

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS - FCBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**GERAL/BIOPROSPECÇÃO**

**TOBIAS PEREIRA DE MORAIS**

**Comparação do perfil catalítico e termodinâmico de diferentes  $\beta$ -glicosidases  
fúngicas**

Dourados, MS  
2015

TOBIAS PEREIRA DE MORAIS

**Comparação do perfil catalítico e termodinâmico de diferentes  $\beta$ -glicosidases  
fúngicas**

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, FCBA/UFGD para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral/Bioprospecção.

Área de Concentração: Bioprospecção

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados, MS  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M828c Morais, Tobias Pereira De  
Comparação do perfil catalítico e termodinâmico de diferentes B-glicosidases fúngicas [recurso eletrônico] / Tobias Pereira De Morais. -- 2018.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2015.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Fungos filamentosos. 2. Enzimas industriais. 3. Cultivo em estado sólido. 4. Termoestabilidade enzimática. 5. Parâmetros termodinâmicos. 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.

“COMPARAÇÃO DO PERFIL CATALÍTICO E TERMODINÂMICO DE DIFERENTES  $\beta$ -  
GLICOSIDASES FÚNGICAS”

POR

**TOBIAS PEREIRA DE MORAIS**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: “BIOPROSPECÇÃO”.



PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE  
ORIENTADOR – UFGD



PROF. DR. GUSTAVO GRACIANO FONSECA  
MEMBRO TITULAR – UFGD



DR. ALESSANDRO MINILLO  
MEMBRO TITULAR – UEMS / CÂMPUS DOURADOS

Aprovado em 17 de agosto de 2015.

## RESUMO

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, dímero de glicose resultante da ação de enzimas celulolíticas sobre a molécula de celulose, liberando glicose livre que pode ser utilizada em processos fermentativos para produção de etanol, essas enzimas são capazes de romper ligações glicosídicas de terpenos encontrados na uva, aumentando a volatilidade destes compostos, e na desglicosilação de isoflavonas presentes na soja, favorecendo a absorção destes compostos pelo intestino humano. O objetivo do presente estudo foi otimizar parâmetros para o cultivo de *Lichtheimia corymbifera* (mesófilo) e *Byssochlamys spectabilis* (termofílico) para a produção de  $\beta$ -glicosidases e comparar as propriedades catalíticas e termodinâmicas das enzimas parcialmente purificadas. A quantidade máxima de  $\beta$ -glicosidase produzida por *L. corymbifera* foi de 39 U / g de substrato seco (ou 3,9 U / mL) e a de *B. spectabilis* foi de 77 U / g (ou 7,7 U / mL). O pH e a temperatura ótimos foram 4,5 e 55° C e 4,0 e 50° C para a enzima *L. corymbifera* e *B. spectabilis*, respectivamente. A  $\beta$ -glicosidase produzida por *L. corymbifera* manteve-se estável em pH entre 4,0 e 7,5, enquanto a enzima de *B. spectabilis* manteve-se estável em pH entre 4,0 e 6,0. Em relação à termoestabilidade, a  $\beta$ -glicosidase produzida por *B. spectabilis* permaneceu estável por 1 h a 50° C, e a de *L. corymbifera* foi ativa por 1 h a 45° C. A determinação dos parâmetros termodinâmicos confirmou a maior termoestabilidade da enzima produzida pelo fungo termofílico *B. spectabilis*, que apresentou maiores valores de  $\Delta H$ , energia de ativação para desnaturação ( $E_a$ ) e meia-vida  $t(1/2)$ . As enzimas eram estáveis na presença de etanol e eram inibidas competitivamente pela glicose. Estas características contribuem para a sua utilização na sacarificação e fermentação simultâneas da biomassa vegetal.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Enzimas industriais. Cultivo em estado sólido. Termoestabilidade enzimática. Purificação Parcial. Parâmetros termodinâmicos.

## ABSTRACT

$\beta$ -glycosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of cellobiose, the glucose dimer resulting from the action of cellulolytic enzymes on the cellulose molecule, releasing free glucose that can be used in fermentative processes to produce ethanol, these enzymes are capable of breaking bonds glycosides of terpenes found in the grape, increasing the volatility of these compounds, and in the deglycosylation of isoflavones present in soybean, favoring the absorption of these compounds by the human intestine. The objective of the present study was to optimize parameters for the cultivation of *Lichtheimia corymbifera* (mesophile) and *Byssochlamys spectabilis* (thermophilic) for the production of  $\beta$ -glycosidases and to compare the catalytic and thermodynamic properties of the partially purified enzymes. The maximum amount of  $\beta$ -glycosidase produced by *L. corymbifera* was 39 U / g of dry substrate (or 3.9 U / mL) and that of *B. spectabilis* was 77 U / g (or 7.7 U / mL ). The optimum pH and temperature were 4.5 and 55 ° C and 4.0 and 50 ° C for the enzyme *L. corymbifera* and *B. spectabilis*, respectively. The  $\beta$ -glycosidase produced by *L. corymbifera* remained stable at pH between 4.0 and 7.5, while the *B. spectabilis* enzyme remained stable at pH between 4.0 and 6.0. In relation to thermostability,  $\beta$ -glycosidases produced by *B. spectabilis* remained stable for 1 h at 50 ° C, and that of *L. corymbifera* was active for 1 h at 45 ° C. The determination of the thermodynamic parameters confirmed the higher

thermostability of the enzyme produced by the thermophilic fungus *B. spectabilis*, which presented higher values of  $\Delta H$ , activation energy for denaturation ( $E_a$ ) and half-life  $t_{1/2}$ . The enzymes were stable in the presence of ethanol and were competitively inhibited by glucose. These characteristics contribute to its use in simultaneous saccharification and fermentation of plant biomass.

**Keywords:** Filamentous fungi. Industrial enzymes. Cultivation in solid state. Enzymatic thermostability. Partial purification. Thermodynamic parameters.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da Sabedoria e discernimento para nos momentos de dificuldade e “desespero” encontrar fé e conhecimento dos quais desconhecia.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pela orientação, incentivo, muita dedicação e amizade.

Aos meus pais Pedro Paulo e Neli e irmãos, Tatiane, Talita e Pedro Paulo que sempre me apoiaram com muita compreensão, amor, carinho e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao grupo do LEPPER Paulinha, Nayara, Flávia, Gabi, Carol, Haroldo pelos momentos de ensinamentos, risadas, companheirismo e acima de tudo união, pois acreditamos que o ponto norteador de um bom trabalho é realizarmos o mesmo em conjunto com carinho e dedicação.

Aos funcionários do FCBA, em especial, pela Fabi por toda ajuda, colaboração e amizade.

Aos meus amigos Bruno, Carol, Benjamin e Afonso que estiveram ao meu lado em grande parte de minha vida, desde o ensino médio, sempre me incentivando e me apoiando, também pelos momentos de descontração e força sempre quando foi necessário.

Aos meus amigos Luiz, Fatinha, Mônica, Fernando, Michele e Maiane por terem contribuído na minha formação, me apoiado e pelos muitos momentos de alegrias e risadas compartilhados desde os anos da graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão de bolsa.

A todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

*O início da sabedoria é a admissão da própria ignorância. Todo o meu saber consiste em saber que nada sei.*

*(Dalai Lama)*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	1
<b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	1
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	2
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
3.1. Celulose e parede celular vegetal .....	2
3.2. Enzimas celulolíticas e principais aplicações industriais das celulasas .....	3
3.3. Cultivo em Estado Sólido (CES).....	6
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	9
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	12
Produção, purificação parcial e caracterização enzimática da $\beta$ -glicosidase de duas linhagens fúngicas do cerrado Sul-Mato-Grossense .....	12
<b>1. RESUMO</b> .....	12
<b>2. ABSTRACT</b> .....	13
<b>3. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
4.1. Microrganismos.....	15
4.2. Produção de $\beta$ -glicosidase por cultivo em estado sólido.....	15
4.2.1. Inóculo.....	15
4.2.2. Extração da enzima .....	15
4.3. Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase nos extratos enzimáticos .....	16
4.4. Purificação parcial das $\beta$ -glicosidasas produzidas .....	16

4.4.1. Precipitação proteica .....	16
4.4.2. Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose .....	16
4.5. Caracterização físico-química das $\beta$ -glicosidases parcialmente purificadas .....	17
4.5.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática .....	17
4.6. Efeito de glicose e etanol sobre a atividade das enzimas .....	18
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
5.1. Produção de $\beta$ -glicosidase por cultivo em estado sólido.....	18
5.2. Purificação parcial das $\beta$ -glicosidases produzidas .....	21
5.3. Caracterização das $\beta$ -glicosidases parcialmente purificadas .....	23
5.4. Termoinativação irreversível das enzimas .....	27
5.5. Efeito de glicose sobre a atividade das enzimas .....	29
5.6. Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas .....	30
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUÇÃO

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, dímero de glicose resultante da ação de enzimas celulolíticas sobre a molécula de celulose, liberando glicose livre que pode ser utilizada em processos fermentativos para a produção de etanol. No entanto, a maioria das  $\beta$ -glicosidases microbianas apresenta baixa especificidade para celobiose, podendo atuar em diferentes substratos glicosídeos. Tal característica possibilita aplicação destas enzimas em diferentes setores industriais, principalmente nas indústrias de biocombustíveis, alimentos e bebidas.

As  $\beta$ -glicosidases são capazes de romper as ligações glicosídicas de terpenos encontrados na uva, aumentando a volatilidade destes compostos, o que favorece a qualidade aromática de sucos e vinhos e também podem ser utilizadas para desglicosilar isoflavonas presentes na soja, favorecendo a absorção destes compostos pelo intestino humano, dessa forma, contribuem para a obtenção de alimentos funcionais derivados de soja.

Porém, a utilização das  $\beta$ -glicosidases em escala industrial depende da superação de alguns entraves existentes, tais como: elevado custo de produção, inibição pelo produto de reação, baixa estabilidade estrutural das enzimas, dentre outros. O presente trabalho teve como objetivo selecionar microrganismos mesófilos e termófilos da Região de Dourados – MS, com potencial para produção de  $\beta$ -glicosidase; avaliar os parâmetros do processo de cultivo para produção da enzima e comparar as propriedades catalíticas e termodinâmicas das  $\beta$ -glicosidases das linhagens selecionadas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi promover a seleção, produção, purificação parcial e caracterização de  $\beta$ -glicosidases obtidas de duas linhagens fúngicas isoladas da região de Dourados, MS.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

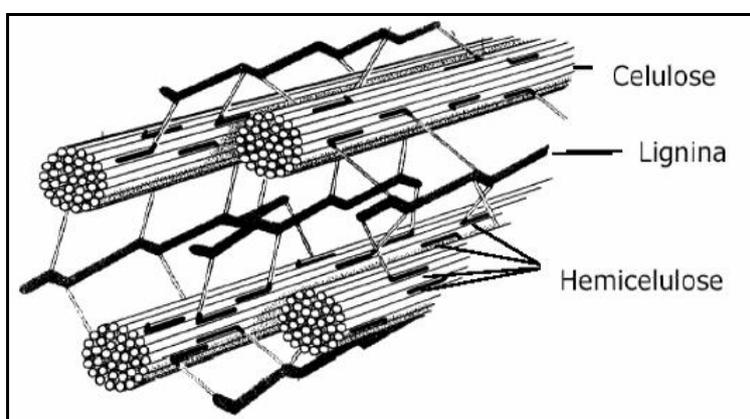
O objetivo específico deste trabalho foi selecionar fungos mesofílicos e termofílicos encontrados na região de Dourados – MS, com potencial de produção de  $\beta$ -glicosidase, avaliar as condições do cultivo dos mesmos em estado sólido (CES); purificar parcialmente, efetuar a caracterização físico-química e, avaliar a potencial aplicação industrial das enzimas isoladas.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Celulose e parede celular vegetal

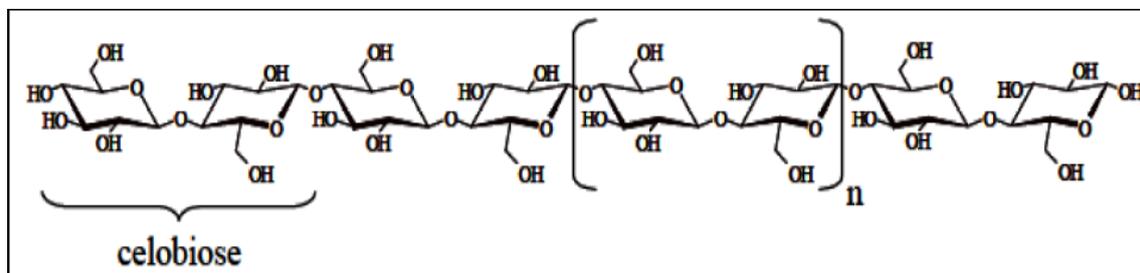
A celulose constitui mais de 60% da biomassa produzida mundialmente, o que equivale a aproximadamente dois bilhões de toneladas de lignocelulose. Essa biomassa é constituída por três frações principais (Figura 1), sendo lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa (FERREIRA, 2010).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. A lignina, depois da celulose, é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas. É um heteropolímero amorfo que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares. A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (CARVALHO et al., 2009; SOUZA et al., 2012).



**Figura 1** – Composição estrutural da parede celular vegetal (PEREIRA, JR., 2005).

A resistência da celulose a hidrólise será definida pelo grau de polimerização e pelo índice de cristalinidade entre cada fibra dessa macromolécula, estabilizada por inúmeras pontes de hidrogênio, intra e extramolecular - Figura 2 (HARGREAVES, 2008).



**Figura 2** - Representação estrutural da celulose, formada por celobiose (Fonte: HARGREAVES, 2008).

A hidrólise da celulose pode ser realizada com tratamento físico-químico ou enzimático. A hidrólise físico-química consiste na combinação de ácidos e/ou bases (diluídos ou não), pressão e temperatura, sendo que o valor de cada um desses componentes varia de acordo com o substrato. Atualmente, métodos físico-químicos (pré-tratamentos) são associados previamente à hidrólise enzimática para aumentar a eficiência catalítica do complexo celulolítico (PITARELO, 2007; HARGREAVES, 2008).

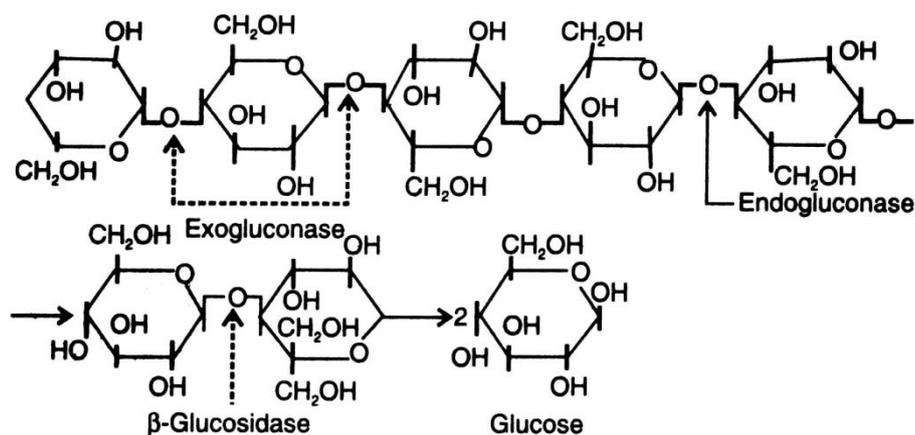
O desempenho da enzima na hidrólise da biomassa é afetado por vários fatores, incluindo temperatura, pH e carga de sólidos. Em primeiro lugar, a condição da biomassa é definida pelo método de pré-tratamento aplicado. Muitos métodos de pré-tratamento dependem de temperaturas elevadas e condições ácidas para tornar se fazer a biomassa susceptível acessíveis à hidrólise enzimática. As etapas de pré-tratamento são essenciais para eficiência das enzimas, no entanto, os biocatalizadores podem ser inativados por variações de pH e temperatura, sendo necessário ajustar esses parâmetros para adição das enzimas, o que muitas vezes encarece o processo, inviabilizando a conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis (MCINTOSH, 1996; SORENSEN et al., 2013).

### **3.2. Enzimas celulolíticas e principais aplicações industriais das celulasas**

As β-glicosidasas podem ser encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. A celobiose se divide em duas moléculas de glicose, protegendo as enzimas acima mencionadas a partir do efeito de produto de inibição da celobiose. A sua

aplicação na conversão de biomassa em celulose com conteúdo para açúcares fermentáveis para a produção de etanol combustível é uma área intensivamente estudada (CHEN et al., 2007; KRISCH et al., 2012).

Para ocorrer à hidrólise enzimática da celulose em fungos filamentosos, a catálise é mediada por um complexo enzimático, esse processo é composto por três grupos enzimáticos: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidase, sendo realizado de forma sinérgica (LYND et al., 2002) - (Figura 3).



**Figura 3** – Representação estrutural de exoglucanase, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase (Fonte: <http://www.eplantscience.com>).

As endoglucanases hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas no interior das cadeias de celulose de forma aleatória, reduzindo drasticamente o grau de polimerização da molécula. Nas extremidades tanto redutora como não redutora da cadeia, as exoglucanases podem se ancorar e em sequência liberar celobioses ou glicoses solúveis. Então as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam as celobioses e assim eliminam a inibição por substrato das demais enzimas. Estas reações ocorrem simultaneamente (ZHANG; LYND, 2004).

As  $\beta$ -glicosidases são mais comumente classificadas com base na especificidade para o substrato ou qualquer identidade de sequência de nucleotídeos. Com base na especificidade do substrato,  $\beta$ -glicosidases têm sido tradicionalmente divididas em celobiasas verdadeiras (alta especificidade em relação à celobiose), aril- $\beta$ -glicosidases (alta especificidade para substratos aril-glicosídeos, tais como p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (PNPG)), ou uma baixa especificidade com  $\beta$ -glicosidases (SHEWALE, 1982; EYZAGUIRRE et al., 2005). A maioria das  $\beta$ -glicosidases é colocada na última categoria (SORENSEN et al., 2013).

