. K. S., SOUZA R. R. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia plena**, v. 14, n. 6, 2018.

COSTA R. Parede Celular Vegetal. **Revista de Ciência Elementar**, v.07, 2019.

COTA A. M. M., SOUZA J. H. K., SILVA M. V. R., SILVA H. M. S., CAETANO J. P. J., SANTIAGO R. C., MARINHO R. M. Fitoestrogênios: valor terapêutico no climatério. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14.4, p. 262-266, 2004.

FLORENCIO C. Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. 2011. 83 f. **São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011. Dissertação (mestrado).**

FERNANDES P., CARVALHO F. Chapter 19 - Microbial Enzymes for the Food Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p. 513-544, 2017.

FRIGIERI T. C. O efeito da lignina residual e dos ácidos hexenurônicos na geração de organoclorado com dióxido de cloro. 87 f. **Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2016.**

FUJITA A., ALENCAR S. M., PARK Y. K. Conversion of Isoflavone Glucosides to Aglycones by Partially Purified β -Glucosidases from Microbial and Vegetable Sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 6, p. 1659-1672, 2015.

GARCIA N. F. L., SANTOS F. R. S., BOCCHINI D. A., PAZ M. F., FONSECA G. G., LEITE R. S. R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 49-56, 2018.

GONÇALVES F. A., LEITE R. S. R., RODRIGUES A., ARGANDOÑA E. J. S., FONSECA G. G. Isolation, identification and characterization of a novel high level B-glucosidase-producing *Lichteria ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 377-384, 2013.

GARCIA N. F. L., SANTOS F. R. S., GONÇALVES F. A., PAZ M. F., FONSECA G. G., LEITE R. S. R. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of biotechnology**, v. 18, n 4, p. 314-319, 2015.

GARCIA H. S., LOPÉZ-HERNANDEZ A., JR H. 4.47 - Enzyme Technology – Dairy Industry Applications. **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**, v. 4, p. 567-574, 2011.

GRIEBELER N. E., BORTOLI V., ASTOLFI A. L., DARONCHI N. A., SCHUMANN A. C., SALAZAR L. N., CANSIAN R. L., BACKES G. T., ZENI J. Seleção de fungos filamentosos produtores de amilases, proteases, celulases e pectinases. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 13, 2015.

HAN Y., CHEN H. Characterization of b-glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6081-6087, 2008.

KUHAD R. C., GUPTA R., SINGH A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, 2011.

KAUSHAL J., MEHANDIA S., SINGH G., RAINA A., ARYA S. K. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192-199, 2018.

LEMOS J. L. S. Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar. **Série Tecnologia Ambiental**, 2006.

LIMA L. R., SANTOS D. B., SANTOS M. V., BARUDA H. S., HENRIQUE M. A., PASQUINI D., PECORARO E., RIBEIRO S. J. L. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Quimica Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140-1147, 2015.

LIU G., QU Y. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 519-529, 2018.

LI X., ZHAO J., SHI P., YANG P., WANG Y., LUO H., YAO B. Molecular Cloning and Expression of a Novel β -Glucosidase Gene from *Phialophora* sp. G5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 941-949, 2013.

LEITE R. S. R., GOMES E., 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-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

LIMA R. C. F. Produção da enzima α -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de malte de cevada. Alegre: Universidade Federal

do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, 2019, **dissertação (mestrado)**.

MORAIS T. P., BARBOSA P. M. G., GARCIA N. F. L., ROSA-GARZON N. G., FONSECA G. G., PAZ M. F., CABRAL H., LEITE R. S. R. Catalytic and thermodynamic properties of β glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssochlamys spectabilis*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, p. 777-786, 2018.

MILETIC N., NASTASOVIC A., LOOS K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technogy**, v. 115, p. 126-135.

OLIVEIRA D. M. Atividade de enzimas proteolíticas de diferentes espécies microbianas. 2017. 34 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)** - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

OH MIN J., LEE J. P., BAEK S. C., KIM S. G., DO JO Y., KIM J., KIM H. Characterization of two extracellular β -glucosidases produced from the cellulolytic fungus *Aspergillus sp.* YDJ216 and their potential applications for the hydrolysis of flavone glycosides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 595-603, 2018.

PANDEY A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PINTO G. A. S, BRITO E. S., ANDRADE A. M. R., FRAGA S. L. P, TEIXEIRA R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa Agroindústria Tropical: Comunicado Técnico**, 102, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2005.

PEREIRA J. C., LEITE R. S. R., PRADO H. F. A., MARTINS D. A. B., GOMES E., SILVA R. Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-State cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 723-732, 2014.

PELIZER L. H., CARVALHO J. C. M., MORAES I. O. Protein production by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 70-76, 2015.

RODRIGUES F. A. Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana. 2007. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2007. **Dissertação (mestrado)**.

RABELO S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2010. **Tese (doutorado)**.

SAHD P. K., DUHAN S., DUHAN J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, n. 1, p. 1-15, 2018.

STROPARO E. C., BEITEL S. M., RESENDE J. T. V., KNOB A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina – Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SANTOS F. R. S., GARCIA N. F. L., PAZ M. F., FONSECA G. G., LEITE R. S. R. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 633-641, 2016.

SILVA B. C. R., GOIS I. M., BISPO D. F., MARQUES J. J., SILVA C. F. Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. **Scientia Plena**, v. 14, n. 2, p. 1-10, 2018.

SINGH G., KAUR S., KHATRI M., ARYA S. K. Biobleaching for pulp and paper industry in India: Emerging enzyme technology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 558-565, 2019.

SINGHANIA R. R., PATEL A. K., SUKUMURAN R. K., LARROCHE C., PANDEY A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507, 2012.

TIWARI R., NAIN L., LABROU N. E., SHUKLA P. Bioprospecting of functional cellulases from metagenome for second generation biofuel production: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, p. 244- 257, 2017.

VERMA A. D. A. K., DUBEY A. Enzyme engineering for enzyme activity improvement. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 675- 689, cap 39.1, 2019.

YAN F., XIA, W., ZHANG X., CHEN S., NIE X., QIAN L. Characterization of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 17, n. 6, p. 455-464, 2016.