A  $\beta$ -glicosidase apresenta importante papel na hidrólise enzimática da celulose, sendo responsável pela conversão da celobiose em monômeros de glicose. A celobiose é o principal produto formado pela ação das enzimas despolimerizantes sobre a cadeia de celulose. O acúmulo desse dissacarídeo no meio reacional inibe a atividade das enzimas celulolíticas, desta forma, a  $\beta$ -glicosidase possibilita a continuidade do processo catalítico porque degrada o principal inibidor das celulasas, liberando monossacarídeos fermentescíveis para produção de etanol (LEITE et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

Os fungos filamentosos são os mais utilizados industrialmente na produção de celulasas, principalmente dos Gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Phanerochaete* (SINGHANIA et al., 2010).

As celulasas ocupam o terceiro lugar no ranking mundial das enzimas produzidas industrialmente. Isso se deve às suas amplas aplicações: no processamento de algodão, na reciclagem de papel, na extração de sucos, como detergentes enzimáticos e como aditivos para alimentação animal (FERREIRA, 2010).

As celulasas são utilizadas como aditivos em rações, sendo benéfico para animais de estômago simples, tais como porcos e galinhas, através do aumento da digestibilidade dos alimentos (KRISCH et al., 2012).

Recentemente, a fermentação em estado sólido do bagaço de cranberry e abacaxi com cepas fúngicas de *Lentinus edodes* e *Rhizopus oligosporus* foi realizada para aumentar a quantidade de compostos fenólicos livres extraíveis, potencializando sua atividade antioxidante. O aumento de polifenóis livres pode ser justificado pela produção de  $\beta$ -glicosidase pelas linhagens fúngicas utilizadas. Essa enzima é capaz de hidrolisar glicosídeos fenólicos e liberar agliconas livres extraíveis, tendo potencialmente atividade antioxidante elevada, por conseguinte, que as tornam muito úteis para aplicações em indústrias de alimentos e bebidas (VATTEM; SHETTY, 2003; CORREIA et al., 2004; KRISCH et al., 2012).

As leguminosas, especialmente a soja que é rica em isoflavonas, são chamadas de fitoestrogênios devido à fatores estruturais e similaridade ao hormônio estrogênio (CHUN et al., 2008). Elas podem aliviar os sintomas da menopausa e ajudar a prevenir várias doenças crônicas e alguns tipos de cancro. No entanto, em alimentos à base de soja, as isoflavonas encontram-se na forma glicosilada. Sendo assim, a produção de agliconas ou a desglicosilação por hidrólise através das  $\beta$ -glicosidases é altamente

desejada, pois são absorvidas pelo intestino de forma mais fácil (PANDJAITAN et al., 2000; HU et al., 2009; KRISCH et al., 2012).

Os glicosídeos conjugados de isoflavonas são convertidos em agliconas sob condições ácidas ou alcalinas ou ainda pela ação da  $\beta$ -glicosidase. As formas agliconas apresentam maior potencial para absorção no intestino do que as formas glicosiladas (SILVA, 2011).

Diferentes trabalhos descritos na literatura afirmam que uma dieta rica em isoflavonas pode contribuir no controle e prevenção de muitas doenças crônicas, tais como: câncer (mama, próstata e cólon), osteoporose, doenças cardiovasculares e outras, além de aliviar os sintomas da menopausa (CHUN, 2008; SILVA, 2011).

A  $\beta$ -glicosidase tem várias aplicações em tecnologia de alimentos, podendo degradar os pigmentos como antocianinas em açúcares e antocianidinas. Assim, essa enzima é apropriada para descoloração de bebidas diferentes e pode ser utilizada no processamento de sucos de laranja, vinhos brancos e rose, sendo o excesso de cor removido através do tratamento enzimático (OUTTRUP; BOYCE, 1990; KRISCH et al., 2012).

A presença de  $\beta$ -glicosidases no processo de vinificação favorece a liberação dos compostos aromatizantes, pois as cadeias glicosídicas são rompidas, aumentando a volatilidade dos compostos. Tais compostos são coletivamente chamados de terpenos, dentre eles estão: nerol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, linalool, citronellol e outros. Quando glicosilados, os mesmos, apresentam baixa volatilidade e pouco contribuem para o aroma do vinho. (VILLENA et al., 2007; BAFFI et al., 2011).

### **3.3. Cultivo em Estado Sólido (CES)**

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou bioprocessamento em estado sólido ou cultivo em estado sólido aplica-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998).

Desde os primórdios da civilização o homem vem explorando de forma natural a utilização de enzimas através do CES para produção de alimentos e bebidas. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida pelos sumérios e babilônios antes do ano 6.000 a.C. Por volta do ano 2.000 a.C. os egípcios passaram a empregá-la também na fabricação de pão. Estas aplicações se

davam de forma meramente práticas, sem nenhum conhecimento das reações enzimáticas envolvidas. Estes processos só foram esclarecidos quando se fez necessário conhecer os mecanismos e reações químicas. Esta evolução dos conhecimentos técnicos e científicos propiciou a utilização de enzimas em diversos ramos de atuação da atividade humana (WANDERLEY; NEVES, 2011).

Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a esse tipo de processo, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (DURAND, 2003).

O cultivo em estado sólido oferece vantagens sobre o cultivo líquido, especialmente para culturas fúngicas. Neste tipo de processo, a aeração tende a requerer pressões menores que as necessárias para os cultivos líquidos, e a agitação vigorosa é dispensável, o que pode evitar em grande parte a ruptura celular. Os metabólitos obtidos são geralmente mais concentrados e os procedimentos de purificação são mais baratos (SANTOS et al., 2011).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, e a agroindústria brasileira teve forte expansão e crescimento nos últimos anos, ocasionando a geração de grande quantidade de resíduos agroindustriais, que em sua maioria estão subaproveitados, acarretando muitas vezes em problemas ambientais (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Resíduos agroindustriais representam uma fonte alternativa para o cultivo em estado sólido de microrganismo visando à redução de custos e desperdício de recursos. Neste contexto, é crescente o interesse econômico para o desenvolvimento de processos para o tratamento e utilização eficaz de resíduos celulósicos como fontes de carbono de baixo custo (SETHI et al., 2013).

Entre os resíduos comumente utilizados para este fim está o bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, palhas de milho, arroz e farelo de trigo, cascas de café, peles, cascas e sementes de frutas (SILVA et al., 2013).

Entretanto, o CES apresenta algumas desvantagens, como: elevada heterogeneidade, dificuldade na dissipação de energia e no controle dos parâmetros de funcionamento e na operação contínua. A geração de calor devido às atividades metabólicas dos microrganismos, o que é desejável em compostagem, é muitas vezes fatal para processos biotecnológicos porque uma grande parte das enzimas produzidas durante a fermentação pode ser desnaturada pelo calor no final do processo. A umidade

é outro parâmetro que interfere ativamente no CES. O alto teor de umidade resulta em baixa porosidade no substrato e impede a penetração de oxigênio, enquanto o baixo teor de umidade pode levar a má acessibilidade de nutrientes, resultando em crescimento microbiano dificultado (HARGREAVES, 2008; SINGHANIA et al., 2009).

São grandes os desafios que precisam ser abordados para a implementação bem sucedida do CES em escala industrial. Com isso, diversas pesquisas têm sido direcionadas e vem sendo realizadas com o objetivo de buscar alternativas para produção de enzimas, com o uso de diferentes resíduos como substrato. A seleção de microrganismos e condições para se alcançar os melhores rendimentos no processo, pode tornar essa técnica viável para utilização industrial, uma vez que, a maioria dos processos fermentativos industriais ainda ocorre em cultivo submerso.

## REFERÊNCIAS

- BAFFI, M. A.; TOBAL, T.; LAGO, J. H. G.; LEITE, R. S. R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. A novel  $\beta$ -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: characterization and application in winemaking. *Journal of Food Science*, v. 76, p. 997-1002, 2011.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, v. 32, p. 2191-2195, 2009.
- CHEN, M.; XIA, A. L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 59, p. 85-89, 2007.
- CHUN, J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp.4. *Food Chemistry*, v. 109, p. 278-284, 2008.
- CORREIA RTP, MCCUEB P, MAGALHAES MMA, MACEDO GR, SHETTY K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 403-407, 2004.
- DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2/3, p.113-125, 2003.
- EYZAGUIRRE, J.; HIDALGO, M.; LESCHOT, A.  $\beta$  -glucosidases from filamentous fungi: Properties, structure, and applications. In *Handbook of Carbohydrate Engineering*; Taylor and Francis Group, LLC: Boca Raton, FL 33487, USA, p. 645–685, 2005.
- FERREIRA, V. Produção de  $\beta$ -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil, 2010.
- HARGREAVES, P. I; Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da floresta Amazônica e otimização de sua produção sobre celuligninina de bagaço de cana. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. Brasil, 2008.
- HU, S.C; HONG, K; SONG, YC; LIU, JY; TAN R.X. Biotransformation of soybean isoflavones by a marine *Streptomyces* sp. 060524 and cytotoxicity of the products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 115-121, 2009.
- KRISCH, J.; BENCSIK, O.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C.; TAKÓ, M. Characterization of a  $\beta$ -glucosidase with transgalactosylation capacity from the zygomycete *Rhizomucor miehei*. *Bio resource Technology*, v. 114, p. 555-560, 2012.

LEITE, R.S.R.; BOCCHINI, D.A.; MARTINS, E.S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137, p. 281 - 288, 2007.

LYND, L.R., WEIMER, P.L., van ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MCINTOSH, L.P.; HAND, G.; JOHNSON, P.E.; JOSHI, M.D.; KORNER, M.; PLESNIAK, L.A.; ZISER, L.; WAKARCHUK, W.W.; WITHERS, S.G. The pK a of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: A C-13-NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry (N Y)*, v. 35, p. 9958–9966, 1996.

OUTTRUP H, BOYCE COL. Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty, W. M., Kelly, C. T. (eds) *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier, London, p. 227-254, 1990.

PANDJAITAN N, HETTIARACHCHY N, JU ZY. Enrichment of genistein in soy protein concentrate with  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Food Science*. 2000.

PEREIRA JR, N. Biotechnology of lignocellulosics: Trends & challenges. In: VIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa. Maringá, 2005.

PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha do bagaço da cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Brasil, 2007.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 3, p. 1-15, 1998.

SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I.S.; BONOMO, R.C.F.; SANTANA, N.B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. *Ciência Rural*, v. 41, n. 12, p. 2210-2216, 2011.

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

SETHI, S.; DATTA, A.; GUPTA, B. L.; GUPTA, S. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnology*, p. 1-7, 2013.

SHEWALE, J.G.  $\beta$ -glucosidase its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Internacional Journal Biochemistry*, v. 14, p. 435–443, 1982.

SILVA, L. H.; CELEGHINI, R.M.S.; CHANG, Y.K. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chemistry*, v. 128, p. 640-644, 2011.

SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 1-9, 2013.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 541-549, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, p. 205-218, 2003.

SORENZEN, A.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S.; AHRING, B.K. Fungal  $\beta$ -glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Journal Biomolecules*, v. 3, p. 612-631, 2013.

SOUZA, F.H.M.; NASCIMENTO, C.V.; ROSA, J.C.; MASUI, D.C.; LEONE, F.A.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 272-278, 2010.

VATTEM DA, SHETTY K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 367-379, 2003.

VILLENA, M.A.; IRANZO, J.F.U.; PÉREZ, A.I.B.  $\beta$ -glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 420-425, 2007.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. v. 1, n. 1, p. 47-50, 2011.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. TOWARD an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulase systems. *Biotechnology Bioengineering*, v. 88, p. 797-824, 2004.

## CAPÍTULO 2

### **Produção, purificação parcial e caracterização enzimática da $\beta$ -glicosidase de duas linhagens fúngicas do cerrado Sul-Mato-Grossense**

#### **1. RESUMO**

MORAIS, T. P. 2015. **Produção, purificação parcial e caracterização enzimática da  $\beta$ -glicosidase de duas linhagens fúngicas do cerrado Sul-Mato-Grossense.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, FCBA/UFGD, Dourados, 2015.

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, dímero de glicose resultante da ação de enzimas celulolíticas sobre a molécula de celulose, liberando glicose livre que pode ser utilizada em processos fermentativos para produção de etanol, essas enzimas são capazes de romper ligações glicosídicas de terpenos encontrados na uva, aumentando a volatilidade destes compostos, e na desglicosilação de isoflavonas presentes na soja, favorecendo a absorção destes compostos pelo intestino humano. Este estudo teve por objetivo avaliar os parâmetros do processo de cultivo para produção de  $\beta$ -glicosidases e comparar as propriedades catalíticas e termodinâmicas das enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas. A produção de  $\beta$ -glicosidase foi testada em diferentes resíduos agroindustriais e apresentou maior atividade em farelo de trigo, sendo de 39 U/g para o isolado 12 e 77 U/g para o isolado 45. Os valores de pH e temperatura ótima para as  $\beta$ -glicosidases parcialmente purificadas foram de 4,5 e 55°C e 4,0 e 50°C, para os isolados 12 e 45 respectivamente. A  $\beta$ -glicosidase produzida pelo isolado 12 apresentou estabilidade ao pH em uma faixa de 4,0 a 7,5, enquanto a enzima produzida pelo isolado 45 apresentou uma faixa de 4,0 a 6,0. Com relação à temperatura de estabilidade o isolado 45 mostrou-se mais termoestável, com uma faixa de 30 à 50°C, comparado ao fungo mesófilo que apresentou uma faixa de 30 à 45°C. Os parâmetros termodinâmicos confirmam maior estabilidade estrutural da enzima produzida pelo fungo termófilo, apresentando maiores valores de  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  e tempo de meia vida ( $t/2$ ). As enzimas foram estáveis ao etanol e foram inibidas competitivamente por glicose.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Enzimas industriais. Cultivo em estado sólido.

## 2. ABSTRACT

MORAIS, T. P. 2015. **Production, partial purification and characterization of the enzyme  $\beta$ -glucosidase of two fungal strains from Brazilian Savannah.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, FCBA/UFGD, Dourados, 2015.

The  $\beta$ -glycosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of cellobiose, glucose dimer resulting from the action of cellulolytic enzymes on the cellulose molecule, releasing free glucose that can be used in fermentation processes for ethanol production, these enzymes are capable of breaking bonds terpene glycoside found in grapes, increasing the volatility of these compounds, and deglycosylation of isoflavones present in soy, favoring the absorption of these compounds for the human intestine. This study aimed to evaluate the parameters of the cultivation process to produce  $\beta$ -glucosidase and compare the catalytic and thermodynamic properties of the enzymes produced by selected strains. Production of  $\beta$ -glucosidase was tested in different industrial residues and presented higher activity in wheat bran, and 39 U/g for the isolated 12 and 77 U/g for the isolated 45. The optimal pH and temperature for the partially purified  $\beta$ -glucosidases were 4.5 and 4.0, and 55°C and 50°C for isolated 12 and 45 respectively. The  $\beta$ -glucosidase produced by the isolated 12 showed stability at a pH level of 4.0 to 7.5, while the enzyme produced by isolate 45 showed a level of 4.0 to 6.0. With regard to temperature stability isolated 45 was more thermostable, with a range of 30 to 50°C, compared to mesophilic fungus that presented a range of 30 to 45°C. The thermodynamic parameters confirm greater structural stability of the enzyme produced by the thermophilic fungi, with higher values of  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and half-life ( $t/2$ ). The enzymes were stable for ethanol and were competitively inhibited by glucose.

Keywords: Filamentous fungi. Industrial enzymes. Cultivation solid state.

### 3. INTRODUÇÃO

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, dímero de glicose resultante da ação de enzimas celulolíticas sobre a molécula de celulose, liberando glicose livre, que pode ser utilizada em processos fermentativos para produção de etanol. Esta aplicação biotecnológica das  $\beta$ -glicosidases é a mais difundida na literatura científica. No entanto, a maioria das  $\beta$ -glicosidases microbianas apresentam baixa especificidade à celobiose e podem atuar em diferentes substratos glicosídeos. Tal característica possibilita aplicação destas enzimas em diferentes processos industriais, principalmente nas indústrias de alimentos e bebidas (LEITE et al., 2008; KRISH et al., 2012).

As  $\beta$ -glicosidases com baixa especificidade podem romper as ligações glicosídicas de terpenos encontrados na uva, aumentando a volatilidade destes compostos, o que favorece a qualidade aromática de sucos e vinhos. As  $\beta$ -glicosidases também podem ser utilizadas para desglicosilar isoflavonas presentes na soja, favorecendo a absorção destes compostos pelo intestino humano, contribuindo para obtenção de alimentos funcionais derivados de soja. Porém, a utilização das  $\beta$ -glicosidases em escala industrial depende da superação de alguns entraves existentes, tais como: elevado custo de produção, inibição pelo produto de reação, baixa estabilidade estrutural das enzimas, dentre outros (BAFFI et al., 2011; SILVA et al., 2011).

O número de espécies de fungos na terra é estimado em 1,5 milhões, dos quais são conhecidos cerca de 5%, o que estimula esforços mais dirigidos para desvendar o potencial de novas espécies ainda desconhecidas, presentes na natureza. Espécies novas podem viabilizar a prospecção das novas enzimas microbianas por métodos tradicionais de isolamento e cultivo de microrganismos, ou ainda, por metagenoma, onde o material genético é extraído do ambiente e inserido em microrganismos hospedeiros. Dessa forma, o número de genomas de organismos que estão sendo sequenciados aumenta constantemente, e junto com ela, as sequências de novos genes (SORENSEN et al., 2013).

Tendo em vista essa busca por novas linhagens com potencial biotecnológico, o presente trabalho teve como objetivo selecionar microrganismos mesófilos e termófilos da Região de Dourados – MS, com potencial para a produção de  $\beta$ -glicosidase, bem como avaliar os parâmetros de cultivo para produção de enzimas e efetuar a

caracterização físico-química das  $\beta$ -glicosidases obtidas a partir das linhagens selecionadas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Microrganismos**

Foram selecionados dois fungos filamentosos dentre as linhagens fúngicas mantidas no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos, LEPFER/FCBA/UFGD, com considerável potencial para produção de  $\beta$ -glicosidases, inicialmente denominados isolado 12 (mesófilo) e isolado 45 (termófilo). Ambos foram encaminhados para Coleção Brasileira de Culturas do Meio Ambiente e Indústria CBMAI/Unicamp - Campinas-SP, para identificação taxonômica.

### **4.2. Produção de $\beta$ -glicosidase por cultivo em estado sólido**

A produção das enzimas foi efetuada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g de substrato umedecido com solução nutriente constituída de sulfato de amônia 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% e nitrato de amônia 0,1% (m/v). O material foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. O processo fermentativo ocorreu a 30°C para o isolado 12 e 45°C para o isolado 45. Alguns parâmetros de cultivo foram avaliados como: diferentes tipos de substratos (casca de arroz, bagaço de cana, farelo de soja, farelo de trigo, sabugo de milho e palha de milho), umidade inicial do meio (50% a 80%) e tempo de cultivo (24h a 192h), visando determinar as condições ótimas de cultivo para produção de  $\beta$ -glicosidases pelas linhagens selecionadas.

#### **4.2.1. Inóculo**

Os microrganismos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado. O isolado 12 foi mantido por 48 horas a 30°C e o isolado 45 foi mantido por 72 horas a 45°C. A suspensão dos microrganismos foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente devidamente esterilizada. A inoculação dos fungos no substrato ocorreu pela transferência de 5 mL dos inóculos para os frascos Erlenmeyer contendo os meios de produção previamente preparados.

#### **4.2.2. Extração da enzima**

Após o crescimento dos microrganismos foram acrescentados 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer contendo os meios fermentados e os micélios foram

quebrados com auxílio de um bastão de vidro. Posteriormente os mesmos foram colocados sob agitação orbital em Shaker durante 1 hora, a 25°C, a 100 rpm. Por fim, os extratos enzimáticos foram filtrados em tecido sintético (nylon) e centrifugados 1500 x g/5 min. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático, sendo utilizado nos ensaios subsequentes.

### **4.3. Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase nos extratos enzimáticos**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada com 50  $\mu$ L do extrato enzimático, 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 4,5) e 250  $\mu$ L de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP $\beta$ G, Sigma), reagindo por 10 minutos à 50°C, e a reação enzimática paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2M. 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  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

### **4.4. Purificação parcial das $\beta$ -glicosidasas produzidas**

#### **4.4.1. Precipitação proteica**

Sob leve agitação do extrato enzimático bruto, previamente refrigerado a 5°C, foi adicionado etanol a -18°C, até atingir a concentração de 80% de saturação. A solução foi mantida por 12 horas em banho de gelo e posteriormente o precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação 1500 x g/5 min. O precipitado foi resuspendido em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0.

#### **4.4.2. Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose**

As enzimas concentradas foram fracionadas por cromatografia de troca iônica em resina aniônica Q-Sepharose fast flow GE Healthcare<sup>®</sup> em coluna aberta, contendo 2 mL de resina. As amostras foram eluídas em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0, com fluxo de 0,3 mL/min, seguida de um gradiente salino de 0 a 1000 mM de NaCl. Amostras de 3 mL foram coletadas, perfazendo um volume total de 140 mL. As frações que apresentaram atividade de  $\beta$ -glicosidase foram reunidas para realização da caracterização físico-química das enzimas.

## **4.5. Caracterização físico-química das $\beta$ -glicosidasases parcialmente purificadas**

### **4.5.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática**

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade das enzimas a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0), sendo utilizado o tampão McIlvaine. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas (30 a 80°C), nos respectivos pHs ótimos de cada enzima. A estabilidade das enzimas ao pH foi avaliada incubando-as por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH. O tampão utilizado foi McIlvaine (3,0 - 8,0). A termoestabilidade foi estudada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes temperaturas (30 a 80°C). As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima (LEITE et al., 2008).

### **4.5.2. Determinação dos parâmetros termodinâmicos das $\beta$ -glicosidasases**

As cinéticas de termoinativação foram medidas como descrito por Leite et al., 2007. O percurso de tempo de termoinativação das  $\beta$ -glicosidasases foi medido incubando as respectivas enzimas, em pH 5,0 às temperaturas indicadas, acondicionadas em tubos de ensaio. Periodicamente, amostras foram retiradas, esfriadas a 25°C e armazenadas nesta temperatura antes de serem analisadas as atividades residuais. Para a enzima do isolado 12, as temperaturas de preincubação e os tempos para remoção foram: a 45°C, a cada 30 min até 120 min; a 50°C, a cada 10 min até 60 min e a 55°C, a cada 10 min até 40 min. Para a enzima do isolado 45, as condições foram: a 50 °C, a cada 60 min até 300 min; a 55°C, a cada 10 min até 60 min e a 60°C, a cada 3 min até 30 min. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) das enzimas foi definido como o tempo no qual, após incubação a 50°C, a atividade residual da enzima atingiu 50% da atividade original. O  $t_{1/2}$  também foi determinado de acordo com a equação (1) abaixo. O coeficiente de velocidade de termoinativação ( $k_d$ ), foi determinado por regressão linear do plote do logaritmo natural da atividade residual ( $\ln a_r$ ) versus o tempo de preincubação na temperaturas indicada, no qual as enzimas foram irreversivelmente inativadas, obedecendo cinética de velocidade de primeira ordem. O  $k_d$  foi o valor absoluto da inclinação da linha de regressão.

Os parâmetros termodinâmicos de desnaturação das  $\beta$ -glicosidases foram calculados conforme as seguintes equações:

$$\begin{aligned}t(1/2) &= 0,693 / k_d \quad (1) \\ \Delta G &= -RT \ln (k_d h / k_B T) \quad (2) \\ \Delta H &= E_a - RT \quad (3) \\ E_a &= -R (\text{slope}) \quad (4)\end{aligned}$$

Onde  $\Delta G$  é energia livre ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante dos gases ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  é a correspondente temperatura absoluta (K),  $k_d$  é a constante de termoinativação ( $\text{min}^{-1}$ ),  $h$  é a constante de Plank ( $11.04 \times 10^{-36} \text{ J mol}^{-1}$ ),  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ),  $\Delta H$  é a entalpia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ),  $E_a$  é a energia de ativação para desnaturação ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ). A energia de ativação para desnaturação ( $E_a$ ) foi determinada por regressão linear do plote do logaritmo natural de  $k_d$  ( $\text{Ln } k_d$ ) versus o recíproco das temperaturas absolutas ( $1/T$ , K) nas quais as enzimas foram irreversivelmente inativadas com cinética de velocidade de primeira ordem, de acordo com equação 4.

#### **4.6. Efeito de glicose e etanol sobre a atividade das enzimas**

Para a determinação do efeito de glicose sobre a atividade das enzimas, foi utilizado pNP $\beta$ G (2 mM) como substrato. A atividade enzimática foi quantificada com a adição destes compostos, em diferentes concentrações, na mistura da reação (0-100 mM de glicose). Para a determinação do efeito de etanol sobre a atividade das enzimas, a concentração utilizada foi de (0-30% de etanol). Os ensaios do isolado 12 foram realizados a 55°C e tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5) e do isolado 45 a 50°C em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,0).

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Produção de $\beta$ -glicosidase por cultivo em estado sólido**

Dentre as linhagens fúngicas isoladas de diferentes ambientes e mantidas no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos – LEPFER/FCBA/UFGD, duas foram selecionadas para produção de  $\beta$ -glicosidase por cultivo em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais, sendo uma mesófila (isolado 12) e outra termófila (isolado 45).

Os critérios utilizados para seleção das linhagens foram à elevada produção de  $\beta$ -glicosidase e ausência de similaridade morfológica a outras linhagens em estudo pelo grupo de pesquisa.

Dentre os substratos avaliados (farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho, casca de arroz e bagaço de cana), a maior produção de  $\beta$ -glicosidase foi obtida em farelo de trigo (Tabela 1).

**Tabela 1:** Produção de  $\beta$ -glicosidase em diferentes substratos em cultivo em estado sólido pelos isolados, em 96 horas de cultivo, contendo 65% de umidade a 30°C para o isolado 12 e a 45°C para o isolado 45.

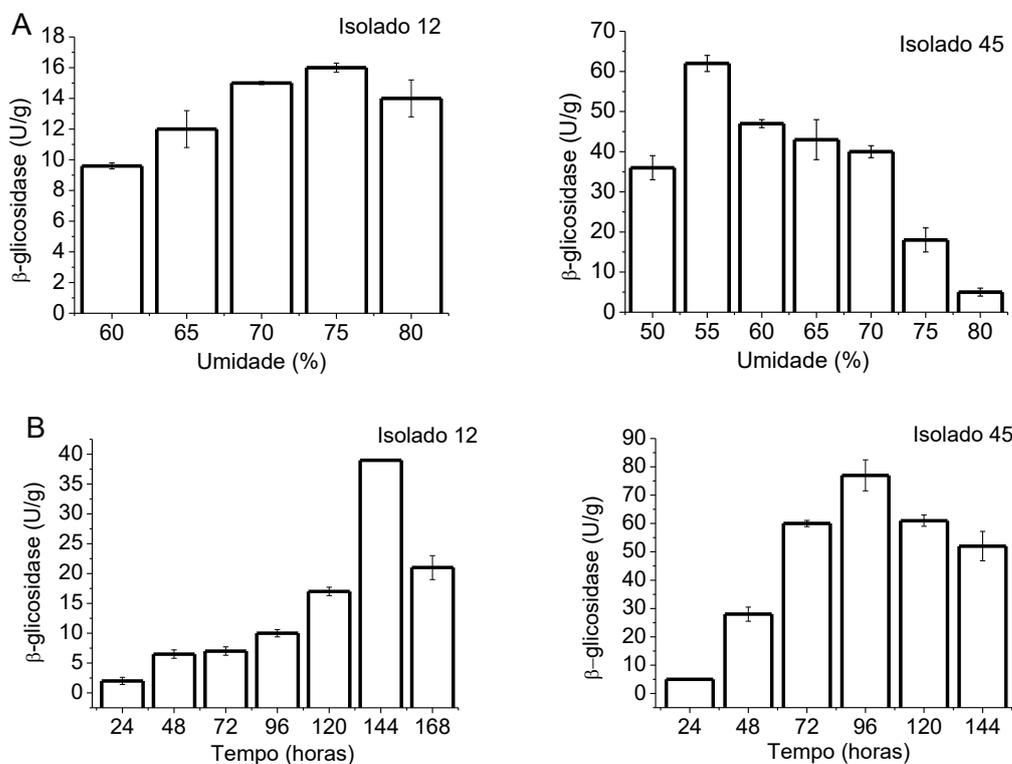
Substratos	Isolado 12	Isolado 45
	U/g	U/g
Farelo de trigo	11,6 $\pm$ 0,8	51 $\pm$ 0,75
Farelo de soja	3,1 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,4
Palha de milho	0	1,9 $\pm$ 0,95
Sabugo de milho	0	1,1 $\pm$ 0,05
Casca de arroz	0	0,25 $\pm$ 0,0
Bagaço de cana	0	1,7 $\pm$ 0,1

A maior produção de  $\beta$ -glicosidase foi de 11,6 U/g de substrato para o isolado 12 e de 51 U/g de substrato para o isolado 45. Ainda é possível observar que o isolado 45 apresentou potencial de crescimento e produção da enzima em todos os substratos avaliados, enquanto o isolado 12 só produziu  $\beta$ -glicosidase em farelo de trigo e soja, indicando que esta linhagem requer meios mais ricos nutricionalmente para o seu crescimento.

Trabalhos anteriores confirmam o farelo de trigo como excelente substrato para produção de  $\beta$ -glicosidase por distintas espécies fúngicas (LEITE et al., 2008; DESWAL et al., 2011; SILVA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2013; GARCIA et al., 2015). O farelo de trigo apresenta um equilíbrio adequado de fontes de carbono e nitrogênio, vitaminas do complexo B e elevada quantidade de celulose e hemicelulose, favorecendo o crescimento microbiano e a produção de enzimas (SUN et al., 2008; BRIJWANI et al., 2010; KILIKIAN et al., 2013).

A variação da umidade resultou em maior produção da enzima em farelo de trigo contendo 75% de umidade para o isolado 12 e 55% de umidade para o isolado 45. A maior produção de  $\beta$ -glicosidase foi obtida com 144 h para o isolado 12 (39 U/g de substrato ou 3,9 U/mL) e 96 h para o isolado 45 (77 U/g de substrato ou 7,7 U/mL). O

reduzido tempo de cultivo para produção da enzima pelo isolado 45 deve ser destacado, pois contribui positivamente para a redução do custo da enzima de interesse, favorecendo sua aplicação em larga escala (Figura 1).



**Figura 1:** Variações dos parâmetros de cultivo em estado sólido pelos isolados 12 e 45 em farelo de trigo. **A)** Produção de  $\beta$ -glicosidase em função da umidade inicial do meio. **B)** Produção de  $\beta$ -glicosidase em função do tempo de cultivo.

No estudo de DESWAL et al (2011), a máxima produção de  $\beta$ -glicosidase para *Fomitopsis sp.* foi de 47,5% de umidade. No entanto, qualquer aumento no nível de umidade em fermentação em estado sólido mostrou uma menor produção da enzima, o que pode ser atribuída, à troca gasosa limitada e à maior vulnerabilidade à contaminação bacteriana, enquanto a baixa umidade leva a uma solubilidade reduzida dos nutrientes.

O alto teor de umidade resulta em baixa porosidade no substrato e impede a penetração de oxigênio, enquanto o baixo teor de umidade pode levar a má acessibilidade de nutrientes, resultando em crescimento microbiano dificultado (HARGREAVES, 2008; SINGHANIA et al., 2009).

Após a otimização do processo de cultivo, a produção de  $\beta$ -glicosidase do isolado 12 foi aumentada de 11 para 39 U/g de substrato e do isolado 45 de 51 para 77 U/g de substrato.

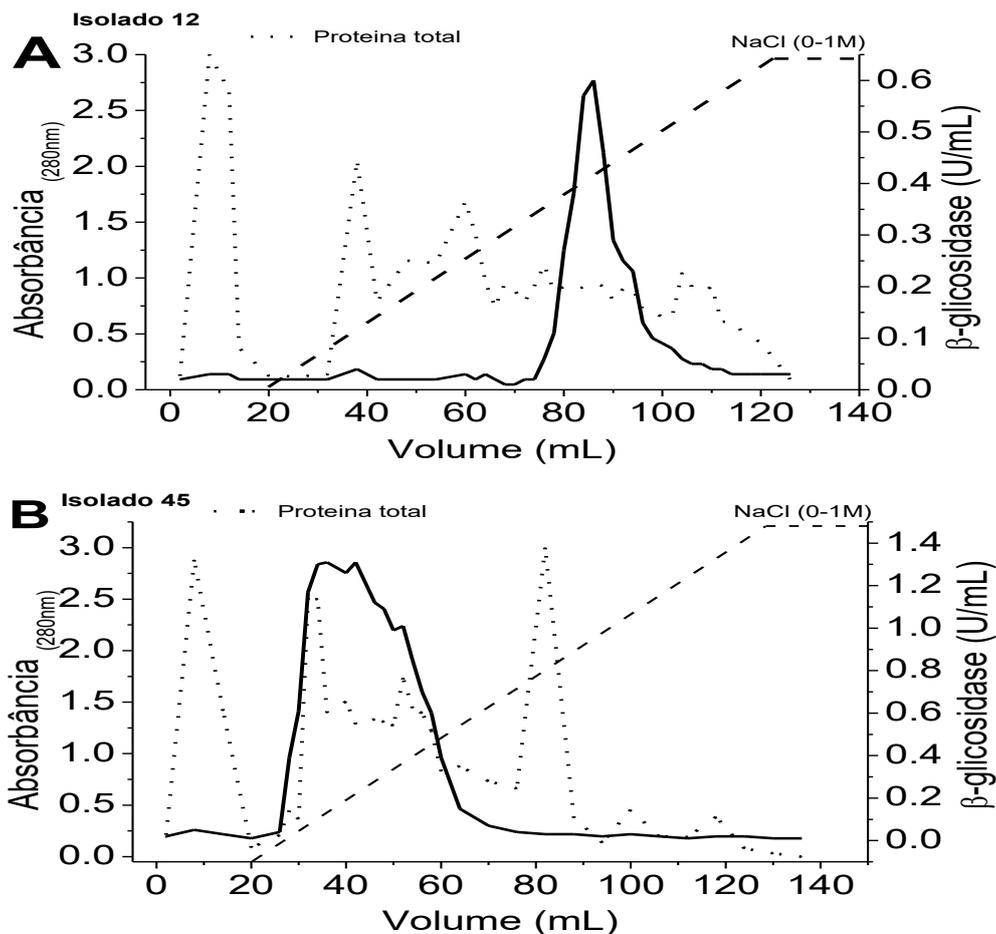
Dados da literatura apresentam valores de produção menores ou próximos dos descritos neste trabalho, corroborando assim para a validação e importância dos resultados descritos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Produção de  $\beta$ -glicosidase de diferentes linhagens fúngicas e em diferentes condições de cultivo.

<b>Linhagem</b>	<b>Substrato</b>	<b>Condição (FES)</b>	<b>Atividade <math>\beta</math>-glicosidase</b>	<b>Autor</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	60% e 72 horas	62,3 U/g	Pirota et al. (2015)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de trigo	80% e 24 horas	2,7 U/g	Pirota et al. (2014)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	60% e 96 horas	21,6 U/g	Dhillon et al. (2011)
<i>Trichoderma reesei</i>	Farelo de trigo	60% e 72 horas	2,2 U/g	Sukumaran et al. (2009)
<i>Fomitopsis sp.</i>	Farelo de soja	60% e 96 horas	69 U/g	Deswal et al. (2011)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Farelo de trigo	75% e 120 horas	13 U/g	Leite et al. (2008)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de trigo	60% e 72 horas	70 U/g	Leite et al. (2008)
Isolado 12	Farelo de trigo	75% e 144 horas	39 U/g	Este trabalho
Isolado 45	Farelo de trigo	55% e 96 horas	77 U/g	Este trabalho

## 5.2. Purificação parcial das $\beta$ -glicosidases produzidas

Os extratos enzimáticos obtidos nas condições ótimas de cultivo foram precipitados com 80% de etanol e posteriormente eluídos em cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose. O perfil cromatográfico demonstra o fracionamento das amostras em diferentes picos proteicos (quantificado por espectrofotometria a 280 nm), sendo encontrado apenas um pico com atividade de  $\beta$ -glicosidase, em ambos os perfis cromatográficos (Figura 2).



**Figura 2** - Perfil de eluição da  $\beta$ -glicosidase do isolado 12 e 45 em cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose fast flow. (tampão de eluição acetato 20 mM, pH 5,0; fluxo de 0,3 mL/min., gradiente salino 0-1 M de NaCl).

O fracionamento proteico observado confirma a eficiência da etapa cromatográfica para purificação parcial da enzima. As amostras com elevada atividade de  $\beta$ -glicosidase foram unidas e utilizadas nas etapas subsequentes de caracterização enzimática.

Após duas etapas de purificação (precipitação com etanol e cromatografia de troca iônica) foi obtido um rendimento de 16,3% para a  $\beta$ -glicosidase do isolado 12 e 28,3% para a  $\beta$ -glicosidase produzida pelo isolado 45.

A reduzida recuperação da enzima de interesse é comumente observada em processos de purificação proteica com números elevados de etapas. Geralmente, quanto maior for o processamento da amostra, menor será o rendimento do processo de purificação e maior será o custo da enzima de interesse, o que muitas vezes inviabiliza sua aplicação industrial.

No trabalho de Shen et al. (2012), a principal fração ativa da  $\beta$ -glicosidase do fungo termotolerante *Aspergillus fumigatus* apresentou um rendimento de final de

5,4%, após 4 etapas de purificação (precipitação com sulfato de amônio, permuta catiônica, filtração em gel e cromatografia por afinidade) até a homogeneidade.

A enzima a partir do sobrenadante de cultura do fungo mesófilo *Penicillium pinophilum* cultivado em palha de arroz apresentou um rendimento global de 12,3%, após 3 etapas de purificação (cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose, cromatografia de permuta iônica Mono-Q e cromatografia de hidroxiapatita) até a homogeneidade (JOO et al., 2010).

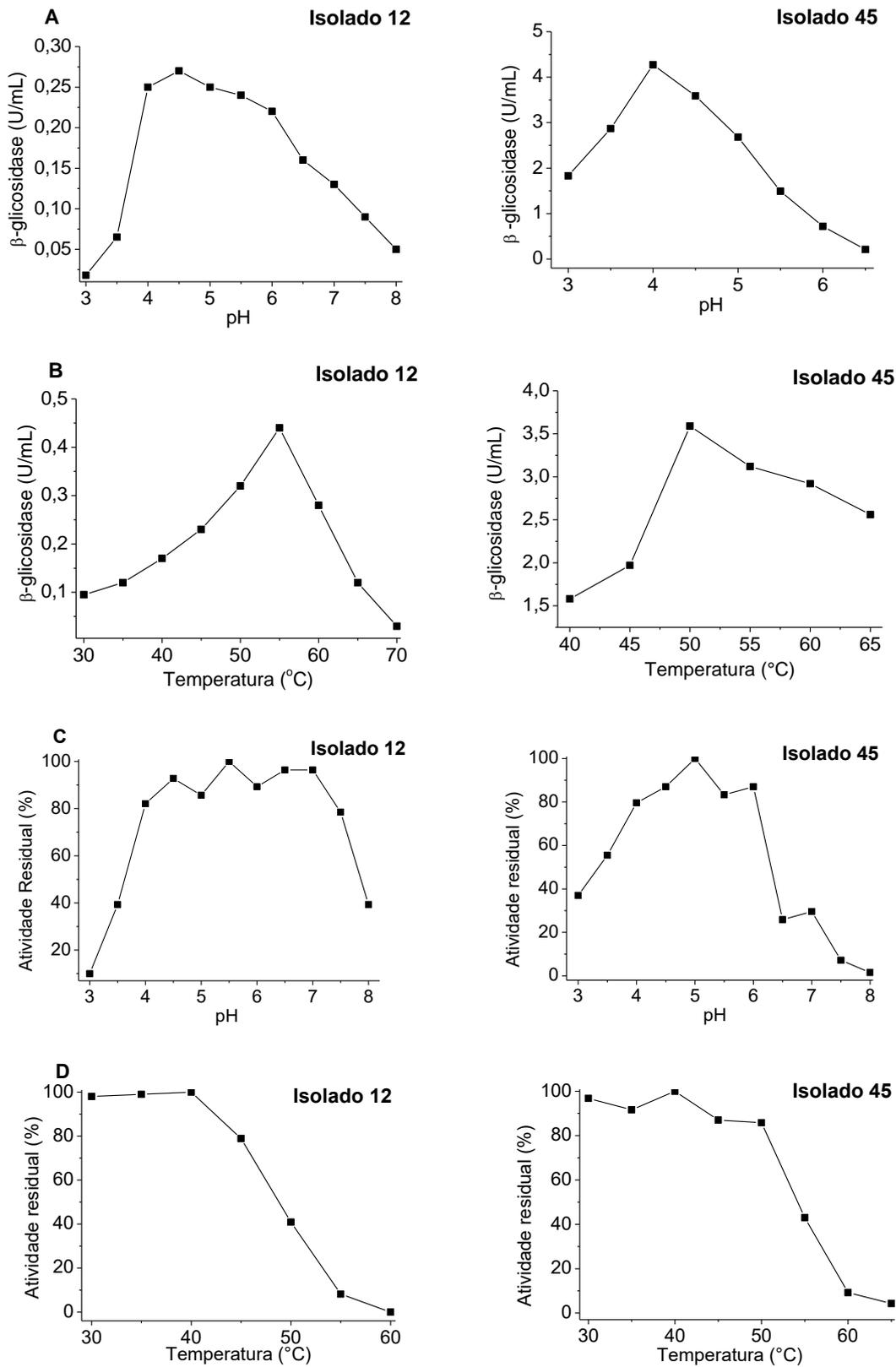
Kaur et al. (2007) descreveram em seus resultados que a  $\beta$ -glicosidase do fungo termófilo *Melanocarpus sp.* obteve 15,89% de rendimento final, após 3 etapas de purificação (ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose e cromatografia com poli tampão PBE-94) até a homogeneidade.

Irshad et al. (2013) relataram que a  $\beta$ -glicosidase do fungo mesófilo *Trichoderma viride* obteve 8,1% de rendimento final, após 3 etapas de purificação (fracionamento com sulfato de amônio, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel) até a homogeneidade.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo mostraram-se próximos ou melhores do que alguns estudos citados anteriormente, sendo importante ressaltar que neste trabalho a purificação foi parcial, ou seja, não foi até a homogeneidade, provavelmente se fosse realizado, os resultados poderiam ser ainda melhores.

### **5.3. Caracterização das $\beta$ -glicosidases parcialmente purificadas**

Os valores encontrados para pH e temperatura ótima da  $\beta$ -glicosidase parcialmente purificada do Isolado 12 e 45, foram de 4,5 e 55°C e 4,0 e 50°C respectivamente. A  $\beta$ -glicosidase parcialmente purificada do Isolado 12 apresentou uma faixa de estabilidade, com relação ao pH entre os valores 4,0-7,5, apresentando-se mais estável quando comparado ao isolado 45, que apresentou uma faixa de 4,0-6,0 (Figura 3).



**Figura 3** - Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das B-glicosidases produzidas pelo isolado 12 e isolado 45. A) pH ótimo; B) temperatura ótima; C) pH de estabilidade; D) temperatura de estabilidade.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os relatados na literatura. Bathia et al. (2002) e Eyzaguirre et al. (2005) relatam um bom desempenho das  $\beta$ -glicosidases em pH 4-5. Valores de pH muito menores que isso acarretam diminuição significativa da atividade enzimática. A maioria dos  $\beta$ -glicosidases fúngicas mostram pH ótimos variando de 4,0 a 6,5 e são geralmente estáveis durante um intervalo de pH amplo (MASHEWARI et al., 2000; BATHIA; MISHRA., 2002; YANG et al., 2008; BHIRI et al., 2008).

Diversos trabalhos na literatura relatam pH 4,0 como ótimo para  $\beta$ -glicosidases dos fungos *Mucor racemosus*, *Rhizomucor miehei* e *Rhizopus microsporus*, sugerindo caráter acidófilo para estas enzimas. (TAKO et al., 2010; KRISCH et al., 2012).

Krish et al. (2012), Takii et al. (2005) e Smaali et al. (2004) relatam em seus trabalhos que o pH ótimo no valor de 5,0 foi constatado para a ação de  $\beta$ -glicosidases purificadas dos fungos *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae* e *Sclerotinia sclerotiorum*, respectivamente.

No entanto, segundo Souza et al. (2010) a  $\beta$ -glicosidase purificada do fungo termófilo *Humicola insolens* mostrou máxima atividade a pH 6-6,5, contrastando com o resultado obtido neste trabalho.

Em outros trabalhos, as  $\beta$ -glicosidases de vários fungos termofílicos mostraram temperaturas ótimas variando de 55 a 75°C (KAUR et al., 2007; YANG et al., 2008).

No entanto, alguns valores da literatura diferem dos resultados encontrados para os isolados 12 e 45 com relação à temperatura ótima. Yeoman et al. (2010) relatam que alguns fungos mesófilos produzem  $\beta$ -glicosidases com temperatura ótima em torno de 60-75°C. Irshad et al. (2013) relatam que a temperatura ótima para o fungo mesófilo *Trichoderma viride* era 60°C.

Com relação à estabilidade ao pH das enzimas, Irshad et al. (2013) descrevem que a  $\beta$ -glicosidase purificada do fungo mesófilo *Trichoderma viride* foi estável em uma ampla faixa de pH 4,0 à 7,0 durante 1 h (período de tempo de incubação), confirmando os resultados encontrados neste trabalho.

Nossos resultados corroboram aos encontrados na literatura, pois segundo Souza et al. (2009) a enzima  $\beta$ -glicosidase purificada foi estável durante 24 horas a 48°C, na faixa de pH de 5,0-8,0.

Baffi et al. (2011) relatam em seu trabalho que a  $\beta$ -glicosidase da levedura *Sporidiobolus pararoseus* manteve-se estável ao pH em uma ampla faixa 3,0-9,0.

Com relação à termoestabilidade, o isolado 12 apresentou uma faixa de 30-45°C e houve perda maior que 50% da atividade inicial em 1 hora a 50°C. O Isolado 45 apresentou estabilidade na faixa de 30-50°C, sendo mais termoestável quando comparado ao fungo mesófilo.

Investigações sobre adaptação a temperatura são críticas para compreensão da vida em condições extremas, e para aplicações industriais de novos biocatalisadores em condições otimizadas. Em geral, apesar das semelhanças nas sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais, enzimas termófilas têm atividade catalítica menor do que os seus homólogos mesófilos quando submetidas a baixas temperaturas (FELLER., 2010; STERPONE; MELCHIONNA, 2011). No entanto, para manter suas estruturas tridimensionais em temperaturas mais elevadas, enzimas termófilas tendem a ter um maior número de interações não covalentes, como hidrofóbicas, eletrostáticas, iônicas e pontes de hidrogênio e geralmente também apresentam maior número de ligações covalentes como pontes dissulfeto, quando comparadas aos seus homólogos mesófilos (ZACCARDI et al., 2012).

Gomes et al. (2007) relatam que as enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria; temperaturas elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. Ainda, as enzimas extracelulares constituem importante modelo para entendimento dos mecanismos de termoestabilidade e de atividade em altas temperaturas, os quais são usados nos processos de engenharia de proteínas.

Trabalhos anteriores confirmam os dados obtidos para as duas enzimas estudadas. A  $\beta$ -glicosidase do fungo mesófilo *Trichoderma viride* foi estável ao calor até 60°C sem perder sua atividade original. (IRSHAD et al., 2013).

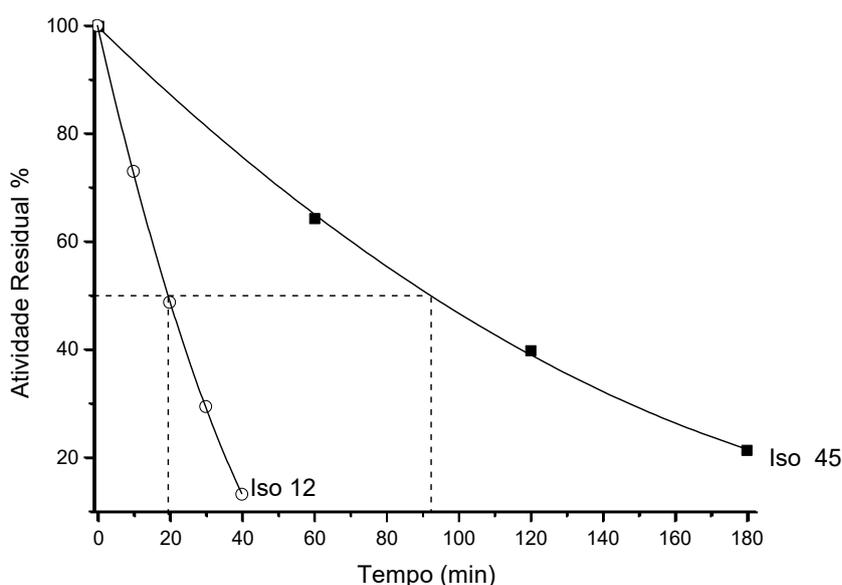
Souza et al. (2010) relatam em seu trabalho que a atividade enzimática foi aumentada gradualmente na faixa de 40 a 60°C, mas uma diminuição acentuada ocorreu a 65°C, com uma atividade residual de apenas 7% do máximo. Segundo os autores a  $\beta$ -glicosidase purificada do fungo termófilo *Humicola insolens* foi termoestável até 60 min, quando incubada a 50°C. Aos 60°C a atividade da enzima diminuiu rapidamente e de forma linear com o tempo de incubação, e uma atividade residual com cerca de 15% foi estimada após 20 min.

Baffi et al. (2011) relatam em seus estudos que a  $\beta$ -glicosidase da levedura *Sporidiobolus pararoseus* mostrou maior termoestabilidade a temperaturas baixas, mantendo 70% de atividade residual na faixa de 20-40°C, sendo um pouco abaixo dos resultados obtidos neste trabalho.

Portanto a termoestabilidade observada neste estudo, comparada aos relatados acima pode ser considerada de bom nível, e útil à aplicação industrial.

#### 5.4. Termoinativação irreversível das enzimas

A termoinativação irreversível das enzimas foi realizada a 50°C, em pH 5,0. Como pode ser observado na figura 4, o tratamento térmico a 50°C resultou em uma progressiva inativação de ambas enzimas, no entanto, a  $\beta$ -glicosidase produzida pelo microrganismo termófilo (isolado 45) apresentou maior termoestabilidade quando comparado com a enzima produzida pelo microrganismo mesófilo (isolado 12), confirmando os dados anteriormente descritos. A 50°C o tempo de meia vida  $t(1/2)$  da enzima do isolado 45 foi aproximadamente 90 minutos após a incubação, enquanto a do Isolado 12 após 19 minutos já apresentava 50% de sua atividade original. Quando calculada matematicamente pela Eq. 1, o  $t(1/2)$  da enzima do isolado 12 foi de 16,6 min e para a  $\beta$ -glicosidase do isolado 45 o  $t(1/2)$  foi de 95,1 min. Os resultados calculados pela equação, confirmam a percepção do que se observa na representação gráfica (Figura 4).



**Figura 4** – Atividade residual das  $\beta$ -glicosidasas parcialmente purificadas em função do tempo de incubação a 50°C.

A energia de ativação para desnaturação ( $E_a$ ) foi determinada pela regressão linear do plote do  $\ln K_d$  versus  $1/T$ , a  $E_a$  foi de  $89,9 \text{ KJ mol}^{-1}$  para a enzima do Isolado 12 e de  $246,7 \text{ KJ mol}^{-1}$  para a enzima do Isolado 45. A maior energia de ativação para desnaturação apresentada pela enzima produzida pelo isolado 45 confirma a maior estabilidade estrutural da enzima, indicando a necessidade de mais energia para iniciar o processo de desnaturação, comparado a enzima produzida pelo isolado 12. A  $\beta$ -glicosidase do isolado 45 apresentou valores mais elevados de  $\Delta G$  e  $\Delta H$ , quando comparado com a enzima do Isolado 12 (tabela 3).

**Tabela 3:** Parâmetros termodinâmicos de inativação das  $\beta$ -glicosidasas realizado a  $50^\circ\text{C}$ . O  $\Delta G$  foi calculado com Eq. (2) e  $\Delta H$  com Eq. (3).

Parâmetros	t (1/2) - min	$\Delta G$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (KJ mol <sup>-1</sup> )
<b>Isolado 12</b>	16,6	98,8	87,3
<b>Isolado 45</b>	95,1	103,5	244,1

Neste trabalho o  $\Delta G$  apresentou valores positivos, portanto o processo é denominado endergônico, processos não espontâneos sendo necessário fornecer energia para que a reação ocorra. Para desnaturação da enzima do isolado 45 foi necessário fornecer mais energia para modificar a estrutura terciária da enzima e conseqüentemente inativá-la, quanto maior o  $\Delta G$ , maior a estabilidade da enzima. Isso significa que para sair de sua forma nativa a enzima do isolado 45 foi mais resistente comparado à enzima do isolado 12 (RIAZ et al., 2007; MEHMOOD et al., 2014).

O mesmo ocorreu para o  $\Delta H$ , que é a entalpia, ou seja, o calor trocado em uma reação, os valores apresentaram-se como positivos, portanto, indicou que a reação absorveu calor do sistema. A proteína do isolado 45 absorveu uma quantidade maior de calor do sistema para desorganizar suas ligações não covalentes, desconformando sua estrutura molecular e perdendo a sua atividade biológica. Os valores elevados de  $\Delta H$  confirmam a maior estabilidade estrutural da  $\beta$ -glicosidase do fungo termófilo (MEHMOOD et al., 2014).

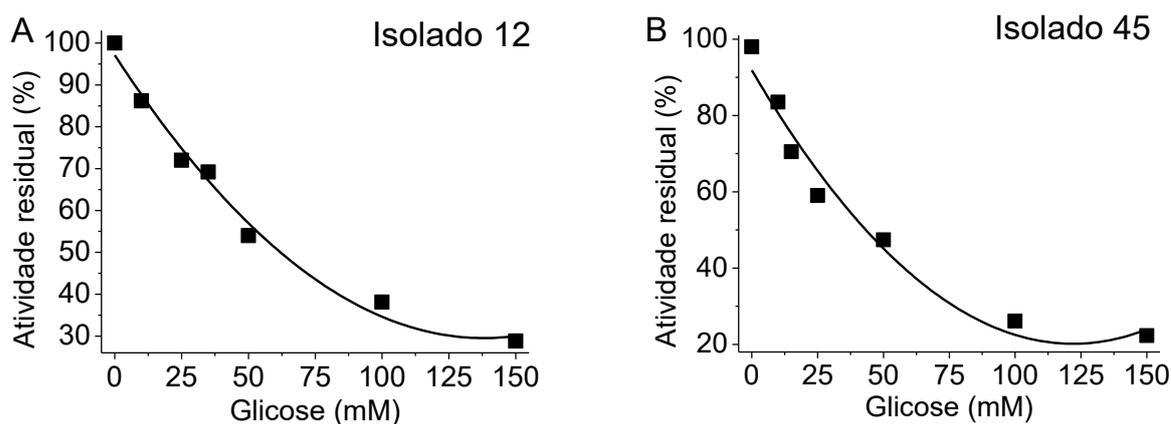
Trabalhos anteriores correlacionam maior estabilidade estrutural proteica com valores maiores de  $\Delta G$  e  $\Delta H$ , confirmando os resultados obtidos no presente trabalho (LEITE et al., 2007; MEHMOOD et al., 2014.)

## 5.5. Efeito de glicose sobre a atividade das enzimas

Diferentes concentrações de glicose foram adicionadas na mistura de reação para avaliar o efeito desse monossacarídeo sobre a ação da enzima. Em concentrações próximas a 50 mM e 30 mM de glicose, as enzimas dos isolados 12 e 45 respectivamente, mantiveram aproximadamente 50% de sua atividade original (Figura 5).

A grande maioria das  $\beta$ -glicosidases microbianas apresenta inibição por glicose, sendo um dos principais problemas na utilização desta enzima na sacarificação de polissacarídeos vegetais.

Segundo Leite et al. (2008) as  $\beta$ -glicosidases de fungos mesófilo *Aureobasidium pullulans* e o termófilo *Thermoascus aurantiacus* foram fortemente inibidas em concentrações de 5% de glicose, sendo que nenhuma atividade enzimática foi observada em ambas as enzimas.



**Figura 5** - Efeito da glicose sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidases produzidas pelas linhagens selecionadas.

As  $\beta$ -glicosidases produzidas pelos isolados 12 e 45 apresentaram reversibilidade à inibição por glicose, quando a concentração do substrato foi elevada para a mesma concentração do inibidor (Tabelas 4 e 5). A reversibilidade da inibição pelo aumento da concentração do substrato é típica de inibição competitiva (LEITE et al., 2008; GARCIA et al., 2015). Nesse tipo de inibição o inibidor (glicose) e o substrato competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, o sítio ativo. O aumento na concentração de substrato favorece a ligação desse ao sítio ativo, revertendo o efeito inibidor gerado pela glicose (KRISCH et al., 2012).

**Tabela 5** - Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNPβG) e inibidor do isolado 12.

<b>Enzima</b>	<b>At. Residual (%) PNPG – 2 mM</b>	<b>At. Residual (%) PNPG – 2 mM Glicose – 50 mM</b>	<b>At. Residual (%) PNPG – 50mM Glicose – 50 Mm</b>	<b>Tipo de inibição</b>
<b>Isolado 12</b>	100	55,2	109,6	Competitiva

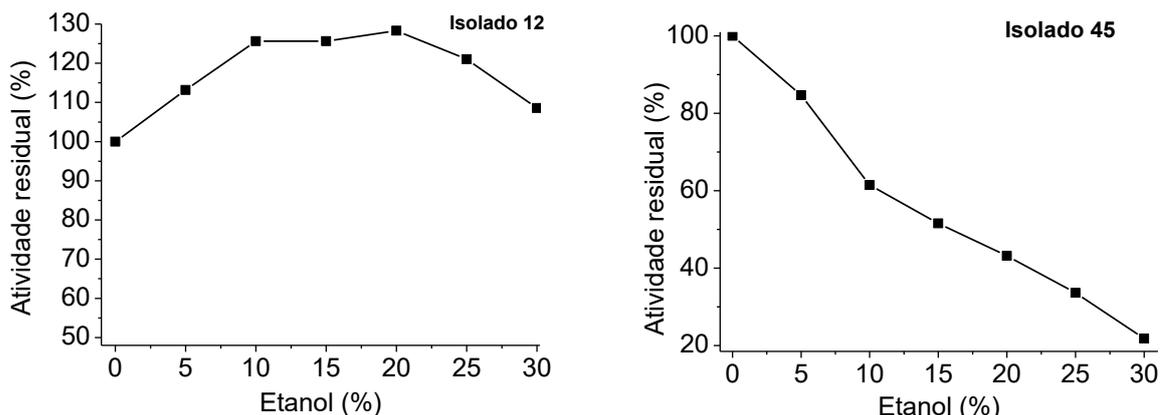
**Tabela 6** - Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNPβG) e inibidor do isolado 45.

<b>Enzima</b>	<b>At. Residual (%) PNPG – 2 mM</b>	<b>At. Residual (%) PNPG – 2 mM Glicose – 50 mM</b>	<b>At. Residual (%) PNPG – 25 mM Glicose – 25 mM</b>	<b>Tipo de inibição</b>
<b>Isolado 45</b>	100	46,4	102,6	Competitiva

Entre as alternativas para superar a inibição provocada pela glicose sobre as β-glicosidasas destaca-se a remoção desses monossacarídeos pela fermentação alcoólica através do processo denominado sacarificação e fermentação simultânea (SSF), processo que converte os açúcares liberados pela sacarificação da celulose em etanol por meio de microrganismos fermentadores, ambos ocorrendo simultaneamente. No entanto, as enzimas obrigatoriamente deverão tolerar a presença de etanol no meio reacional (SUN; CHENG., 2002; DAROIT, 2007).

### **5.6. Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas**

O efeito de etanol sobre a atividade de β-glicosidase foi estudado, através da determinação da atividade de pβNPG na presença de 0-30% de etanol (Figura 6). Na presença do etanol, foi observado um aumento na atividade da enzima do isolado 12, onde o etanol estimulou a atividade de β-glicosidase em concentrações de 5 a 30%. Para o isolado 45, com uma concentração de 15 % de etanol, a atividade residual apresentou-se em 50%.



**Figura 6** – Efeito do etanol sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidases produzidas pelas linhagens selecionadas.

O aumento do potencial catalítico pelo etanol está associado com a atividade de transglicosilação ou glicosiltransferase, onde o etanol pode agir como acceptor para o cation glicosil intermediário, durante a hidrólise do substrato. A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através da mesma rota bioquímica, diferindo apenas a natureza do acceptor final (BHATIA et al., 2002; KRISCH et al., 2012).

A tolerância ao etanol observado para as enzimas é desejável em processos de sacarificação e fermentação simultânea, uma vez que a enzima coexiste com etanol no reator. Dessa forma  $\beta$ -glicosidases tolerantes a etanol apresentam aplicabilidade para geração de etanol a partir de biomassa vegetal, além de serem apreciadas em processos de vinificação, potencializando o conteúdo aromático de vinhos finos (BAFFI et al., 2011; KARNAOURI et al., 2013).

A ativação por álcoois de cadeia curta foi anteriormente observado para  $\beta$ -glicosidase de *Thermoascus aurantiacus* (LEITE et al., 2008), *Paecilomyces thermophila* (YANG et al., 2008) e o termofílico *Melanocarpus* sp. (KAUR et al., 2007).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitem inferir que as linhagens selecionadas apresentam considerável potencial para produção de  $\beta$ -glicosidase, principalmente quando cultivadas em farelo de trigo, favorecendo a redução do custo de produção desses biocatalizadores, o que contribui para sua aplicação industrial. A enzima produzida pelo fungo termófilo 45 apresentou maior termoestabilidade estrutural comparada a  $\beta$ -glicosidase produzida pelo isolado 12 (mesófilo). As  $\beta$ -glicosidases apresentaram apreciáveis características no que se diz respeito ao efeito de etanol e glicose,

estimulando a aplicação das mesmas em processos de vinificação e obtenção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

## REFERÊNCIAS

- BAFFI, M. A.; TOBAL, T.; LAGO, J. H. G.; LEITE, R. S. R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. A novel  $\beta$ -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: characterization and application in winemaking. *Journal of Food Science*, v. 76, p. 997-1002, 2011.
- BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M.J.; AGOSIN, E.  $\beta$ -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanrijae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 1453-1459, 2003.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: Cloning, properties, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- BHIRI F, CHAABOUNI SE, LIMAM F, GHRIR R, MARZOUKI N. Purification and biochemical characterization of extracellular  $\beta$ -glucosidases from the hypercellulolytic Pol6 mutant of *Penicillium occitanis*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 82, p.149-169, 2008.
- BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixedculture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, vol. 45, no. 1, p. 120-128, 2010.
- CHEN, P.; FU, X.Y.; NG, T.B.; YE, X.Y. Expression of a secretory  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnology Letters*, v.33, p. 2475–2479, 2012.
- CHUN, J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp.4. *Food Chemistry*, v. 109, p. 278 –284, 2008.
- DAROIT, D.J. Caracterização de uma  $\beta$ -glicosidase de *Monascus purpureus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- DHILLON, G.S; OBEROI, H.S; KAUR,S; BANSAL, S; BRAR, S.K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*, v.34, p. 1160-1167, 2011.
- DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Formitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6065-6072, 2011.
- DIAS, E.S.; KOSHIKUMO, E.M.S.; SCHWAN, R.F.; DA SILVA, R. Cultivation of the mushroom *Pleurotus sajor-caju* in different agricultural residues. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 27, no. 6, p. 1363-1369, 2003.

EYZAGUIRRE, J.; HIDALGO, M.; LESCHOT, A.  $\beta$ -glucosidases from filamentous fungi: properties, structure, and applications. In *Handbook of Carbohydrate Engineering*; Taylor and Francis Group, LLC: Boca Raton, FL 33487, USA, p. 645–685, 2005.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONÇAÇVES, F. A.; DA PAZ, M. F.; LEITE, R. S. R. Production of  $\beta$ -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, p. 314-319, 2015.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v.30, p. 136-145, 2007.

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  $\beta$ -glucosidase producing *Lichtheimia ramosa* strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* v. 2, p.377-384, 2013.

IRSHAD, M., ANWAR, Z.; RAMZAN, M.; MAHMOOD, Z.; NAWAZ, H. Characterization of purified  $\beta$ -glucosidase produced from *Trichoderma viride* through bio-processing of orange peel waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 4, p. 941-944, 2013.

JOO, AH. R.; JEYA, M.; LEE, K. MI.; MOON, H. J.; KIM, Y. S.; LEE, J. K. Production and characterization of  $\beta$  1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 851-858, 2010.

JORGENSEN H, VIBE-PEDERSEN J, LARSEN J, FELBY C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering.*, v. 96, p. 862–870, 2007.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; PASCHOS, T.; TAOUKI, L.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3  $\beta$ -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *Peer J*, v. 1 p.46, 2013.

KAUR, J.; CHADHA, B.S.; KUMAR, B.A.; SAINI, H.S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 74–81, 2007.

KILIKIAN, B. V.; AFONSO, L. C.; SOUZA, T.F.C.; FERREIRA, R. G.; PINHEIRO, I. R. Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, p. 279-286, 2013.

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

KRISHNA, C. Solid state fermentation systems-an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 25, p. 1–30, 2005.

- LEITE, R.S.R.; ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 391 – 395, 2008.
- MEHMOOD, M.A.; SHAHID, I.; HUSSAIN, K.; LATIF, F.; RAJOKA, M.I. Thermodynamic properties of the  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga maritima* extend the upper limit of thermophilicity. *Protein & Peptide Letters*. v. 21, p. 1282-1288, 2014.
- OLIVEIRA, L.G.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, v. 95, p. 49-54, 2013.
- PALMA-FERNANDEZ, E.R.D.; Gomes, E.; Da-Silva, R. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miede. *Folia microbiologica*, v. 47, p. 685-690, 2002.
- PIROTA, R.D.P.B.; DELABONA, P.S.; FARINAS, C.S. Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Using Enzyme Extract and Whole Solid-state Fermentation Medium of Two Newly Isolated Strains of *Aspergillus oryzae*. *Chemical Engineering*, v. 38, p.259-264, 2014.
- RIAZ, M.; PERVEEN, R.; JAVED, M.R.; NADEEM, H.; RASHID, M. H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola sp.* *Enzyme and Microbial Technology*. v.41, p. 558-564, 2007.
- SHEN, Q.; LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y. Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories*, 11: 25, 2012.
- SILVA, L. H.; CELEGHINI, R.M.S.; CHANG, Y.K. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chemistry*, v. 128, p. 640-644, 2011.
- SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G.. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 1-9, 2013.
- SMAALI, M.I., GARGOURI, M., LEGOY, M.D., MAUGARD, T., FARID, L., MARZOUKI, N. A  $\beta$ -glucosidase from *Sclerotinia sclerotiorum*: biochemical characterization and use in oligosaccharide synthesis. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. p. 112, 63–78, 2004.
- SORENZEN, A.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S.; AHRING, B.K. Fungal  $\beta$ -glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Journal Biomolecules*, v. 3, p. 612-631, 2013.

SOUZA, F.H.M.; NASCIMENTO, C.V.; ROSA, J.C.; MASUI, D.C.; LEONE, F.A.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 272–278, 2010.

STERPONE F., MELCHIONNA, S. Thermophilic proteins: insight and perspective from in silico experiments. *Chemical. Soc. Ver.* 2011.

SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, p. 421-424, 2009.

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

SUN X, LIU Z, QU Y, LI X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 119-28, 2008.

TAKII, Y., IKEDA, K., SATO, C., YANO, M., SATO, T., KONNO, H. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Rhizopus oryzae* MIBA348. *International Journal of Biological Macromolecules* v.5, p. 11–16, 2005.

TAKO M, FARKAS E, LUNG SZ, KRISCH J, VAGVOLGYI CS, PAPP T. Identification of acid- and thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase activities in Zygomycetes fungi. *Acta Biologica Hungarica*, v.61, p.101-110, 2010.

VILLENA, M.A.; IRANZO, J.F.U.; PÉREZ, A.I.B.  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 420–425, 2007.

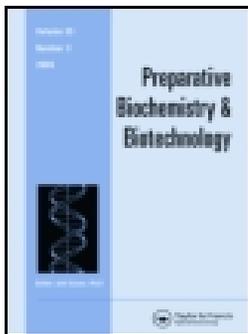
YANG S, QIAOJUAN Y, JIANG Z, FAN G,WANG L. Biochemical characterization of a novel thermostable beta-1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Paecilomyces thermophila*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 5345–5351, 2008.

YEOMAN, C.J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C.M.; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Advances Applied Microbiology*, v. 70, p. 1–55, 2010.

ZACCARDI, M.; MANNWEILER, O.; BOEHR, D. D. Differences in the catalytic mechanisms of mesophilic and thermophilic indole-3-glycerol phosphate synthase enzymes at their adaptive temperatures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 418, p. 324-329, 2012.

ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A.  $\beta$ -glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS Microbiology Letters*, v. 240, p. 137-143, 2004.

ZHANG, Y.H. P.; LYND, L. R. TOWARD. An aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulase systems. *Biotechnology Bioenergy*, 88, p. 797-824, 2004.



## Catalytic and thermodynamic properties of $\beta$ -glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssochlamys spectabilis*

Tobias Pereira de Morais, Paula Mirella Gomes Barbosa, Nayara Fernanda Lisboa Garcia, Nathália Gonsales da Rosa-Garzon, Gustavo Graciano Fonseca, Marcelo Fossa da Paz, Hamilton Cabral & Rodrigo Simões Ribeiro Leite

To cite this article: Tobias Pereira de Morais, Paula Mirella Gomes Barbosa, Nayara Fernanda Lisboa Garcia, Nathália Gonsales da Rosa-Garzon, Gustavo Graciano Fonseca, Marcelo Fossa da Paz, Hamilton Cabral & Rodrigo Simões Ribeiro Leite (2018): Catalytic and thermodynamic properties of  $\beta$ -glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssochlamys spectabilis*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, DOI: [10.1080/10826068.2018.1509083](https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1509083)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1509083>



Published online: 10 Oct 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Catalytic and thermodynamic properties of $\beta$ -glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssoschlamys spectabilis*

Tobias Pereira de Moraes<sup>a</sup> , Paula Mirella Gomes Barbosa<sup>a</sup> , Nayara Fernanda Lisboa Garcia<sup>a</sup> ,  
Nathália Gonsales da Rosa-Garzon<sup>b</sup> , Gustavo Graciano Fonseca<sup>c</sup> , Marcelo Fossa da Paz<sup>a</sup> ,  
Hamilton Cabral<sup>b</sup> , and Rodrigo Simões Ribeiro Leite<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Laboratory of Enzymology and Fermentation Processes, Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados (FCBA/UFGD), Dourados, MS, Brazil; <sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil; <sup>c</sup>Laboratory of Bioengineering, Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados (FCBA/UFGD), Dourados, MS, Brazil

### ABSTRACT

The objective of the present study was to optimize parameters for the cultivation of *Lichtheimia corymbifera* (mesophilic) and *Byssoschlamys spectabilis* (thermophilic) for the production of  $\beta$ -glucosidases and to compare the catalytic and thermodynamic properties of the partially purified enzymes. The maximum amount of  $\beta$ -glucosidase produced by *L. corymbifera* was 39 U/g dry substrate (or 3.9 U/mL), and that by *B. spectabilis* was 77 U/g (or 7.7 U/mL). The optimum pH and temperature were 4.5 and 55 °C and 4.0 and 50 °C for the enzyme from *L. corymbifera* and *B. spectabilis*, respectively.  $\beta$ -Glucosidase produced by *L. corymbifera* was stable at pH 4.0–7.5, whereas the enzyme from *B. spectabilis* was stable at pH 4.0–6.0. Regarding the thermostability,  $\beta$ -glucosidase produced by *B. spectabilis* remained stable for 1 h at 50 °C, and that from *L. corymbifera* was active for 1 h at 45 °C. Determination of thermodynamic parameters confirmed the greater thermostability of the enzyme produced by the thermophilic fungus *B. spectabilis*, which showed higher values of  $\Delta H$ , activation energy for denaturation ( $E_a$ ), and half-life  $t_{(1/2)}$ . The enzymes were stable in the presence of ethanol and were competitively inhibited by glucose. These characteristics contribute to their use in the simultaneous saccharification and fermentation of vegetable biomass.

### KEYWORDS

Enzymatic thermostability; partial purification of  $\beta$ -glucosidases; solid-state cultivation; thermodynamic parameters

## Introduction

Cellulases are the third most industrially used enzymes in the world owing to their potential application in several processes, such as extraction and clarification of juices and beverages, animal feed production, textile industry, and in the production of ethanol from vegetable biomass.<sup>[1]</sup>

$\beta$ -glucosidases are enzymes that catalyze the hydrolysis of cellobiose, a glucose dimer resulting from the activity of cellulolytic enzymes on cellulose and release glucose as the main product, which can be converted to ethanol by fermentative processes.<sup>[2]</sup> However, most microbial  $\beta$ -glucosidases show low specificity to cellobiose and can act on different glycosidic substrates. This characteristic allows their use in different industrial processes, primarily in the food and beverage industries.<sup>[3]</sup>

Microbial  $\beta$ -glucosidases are used to hydrolyze glycosylated terpenes found in grapes, increasing the volatility of these compounds, which enhances the aromatic composition of juices and wines.<sup>[4]</sup> Furthermore,  $\beta$ -glucosidases can also be used to deglycosylate isoflavones present in soy, facilitating the absorption of these compounds by the human

intestine and thus contributing to the elaboration of functional foods derived from soy.<sup>[5]</sup> However, for using  $\beta$ -glucosidases at the industrial scale, problems such as the high cost of production, low-structural stability of enzymes, and inhibition by final product need to be addressed.<sup>[6]</sup>

To overcome the above-mentioned problems, several studies are aimed towards the selection of microbial strains with the potential for the production of  $\beta$ -glucosidase in low-cost culture media.<sup>[3,7,8]</sup>

In this context, agro-industrial residues have been used as substrates for the cultivation of filamentous fungi in solid-state for the production of the industrial enzyme, thus aiming to reduce the final cost of these biocatalysts.<sup>[6,9]</sup>

Recently, our research group isolated 2 fungal strains with potential for  $\beta$ -glucosidase production in low-cost media; the strains were identified as *Lichtheimia corymbifera* and *Byssoschlamys spectabilis*. Few reports describing  $\beta$ -glucosidase production by these microorganisms and their catalytic properties stimulated the development of the present work. This study was designed to optimize the production of  $\beta$ -glucosidase by the solid-state cultivation of the fungi *L. corymbifera* (mesophile) and *B. spectabilis* (thermophile)

using agro-industrial residues and to compare the catalytic and thermodynamic properties of the partially purified enzymes.

## Materials and methods

### Microorganisms

The filamentous fungi *Lichtheimia corymbifera* (mesophilic), and *Byssoschlamys spectabilis* (thermophilic) were used for this study. *L. corymbifera* was isolated from composting piles and *B. spectabilis* was isolated from decomposing vegetable material from Cerrado, both located in the municipality of Dourados-MS, Brazil. The strains were identified by the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms - CBMAI/UNICAMP, Campinas - SP, Brazil.

The microorganisms were identified using sequencing of molecular markers. The ITS1 and ITS2 regions were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then used for the identification of *L. corymbifera*. Genomic DNA was isolated and the D1/D2 region of the large subunit ribosomal gene was sequenced for the identification of *B. spectabilis*. Contigs obtained upon sequencing were used to compare homologous sequences from the GenBank and CBS databases.

### $\beta$ -glucosidase production by solid-state cultivation

The enzymes were produced by fungi cultivation in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 5 g of the substrate moistened with nutrient solution (consisting of 0.1% ammonium sulfate, 0.1% magnesium sulfate, and 0.1% ammonium nitrate; w/v). The material was autoclaved at 121 °C for 20 min. The fermentation process with *L. corymbifera* and *B. spectabilis* was performed at 30 °C and 45 °C, respectively. Cultivation parameters were evaluated to determine optimum conditions for  $\beta$ -glucosidase production, such as different types of substrates: rice peel, sugarcane bagasse, soy bran, wheat bran, corn cob, and corn straw (previously washed and dried at 60 °C for 24 h); initial moisture of the medium (50–80%); and cultivation time (samples were taken every 24 h, up to 192 h). Optimum conditions for each step of the process were adopted for subsequent cultivation. The experiments were performed in triplicates and the results described represent their respective means.<sup>[8]</sup>

### Inoculum

The microorganisms were cultivated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 40 mL of inclined Sabouraud Dextrose Agar. The mesophilic fungus, *L. corymbifera*, was maintained for 48 h at 30 °C, and the thermophilic fungus *B. spectabilis* was maintained for 72 h at 45 °C. A fungal suspension was obtained by gently scraping the surface of the culture medium using 25 mL of sterilized nutrient solution (described in item 2.2). The fungi were inoculated in Erlenmeyer flasks containing production media previously

prepared by transferring 5 mL of the inoculum ( $10^6$  spores/g dry substrate).<sup>[8]</sup>

### Enzyme extraction

After growing the microorganisms in agro-industrial residues, 50 mL of distilled water was added to the Erlenmeyer flasks. The flasks were then incubated in an orbital shaker at 100 rpm for 1 h at 25 °C. Finally, the enzymatic extracts were filtered through a synthetic fabric (nylon) and centrifuged at  $1500 \times g$  for 5 min at 5 °C. The supernatants were considered as the enzymatic extracts and were used for subsequent assays.<sup>[6]</sup>

### Determination of $\beta$ -glucosidase activity

$\beta$ -Glucosidase activity was determined using 50  $\mu$ L of the enzymatic extract, 250  $\mu$ L of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5), and 250  $\mu$ L of 4 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NP $\beta$ G; Sigma). The reaction mixture was incubated at 50 °C for 10 min. The enzymatic reaction was stopped using 2 mL of 2 M sodium carbonate. The *p*-nitrophenol released was spectrophotometrically quantified at 410 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release 1.0  $\mu$ mol of *p*-nitrophenol per minute of reaction.<sup>[4]</sup>

### Partial purification of $\beta$ -glucosidases

#### Protein precipitation with ethanol

For precipitation of the enzyme from the extract, ethanol (−18 °C) was added to the samples previously refrigerated at 5 °C with slight agitation, until 80% saturation was achieved. The solution was incubated for 12 h in an ice bath; the precipitate was then separated from the supernatant by centrifugation at  $1500 \times g$  for 5 min at 5 °C. The precipitate was re-suspended in 20 mM sodium acetate buffer at pH 5.0.

#### Ion exchange chromatography

The concentrated enzymes were fractionated using an open-column containing 2 mL of Q-Sepharose fast flow anion exchanger (GE Healthcare®). The samples were eluted in 20 mM sodium acetate buffer pH 5.0, with a flow rate of 0.3 mL/min, followed by a linear gradient (0–1 M) of NaCl (50 column volumes), and fractions (3 mL) were collected. The protein elution profile was monitored using spectrophotometry at 280 nm. Fractions showing  $\beta$ -glucosidase activity were pooled and used for biochemical characterization.

### Biochemical characterization of partially purified $\beta$ -glucosidases

#### Effect of pH and temperature on $\beta$ -glucosidase activities

The optimum pH for the partially purified  $\beta$ -glucosidases was determined by measuring the activity of the enzymes at 50 °C using McIlvaine buffer at different pH values (3.0–8.0). The optimum temperature was determined by

quantification of the enzymatic activity at different temperatures (30–80 °C) and the optimum pH of each enzyme. pH stability of the enzymes was evaluated by incubating samples for 24 h at 25 °C at different pH values (3.0–8.0) using McIlvaine buffer. Thermostability was determined by incubating the enzymes for 1 h at different temperatures (30–80 °C). Residual activities were determined under optimum pH and temperature of each enzyme.<sup>[8]</sup>

### Determination of thermodynamic parameters of $\beta$ -glucosidases

The kinetics of thermoinactivation were determined according to the method used by Tomazic and Klivanov.<sup>[10]</sup> Thermoinactivation was monitored as a function of time at different temperatures. The enzyme produced by *L. corymbifera* was incubated at 45, 50, and 55 °C, respectively, and aliquots (0.5 mL) were taken as follows: every 30 min up to 120 min; every 10 min up to 60 min, and every 10 min up to 40 min, respectively.  $\beta$ -glucosidase from *B. spectabilis* was incubated at 50, 55, and 60 °C, respectively, and aliquots (0.5 mL) were taken every 60 min up to 300 min; every 10 min up to 60 min, and every 3 min up to 30 min, respectively. After heat treatment, the samples were maintained at 25 °C for 24 h. The 24 h interval ensured that the thermal inactivation of the enzyme was irreversible.<sup>[11]</sup>

The thermodynamic parameters of  $\beta$ -glucosidase denaturation were calculated according to the following equations:

$$t_{(1/2)} = 0,693/k_d \quad (1)$$

$$E_a = -R \text{ (slope)} \quad (2)$$

$$\Delta H = E_a - RT \quad (3)$$

The thermoinactivation rate coefficient ( $k_d$ ) was determined using linear regression from the plot of the natural logarithm of residual activity ( $\ln r_a$ ) versus the incubation time in minutes at the indicated temperatures.  $k_d$  is the absolute value of the straight line slope obtained from the linear regression of the data and corresponds to the thermoinactivation constant ( $\text{min}^{-1}$ ).  $R$  is the gas constant ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  is the absolute temperature ( $K$ ),  $\Delta H$  is the enthalpy in ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ), and  $E_a$  is the activation energy for denaturation ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ).

The activation energy for denaturation ( $E_a$ ) was determined by linear regression of the plot of the natural logarithm of  $k_d$  ( $\ln k_d$ ) versus the reciprocal of the absolute temperatures ( $1/T$ ,  $K$ ) in which the enzymes were irreversibly inactivated, which is the slope value of the straight line used in Eq. 2.

### Effect of glucose and ethanol on $\beta$ -glucosidase activities

To evaluate the effect of glucose on  $\beta$ -glucosidase activities, different concentrations (0–100 mM) of the monosaccharide were added to the reaction mixture. To determine the effect of ethanol on enzyme activities, the concentration of alcohol was varied (0–30%) in the reaction mixture. The assays were

performed using optimum pH and temperature for each enzyme.<sup>[6]</sup>

### Statistical analysis

All experiments were performed in triplicates, and the results are represented as the mean of three independent assays. Statistical analysis of the data was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test at a significance level of 1%. The statistical software ASSISTAT was used for the analyses.<sup>[12]</sup>

## Results and discussion

### $\beta$ -glucosidase production by solid-state cultivation

The highest amount of  $\beta$ -glucosidase produced was 11.6 U/g dry substrate for the fungus *L. corymbifera* and 51 U/g dry substrate for *B. spectabilis* when cultivated on wheat bran (Table 1). Previous studies have confirmed that wheat bran is an excellent substrate for the production of  $\beta$ -glucosidase by different fungal species.<sup>[6,8,13–15]</sup> Wheat bran presents an adequate balance of carbon and nitrogen sources, B complex vitamins, and high amounts of cellulose and hemicellulose, which favors microbial growth and enzyme production.<sup>[9,16–18]</sup> Thus, wheat bran was used as a substrate for subsequent assays.

To evaluate the influence of initial substrate moisture on enzyme production, the strains were cultivated on wheat bran with different initial moisture content. The highest  $\beta$ -glucosidase production was obtained when the initial moisture was in the range of 70–75% for *L. corymbifera* and 55% for *B. spectabilis* (Figure 1A). When the initial moisture content was adjusted to amounts greater than those described as optimal, there was a decrease in enzyme production.

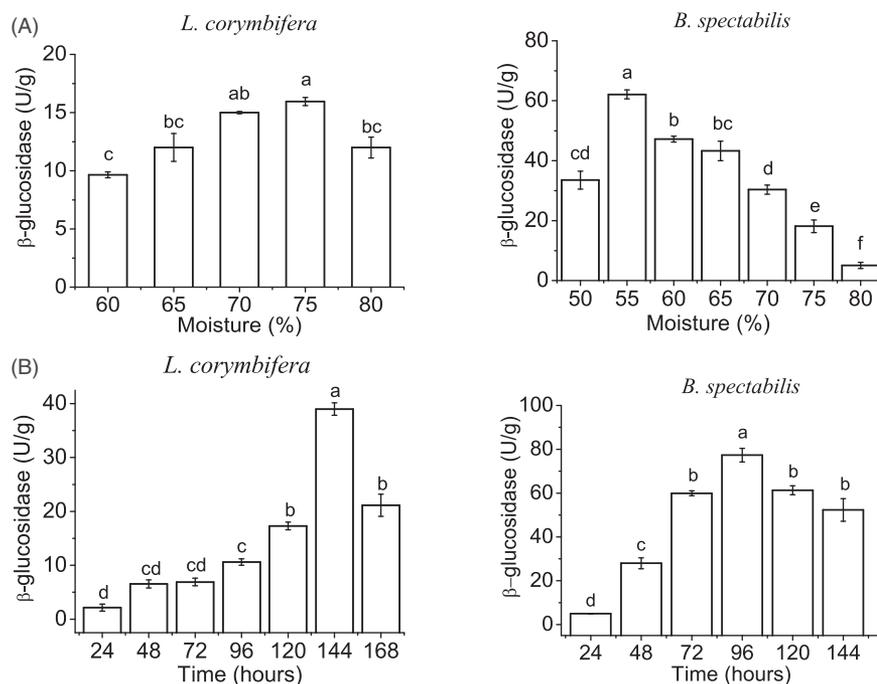
Excess moisture reduces the porosity of the culture medium and hinders thermal dissipation and gas exchange during solid-state cultivation. Moreover, low levels of moisture decrease nutrient solubility and lead to the accumulation of inhibitory metabolites, which disfavor microbial activity and enzymatic production.<sup>[19–21]</sup>

Several moisture values are described as optimal for the cultivation of filamentous fungi on agro-industrial residues for the production of  $\beta$ -glucosidase. Santos et al.<sup>[8]</sup> obtained

**Table 1.**  $\beta$ -glucosidase production by solid-state cultivation for 96 h with 65% initial moisture at 30 °C for *L. corymbifera* and 45 °C for *B. spectabilis* using several agro-industrial residues as substrates.

Substrate	<i>L. corymbifera</i> (U/g dry substrate)	<i>B. spectabilis</i> (U/g dry substrate)
Wheat bran	11.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	51 ± 0.75 <sup>a</sup>
Soy bran	3.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.4 <sup>b</sup>
Corn Straw	0	1.9 ± 0.95 <sup>b</sup>
Corn cob	0	1.1 ± 0.05 <sup>b</sup>
Rice peel	0	0.25 ± 0.0 <sup>c</sup>
Sugarcane bagasse	0	1.7 ± 0.1 <sup>b</sup>

The means with distinct letters indicate significant differences ( $p < 0.01$ ) according to Tukey's test.



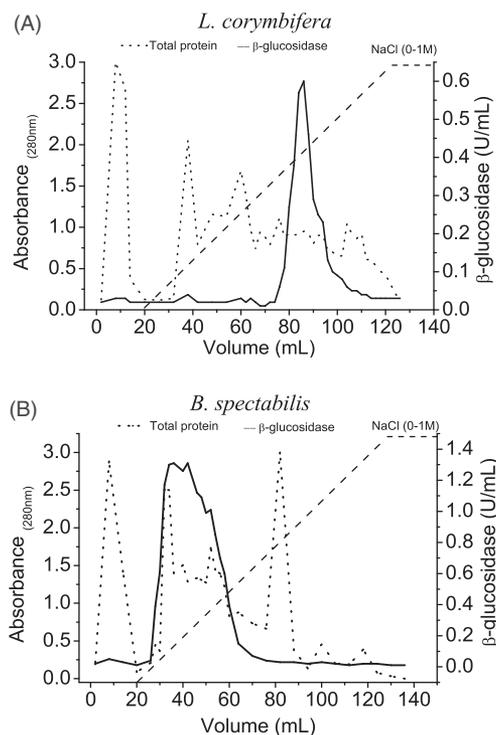
**Figure 1.** Evaluation of the cultivation parameters for the production of  $\beta$ -glucosidase by *L. corymbifera* and *B. spectabilis* by solid-state cultivation on wheat bran. (A) Influence of the initial moisture of the medium; (B) Influence of cultivation time. The means with distinct letters indicate significant differences ( $p < 0.01$ ) according to the Tukey's test.

the highest  $\beta$ -glucosidase production by *Gongronella butleri* in media with 55% initial moisture. Leite et al.<sup>[13]</sup> reported the production of  $\beta$ -glucosidase by the cultivation of the fungus *Thermoascus aurantiacus* on wheat bran with 60% initial moisture. Delabona et al.<sup>[7]</sup> described 50% as the ideal initial moisture content for  $\beta$ -glucosidase production by different species of *Aspergillus*. Garcia et al.<sup>[6]</sup> demonstrated higher production of  $\beta$ -glucosidase by *Lichtheimia ramosa* on wheat bran with 65% initial moisture.

Previous studies indicate that there is no ideal moisture standard for cultivating fungal strains for the production of  $\beta$ -glucosidase and that the optimum moisture value varies according to the substrate used and the fungal species cultivated. Therefore, the evaluation of this cultivation parameter is indispensable in studies of enzymatic production by solid-state cultivation.

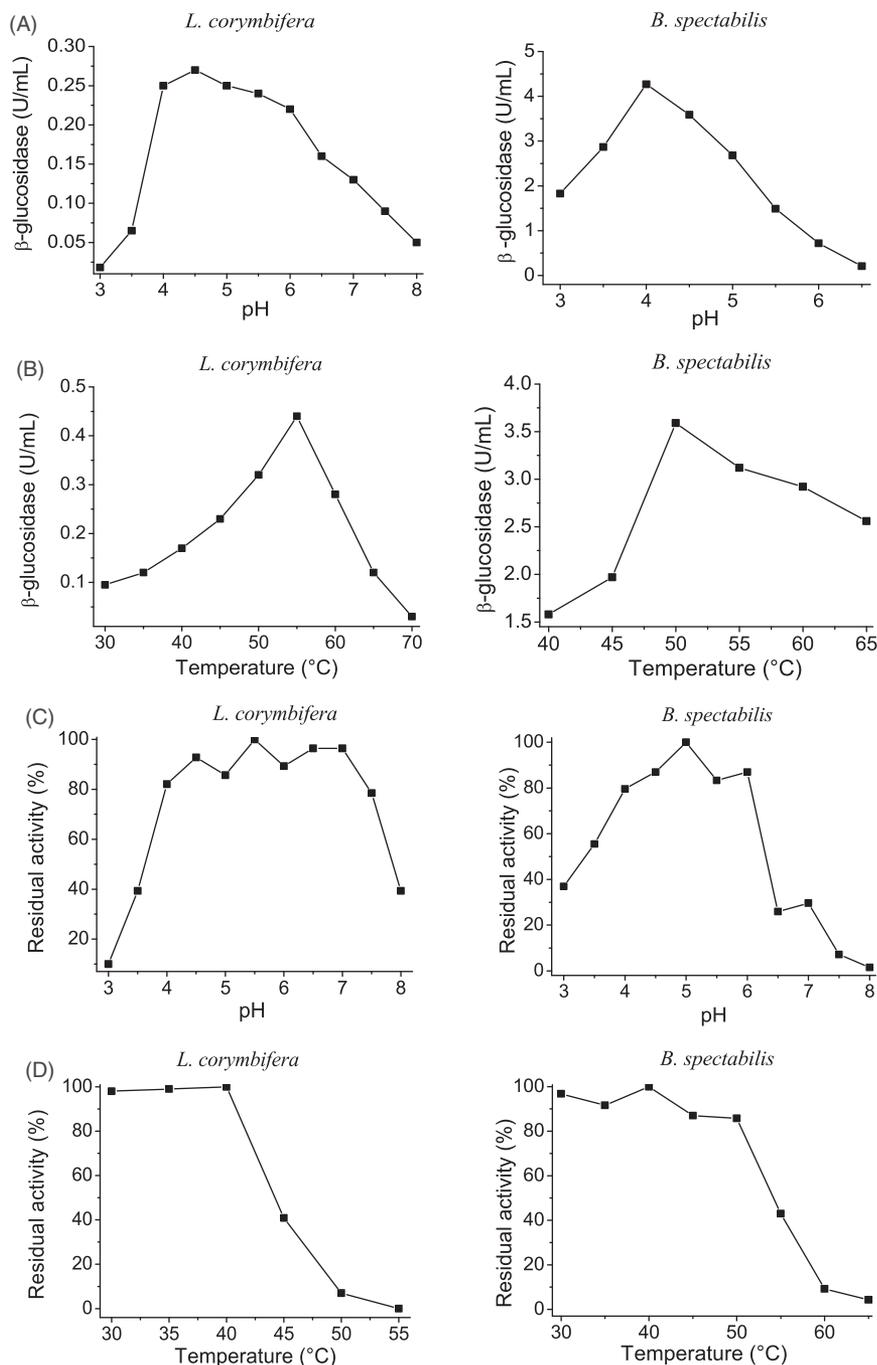
With respect to the cultivation time, the highest  $\beta$ -glucosidases productions were obtained at 144 h for *L. corymbifera* (39 U/g dry substrate or 3.9 U/mL) and at 96 h for *B. spectabilis* (77 U/g dry substrate or 7.7 U/mL). Shorter cultivation time for  $\beta$ -glucosidase production by *B. spectabilis* should be highlighted as it positively contributes to a reduction in the cost of the enzyme of interest, favoring its application in industrial processes (Figure 1B).

When compared with other fungal strains, the optimal cultivation time for  $\beta$ -glucosidase production by *B. spectabilis* is even more significant. Pereira et al.<sup>[22]</sup> reported maximum production of  $\beta$ -glucosidase at 192 h with the solid-state cultivation of the fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Deswal et al.<sup>[14]</sup> reported the highest production of  $\beta$ -glucosidase by the fungus *Fomitopsis* sp. at 360 h with wheat bran as the substrate.



**Figure 2.** Elution profile of proteins on ion exchange chromatography on a Q-Sepharose fast flow resin (20 mM, acetate elution buffer; pH, 5.0; flow, 0.3 mL/min; and 0–1 M salt gradient of NaCl). (A) *L. corymbifera* (B) *B. spectabilis*.

After optimization of the cultivation process, the production of  $\beta$ -glucosidase increased from 11 to 39 U/g and from 51 to 77 U/g dry substrate for *L. corymbifera* and *B. spectabilis*, respectively (Table 1 and Figure 1B), thereby confirming



**Figure 3.** Effect of pH and temperature on the activities of partially purified  $\beta$ -glucosidases produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis*. (A) optimal pH, (B) optimal temperature, (C) pH stability, and (D) temperature stability.

the importance of optimization of the cultivation process to obtain the enzyme of interest.

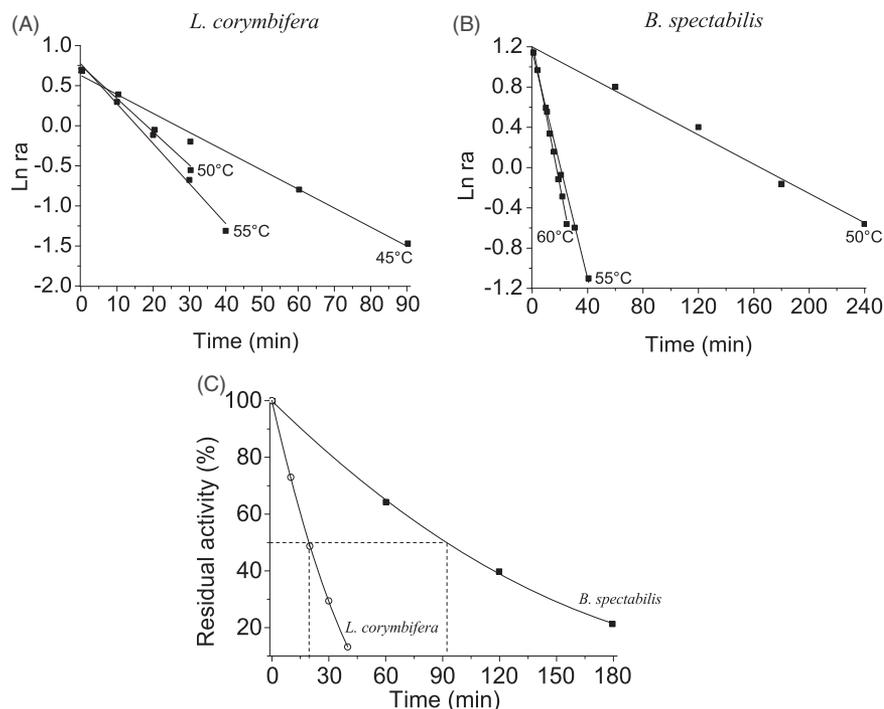
#### Partial purification of $\beta$ -glucosidases

The enzymatic extracts obtained under the optimal culture conditions were precipitated with 80% ethanol and subsequently, partially purified using ion exchange chromatography on Q-Sepharose. The chromatographic profile, as observed in Figure 2, demonstrated the fractionation of the samples at different protein peaks, as observed by spectrophotometry at 280 nm. Only one peak with  $\beta$ -glucosidase

activity was found for both processes (Figure 2A,B), thereby confirming the efficiency of the chromatographic step for partial purification of the enzymes.

SDS-PAGE analyses were not conclusive. Both samples showed a smear instead of protein bands with a satisfactory resolution. This electrophoretic profile was probably obtained due to the high degree of glycosylation of the constituent proteins in the sample, considering that the enzymes were exhaustively dialyzed. Previous reports support this hypothesis.<sup>[23]</sup>

Samples with high  $\beta$ -glucosidase activity were pooled and used for enzymatic characterization in subsequent steps.



**Figure 4.** (A) Linear regression of residual activity (Ln ra) versus the incubation time at 45 °C, 50 °C, and 55 °C for  $\beta$ -glucosidase from *L. corymbifera*; (B) Linear regression of residual activity (Ln ra) versus the incubation time at 50 °C, 55 °C, and 60 °C for  $\beta$ -glucosidase from *B. spectabilis*; (C) Thermostability at 50 °C of  $\beta$ -glucosidases produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis*.

The purification process (ethanol precipitation and ion exchange chromatography) resulted in a yield of 16.3% of  $\beta$ -glucosidase from *L. corymbifera* and of 28.3% from *B. spectabilis*.

Commonly, the recovery of the enzyme of interest is reduced during the purification process. In general, an increase in the purification steps lowers the yield of the purification process, thereby increasing the cost of the enzyme of interest, which makes the application of purified enzymes in industrial processes difficult.<sup>[24]</sup>

Liu et al.<sup>[25]</sup> purified  $\beta$ -glucosidase produced by *Aspergillus fumigatus* Z5 to homogeneity after four purification steps and obtained a final yield of 9.5%.  $\beta$ -glucosidase produced by *Penicillium pinophilum* was purified to homogeneity with a final yield of 12.3% after three purification steps.<sup>[26]</sup> Kaur et al.<sup>[27]</sup> purified  $\beta$ -glucosidase produced by *Melanocarpus* sp. after performing three purification steps; the authors reported a final yield of 15.89%. Irshad et al.<sup>[28]</sup> purified  $\beta$ -glucosidase produced by the fungus *Trichoderma viride* to homogeneity with a final yield of 8.1% after three purification steps.

#### Effect of pH and temperature on $\beta$ -glucosidase activities

The optimum values of pH and temperature for the partially purified  $\beta$ -glucosidases from *L. corymbifera* and *B. spectabilis* were 4.5 and 55 °C and 4.0 and 50 °C, respectively.  $\beta$ -glucosidase produced by *L. corymbifera* was stable after incubation for 24 h at pH 4.0–7.5 at 25 °C, and  $\beta$ -glucosidase produced by *B. spectabilis* was stable at pH 4.0–6.0 after incubation for 24 h at 25 °C (Figure 3C).

The results obtained in this study are in agreement with those previously reported. Most fungal  $\beta$ -glucosidases have optimum pH of 4.0–5.5 and are generally stable over a wide pH range.<sup>[6,8,29–31]</sup>

Previous studies report optimum temperatures between 40 and 75 °C for the fungal  $\beta$ -glucosidases. The wide range of optimum temperatures observed for these enzymes is probably associated with the growth temperature of the producing microorganisms and also with their enzymatic structures.<sup>[11,14,17]</sup>

The  $\beta$ -glucosidase from mesophilic fungus *L. corymbifera* presented optimum activity at a higher temperature (55 °C) compared to the enzyme produced by the thermophilic fungus *B. spectabilis* (50 °C). However, when incubated for 1 h at different temperatures, the  $\beta$ -glucosidase from *B. spectabilis* was more stable. This enzyme maintained about 90% of its initial catalytic activity after incubation for 1 h at 50 °C. The  $\beta$ -glucosidase from *L. corymbifera* was completely inactivated when subjected to the same heat treatment (Figure 3D).

Most of the enzymes produced by thermophilic microorganisms present higher thermostability compared to enzymes from mesophilic strains.<sup>[32,33]</sup> However, previous studies have reported the production of extremely thermostable enzymes by mesophilic microorganisms.<sup>[11,13]</sup>

Thus, previous results encouraged us to determine the thermodynamic parameters of these enzymes in order to understand the observed contrasting phenomenon.

#### Irreversible thermoinactivation of partially purified $\beta$ -glucosidases

The thermoinactivation of the  $\beta$ -glucosidases obeyed a first-order kinetic reaction, as determined by the linearity

observed in the graphical representation of the residual activity ( $\ln ra$ ) versus the time (min) of exposure to different temperatures used to determine the thermoinactivation constant ( $K_d$ ). The experiments showed  $r^2 > 0.98$ , which demonstrated the linearity of the thermal inactivation of both enzymes (Figure 4A,B). Previous studies reported first-order kinetics for thermoinactivation of  $\beta$ -glucosidase produced by *T. aurantiacus*, *Aureobasidium pullulans*, and *Aspergillus niger*.<sup>[13,34]</sup>

The thermoinactivation constant ( $K_d$ ) obtained at 50 °C for the enzyme from *L. corymbifera* (0.0417 min<sup>-1</sup>) was five times higher than that obtained for the enzyme produced by *B. spectabilis* (0.0073 min<sup>-1</sup>), indicating that denaturation of the  $\beta$ -glucosidase of mesophilic fungus occurs more rapidly compared to the enzyme from thermophilic fungus (Table 2). The same can be observed by comparing the half-life,  $t_{(1/2)}$ , obtained at 50 °C for both enzymes.  $\beta$ -glucosidase of *B. spectabilis* lost 50% of its original activity in approximately 90 min of incubation, whereas  $\beta$ -glucosidase of *L. corymbifera* lost half of its catalytic activity in 19 min (Figure 4C). When calculated using Eq. 1,  $t_{(1/2)}$  of the enzyme from *L. corymbifera* was 16.6 min and for the  $\beta$ -glucosidase from *B. spectabilis* was 94.9 min (Table 2). The values of  $t_{(1/2)}$  calculated using Eq. 1 are in agreement with the results represented graphically (Figure 4C), proving the reproducibility of the assays.

The activation energy for denaturation ( $E_a$ ) was determined by the linear regression of the plot of  $\ln K_d$  versus  $1/T$ . The activation energy ( $E_a$ ) was 89.9 KJ mol<sup>-1</sup> for the  $\beta$ -glucosidase produced by *L. corymbifera* and 246.7 KJ mol<sup>-1</sup> for the enzyme from *B. spectabilis*. The higher value of activation energy for denaturation ( $E_a$ ) for the enzyme produced by *B. spectabilis* confirms its higher structural stability, indicating the need for more energy to initiate the denaturation process compared to the enzyme produced by *L. corymbifera* (Table 2).

$\beta$ -glucosidase produced by *B. spectabilis* also showed a higher  $\Delta H$  (enthalpy) compared to the  $\beta$ -glucosidase

produced by *L. corymbifera*. Higher values of  $\Delta H$  confirm the higher structural stability of  $\beta$ -glucosidase produced by the thermophilic fungus,<sup>[35]</sup> indicating that the enzyme produced by *B. spectabilis* absorbed a higher amount of heat from the system to disorganize its molecular structure and to lose its biological activity. Previous work correlates protein structural stability with high values of  $\Delta H$ , confirming the results obtained in the present work.<sup>[11,35]</sup>

Thermostability is an extremely appreciable characteristic for the industrial application of an enzyme.<sup>[6]</sup> The increase in temperature reduces the viscosity of the medium and favors the solubility of substrates and products, resulting in increased reaction rates and reduced process time.<sup>[34]</sup>

In general, thermophilic enzymes tend to have a higher number of covalent bonds (disulfide bonds) and non-covalent interactions such as hydrophobic, electrostatic, ionic, and hydrogen bonds.<sup>[36]</sup> However, there exists no structural model that significantly differentiates a stable protein from a non-stable protein, i.e. small differences in the number of the bonds and interactions mentioned above can contribute effectively to the structural stability of a protein.<sup>[13,37]</sup>

### Effect of glucose on $\beta$ -glucosidase activities

Different concentrations of glucose were added to the reaction mixture to evaluate the effect of this monosaccharide on the action of the enzymes. Both enzymes were strongly inhibited by glucose, and approximately 50% of their original activities were recovered at concentrations of 50 mM and 30 mM glucose for the  $\beta$ -glucosidase produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis*, respectively (Figure 5).

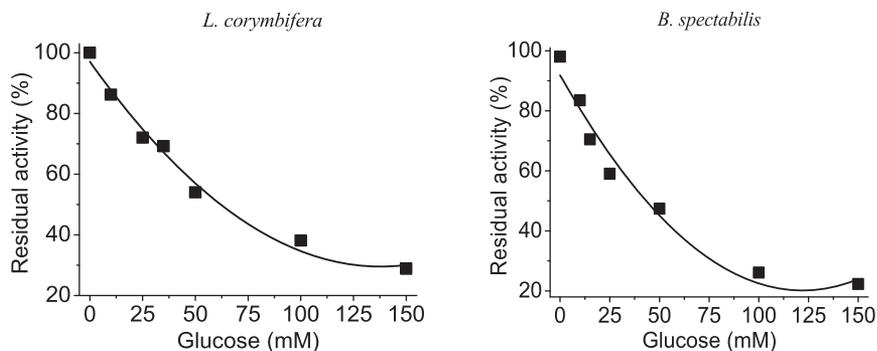
The majority of microbial  $\beta$ -glucosidases are inhibited by glucose, which is one of the main problems in the use of this enzyme in saccharification of vegetable polysaccharides.<sup>[13,29]</sup>

$\beta$ -Glucosidases produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis* showed reversibility to glucose inhibition when the substrate concentration was increased to match the inhibitor concentration (Table 3). The reversibility of inhibition by increasing substrate concentration indicates competitive inhibition.<sup>[6,8]</sup> In this type of inhibition, the inhibitor (glucose) and the substrate compete for the same binding site on the enzyme, the active site. The increase in the substrate concentration favors its binding to the active site, reversing the inhibitory effect generated by glucose.<sup>[3]</sup>

**Table 2.** Thermodynamic parameters of  $\beta$ -glucosidases produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis* obtained at 50 °C.

Microorganisms	$K_d$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{(1/2)}$ (min)	$E_a$ (KJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (KJ mol <sup>-1</sup> )
<i>L. corymbifera</i>	0.0417	16.6	89.9	87.3
<i>B. spectabilis</i>	0.0073	94.9	246.7	244.1

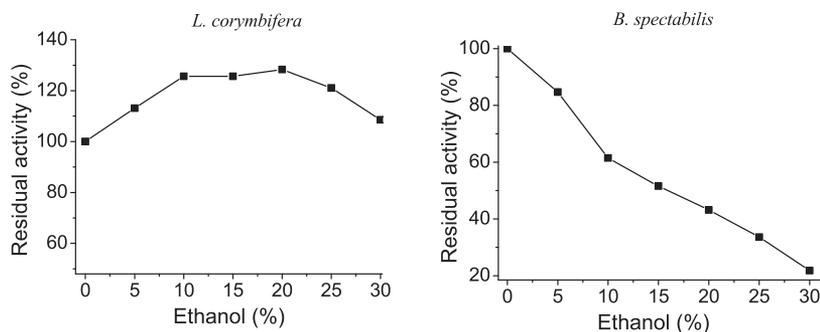
$t_{(1/2)}$  calculated by Eq. (1);  $E_a$  calculated by Eq. (2); and  $\Delta H$  calculated by Eq. (3).



**Figure 5.** Effect of glucose on the  $\beta$ -glucosidases activities produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis*.

**Table 3.** Residual activity for different concentrations of substrate (pNPβG) and inhibitor (glucose).

Enzyme	Residual activity (%) pNPβG – 2 mM	Residual activity (%) pNPβG – 2 mM Glucose – 50 mM	Residual activity (%) pNPβG – 50 mM Glucose – 50 mM	Inhibition type
<i>L. corymbifera</i>	100	55.2	109.6	Competitive
<i>B. spectabilis</i>	100	46.4	102.6	Competitive

**Figure 6.** Effect of ethanol on the  $\beta$ -glucosidases activities produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis*.

The inhibitory effect of glucose on  $\beta$ -glucosidases can be overcome by reducing its concentration via simultaneous saccharification and fermentation process, which converts the sugars released by saccharification of cellulose into ethanol by microbial fermentation. However, enzymes must be able to tolerate the presence of ethanol in the reaction medium.<sup>[38]</sup>

### Effect of ethanol on $\beta$ -glucosidase activities

The effect of ethanol on the  $\beta$ -glucosidases activities was studied by determining the enzymatic activity in the presence of 0–30% of ethanol. In this assay, an increase in the catalytic activity of the enzyme produced by *L. corymbifera* was observed in concentrations of 5–30% ethanol, this was not observed for  $\beta$ -glucosidase from *B. spectabilis*. However, the enzyme produced by *B. spectabilis* maintained more than 60% of its initial activity in the concentration of 10% ethanol (Figure 6).

The increase in the catalytic activity by ethanol is associated with the glucosyltransferase activity; where ethanol can act as an acceptor of the intermediate glycosyl cation during the hydrolysis of the substrate.<sup>[3,8]</sup> Activation by short-chain alcohols was previously observed for  $\beta$ -glucosidase produced by *T. aurantiacus*,<sup>[13]</sup> *Paecilomyces thermophila*,<sup>[31]</sup> *Melanocarpus* sp.,<sup>[27]</sup> *Lichtheimia ramosa*,<sup>[6]</sup> and *Gongronella butleri*.<sup>[8]</sup>

A similar increase in catalytic activity was not observed for the enzyme produced by *B. spectabilis*. However, it can be inferred that the enzyme produced by *B. spectabilis* presents tolerance to ethanol, considering that the values of ethanol obtained in the final stages of traditional fermentation processes are generally less than 10%.<sup>[6,39]</sup>

The tolerance to ethanol observed for  $\beta$ -glucosidases produced by *L. corymbifera* and *B. spectabilis* is desirable in simultaneous saccharification and fermentation process because the enzyme coexists with ethanol during the process.<sup>[6,8]</sup> This characteristic enables the application of these enzymes in saccharification processes of vegetable biomass to obtain biofuels. Ethanol-tolerant  $\beta$ -glucosidases can also be used in vinification processes, enhancing the aromatic content of fine wines.<sup>[4,40]</sup>

## Conclusion

The results of this study allow us to infer that the two fungal strains present the potential for  $\beta$ -glucosidase production, particularly when cultivated on wheat bran, favoring a reduction in the production cost of these enzymes, which is crucial for industrial applications.  $\beta$ -glucosidase produced by *B. spectabilis* presented higher thermal stability compared to the enzyme from *L. corymbifera*. Both enzymes presented desirable characteristics for application in vinification processes and ethanol production from vegetable biomass.

## Disclosure statement

The authors declare no conflicts of interest.

## Funding

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq [444630/2014-7], Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT [23/200.211/2014], and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES.

## ORCID

Tobias Pereira de Moraes  <http://orcid.org/0000-0003-0417-7885>  
 Paula Mirella Gomes Barbosa  <http://orcid.org/0000-0002-1739-5112>  
 Nayara Fernanda Lisboa Garcia  <http://orcid.org/0000-0002-6038-0047>  
 Nathália Gonsales da Rosa-Garzon  <http://orcid.org/0000-0002-5318-0311>  
 Gustavo Graciano Fonseca  <http://orcid.org/0000-0002-8784-661X>  
 Marcelo Fossa da Paz  <http://orcid.org/0000-0002-5176-2895>  
 Hamilton Cabral  <http://orcid.org/0000-0002-7365-1694>  
 Rodrigo Simões Ribeiro Leite  <http://orcid.org/0000-0002-0837-5072>

## References

- [1] Ferreira, V.; Faber, M. O.; Mesquita, S. S.; Pereira, N. Jr. Simultaneous Saccharification and Fermentation Process of Different Cellulosic Substrates Using a Recombinant

- Saccharomyces cerevisiae* Harbours the  $\beta$ -Glucosidase Gene. *Electron. J. Biotechnol.* **2010**, *13*, 5–6.
- [2] Ng, I. S.; Li, C. W.; Chan, S. P.; Chir, J. L.; Chen, P. T.; Tong, C. G.; Yu, S. M.; Ho, T. H. D. High-Level Production of a Thermoacidophilic  $\beta$ -Glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by Solid-State Fermentation with Rice Bran. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1310–1317.
  - [3] Krisch, J.; Bencsik, O.; Papp, T.; Vágvölgyi, C.; Takó, M. Characterization of a  $\beta$ -Glucosidase with Transgalactosylation Capacity from the Zygomycete *Rhizomucor Miehei*. *Process Biochem.* **2012**, *114*, 555–560.
  - [4] Baffi, M. A.; Tobal, T.; Henrique, J.; Lago, G.; Leite, R. S. R.; Boscolo, M.; Gomes, E.; Da-Silva, R. A Novel  $\beta$ -Glucosidase from *Sporidiobolus Pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C997–1002.
  - [5] Silva, L. H.; Celeghini, R. M. S.; Chang, Y. K. Effect of the Fermentation of Whole Soybean flour on the Conversion of Isoflavones from Glycosides to Aglycones. *Food Chem.* **2011**, *128*, 640–644.
  - [6] Garcia, N. F. L.; Santos, F. R. S.; Gonçalves, F. A.; Da Paz, M. F.; Fonseca, G. G.; Leite, R. S. R. Production of  $\beta$ -Glucosidase on Solid-State Fermentation by *Lichtheimia ramosa* in Agroindustrial Residues: Characterization and Catalytic Properties of the Enzymatic Extract. *Electron. J. Biotechnol.* **2015**, *18*, 314–319.
  - [7] 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. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *42*, 236–242.
  - [8] Santos, F. R. S.; Garcia, N. F. L.; Da Paz, M. F.; Fonseca, G. G.; Leite, R. S. R. Production and Characterization of  $\beta$ -Glucosidase from *Gongronella Butleri* by Solid-State Fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* **2016**, *15*, 633–641.
  - [9] 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  $\beta$ -Glucosidase-Producing *Lichtheimia ramosa* Strain. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2013**, *2*, 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2013.06.006>
  - [10] Tomazic, S. J.; Klivanov, A. M. Mechanisms of Irreversible Thermal Inactivation of *Bacillus* alpha-amylases. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3086–3091.
  - [11] Leite, R. S. R.; Gomes, E.; Silva, R. Characterization and Comparison of Thermostability of Purified  $\beta$ -Glucosidases from a Mesophilic *Aureobasidium Pullulans* and a Thermophilic *Thermoascus Aurantiacus*. *Process Biochem.* **2007**, *42*, 1101–1106.
  - [12] Silva, F. A. S.; Azevedo, C. A. V. The Assstat Software Version 7.7 and Its Use in the Analysis of Experimental Data. *Afr. J. Agric. Res.* **2016**, *11*, 3733–3740. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11522>
  - [13] Leite, R. S. R.; Alves-Prado, H. F.; Cabral, H.; Pagnocca, F. C.; Gomes, E.; Da-Silva, R. Production and Characteristics Comparison of Crude  $\beta$ -Glucosidases Produced by Microorganisms *Thermoascus Aurantiacus* e *Aureobasidium Pullulans* in Agricultural Wastes. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *43*, 391–395.
  - [14] Deswal, D.; Khasa, Y. P.; Kuhad, R. C. Optimization of Cellulase Production by a Brown Rot Fungus *Formitopsis* Sp. RCK2010 under Solid State Fermentation. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6065–6072.
  - [15] Abdella, A.; Mazeed, T. E. S.; El-Baz, A. F.; Yang, S. T. Production of  $\beta$ -Glucosidase from Wheat Bran and Glycerol by *Aspergillus niger* in Stirred Tank and Rotating Fibrous Bed Bioreactors. *Process Biochem.* **2016**, *51*, 1331–1337.
  - [16] Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 1–11.
  - [17] Brijwani, K.; Oberoi, H. S.; Vadlani, P. V. Production of a Cellulolytic Enzyme System in Mixed-Culture Solid-State Fermentation of Soybean Hulls Supplemented with Wheat Bran. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 120–128.
  - [18] Kilikian, B. V.; Afonso, L. C.; Souza, T. F. C.; Ferreira, R. G.; Pinheiro, I. R. Filamentous Fungi and Media for Cellulase Production in Solid State Cultures. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 279–286.
  - [19] Pandey, A.; Soccol, C. R.; Mitchell, D. New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 1153–1169.
  - [20] Singhanía, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel, A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. Advancement and Comparative Profiles in the Production Technologies Using Solid-State and Submerged Fermentation for Microbial Cellulases. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 541–549.
  - [21] Medina-Morales, M. A.; López-Trujillo, J.; Gómez-Narváez, L.; Mellado, M.; García-Martínez, E.; Ascacio-Valdés, J. A.; Aguilar, C. N.; Aguilera-Carbo, A. Effect of Growth Conditions on  $\beta$ -Glucosidase Production Using *Flourensia Cernua* Leaves in a Solid-State Fungal Bioprocess. *3 Biotech.* **2017**, *7*, 355–361.
  - [22] Pereira, J. C.; Marques, N. P.; Rodrigues, A.; Oliveira, T. B.; Boscolo, M.D.; Silva, R.; Gomes, E.; Bocchini-Martins, D. A. Thermophilic Fungi as New Sources for Production of Cellulases and Xylanases with Potential Use in Sugarcane Bagasse Saccharification. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *118*, 928–939.
  - [23] Okuyama, M.; Tanimoto, Y.; Ito, T.; Anzai, A.; Mori, H.; Kimura, A.; Matsui, H.; Chiba, S. Purification and Characterization of the Hyper-Glycosylated Extracellular  $\alpha$ -Glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 472–480.
  - [24] Neto, J. B. Purificação de Enzimas. In *Biocologia Industrial*; Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W., Eds.; São Paulo, Brasil: Edgard Blücher Ltda, **2001**; pp. 377–390.
  - [25] Liu, D.; Zhang, R.; Yang, Z.; Zhang, Z.; Song, S.; Miao, Y.; Shen, Q. Characterization of a Thermostable  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and Its Functional Expression in *Pichia pastoris* X33. *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 25–25.
  - [26] Joo, A. R.; Jeya, M.; Lee, K. M.; Lee, K. M.; Moon, H. J.; Kim, Y. S.; Lee, J. K. Production and Characterization of  $\beta$  1,4-Glucosidase from a Strain of *Penicillium Pinophilum*. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 851–858.
  - [27] Kaur, J.; Chadha, B. S.; Badhan, A. K.; Kaur, G. S.; Saini, H. S. Purification and Characterization of  $\beta$ -Glucosidase from *Melanocarpus* Sp. MTCC 3922. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 0–270.
  - [28] Irshad, M.; Anwar, Z.; Ramzan, M.; Mahmood, Z.; Nawaz, H. Characterization of Purified  $\beta$ -Glucosidase Produced from *Trichoderma Viride* through Bio-Processing of Orange Peel Waste. *ABB.* **2013**, *4*, 941–944.
  - [29] Bhatia, Y.; Mishra, S.; Bisaria, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, *22*, 375–407.
  - [30] Bhiri, F.; Chaabouni, S. E.; Limam, F.; Ghrir, R.; Marzouki, N. Purification and Biochemical Characterization of Extracellular  $\beta$ -Glucosidases from the Hypercellulolytic Pol6 Mutant of *Penicillium Occitanis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *149*, 169–182.
  - [31] Yang, S.; Qiaojuan, Y.; Jiang, Z.; Fan, G.; Wang, L. Biochemical Characterization of a Novel Thermostable Beta-1,3-1,4-Glucanase (Lichenase) from *Paecilomyces Thermophila*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5345–5351.
  - [32] Vieille, C.; Zeikus, G. J. Hyperthermophilic Enzymes: sources, Use, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, 1–43.
  - [33] Gomes, E.; Guez, M. A. U.; Martin, N.; Da Silva, R. Enzimas Termoestáveis: fontes, Produção e Aplicação Industrial. *Quím. Nova.* **2007**, *30*, 136–145.
  - [34] Baraldo Junior, A.; Borges, D. G.; Tardioli, P. W.; Farinas, C. S. Characterization of  $\beta$ -Glucosidase Produced by *Aspergillus niger*

- under Solid-State Fermentation and Partially Purified Using MANAE-Agarose. *Biotechnol. Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–8.
- [35] Mehmood, M. A.; Shahid, I.; Hussain, K.; Latif, F.; Rajoka, M. I. Thermodynamic Properties of the  $\beta$ -Glucosidase from *Thermotoga maritima* Extend the Upper Limit of Thermophilicity. *Protein Pept. Lett.* **2014**, *21*, 1282–1288.
- [36] Zaccardi, M.; Mannweiler, O.; Boehr, D. D. Differences in the Catalytic Mechanisms of Mesophilic and Thermophilic Indole-3-Glycerol Phosphate Synthase Enzymes at Their Adaptive Temperatures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *418*, 324–329.
- [37] Bruins, M. E.; Janssen, A. E. M.; Boom, R. M. Thermozyms and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents. *Appl. Abab.* **2001**, *90*, 155–181.
- [38] Sun, X.; Liu, Z.; Qu, Y.; Li, X. The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium Decumbens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *146*, 119–128.
- [39] Gu, Y.; Qiao, M.; Zhou, Q.; Zhou, Z.; Chen, G. Hyperproduction of Alcohol Using Yeast Fermentation in Highly Concentrated Molasses Medium. *Tsinghua Sci. Technol.* **2001**, *6*, 225–230.
- [40] Karnaouri, A.; Topakas, E.; Paschos, T.; Taouki, L.; Christakopoulos, P. Cloning, Expression and Characterization of an Ethanol Tolerant GH3  $\beta$ -Glucosidase from *Myceliophthora Thermophila*. *PeerJ.* **2013**, *1*, e46–e20.