

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

Nayara Fernanda Lisbôa Garcia

Produção de β -glicosidase por fermentação em estado sólido do fungo *Lichtheimia ramosa* em resíduos agroindustriais: caracterização e propriedades catalíticas do extrato enzimático

Dourados - MS

2014

Nayara Fernanda Lisbôa Garcia

Produção de β -glicosidase por fermentação em estado sólido do fungo *Lichtheimia ramosa* em resíduos agroindustriais: caracterização e propriedades catalíticas do extrato enzimático

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Universidade Federal da Grande Dourados, para obtenção do título de mestre em Biologia Geral.

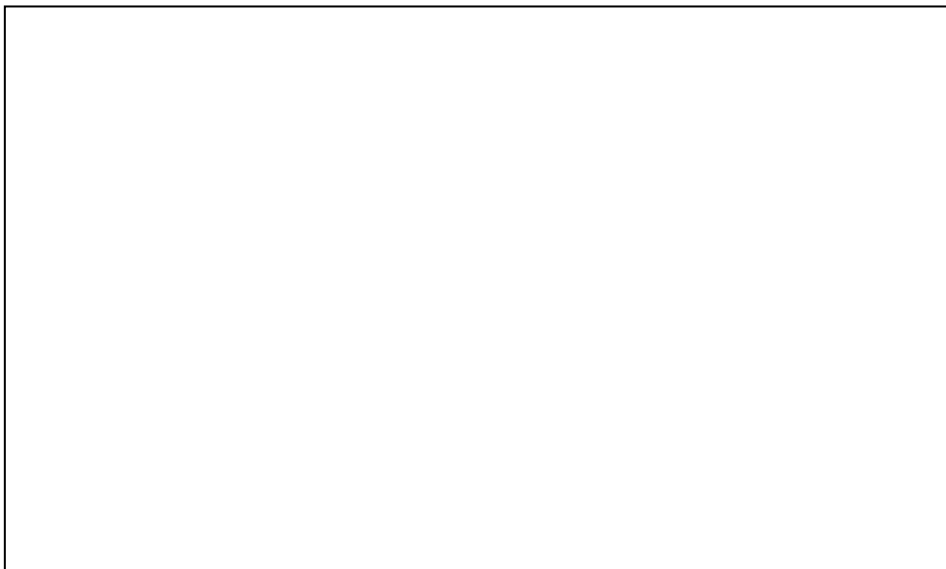
Área de concentração: Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados - MS

2014

**AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**



À Deus, aos meus pais,
Miguel e Neli e meu irmão, Nighel,
por serem sempre o meu porto
seguro, por não me deixarem
desanimar durante a caminhada.
Que foram é e serão fundamentais
em todos os momentos da minha
vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Afirmava Epícuro que “o insensato é ingrato”, e pertence a Cícero este pensamento: “Nenhum dever é mais importante do que a gratidão”. Agradeço:

À Deus, por me envolver com sua presença e espírito, me guiar e iluminar, e por que não, pelos problemas e aflições que me concedeu para edificar minha fé e meu caráter.

Meus pais, Miguel Marques Garcia e Neli de Souza Lisbôa Garcia, e ao meu irmão, Nighel Fenando Lisbôa Garcia, com amor, admiração e gratidão por sua enorme compreensão, carinho, constante incentivo e incansável apoio. Devo a vocês tudo o que sou e não há nada maior que a educação moral, intelectual e física que recebi. Vocês são a razão maior da minha conquista. Amo-os infinitamente.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pela paciência, receptividade, apoio, confiança depositada, incentivo e motivação a pesquisa e por toda sua amizade. Este que me acompanha desde os primórdios de minha graduação e contribuiu de maneira excepcional à construção do meu conhecimento profissional e intelectual. A você minha admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Marcelo Paz e Prof. Dr. Gustavo Fonseca, pelas valiosas contribuições.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Eliana Janet Sanjinez Argandoña e Prof. Dr. Gisele Jane de Jesus, pela disponibilidade e sugestões apresentadas ao trabalho.

Ao Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos pelos momentos de trabalho, ensinamentos, companheirismo, descontração, carinho, bate-papos e desabafos do dia-a-dia.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção pela oportunidade e aos docentes pela solicitude apresentada, por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

Ao secretário da Pós-graduação, Paulo Henrique Figueiredo, pela amizade, atenção e pela constante ajuda nos momentos atribulados.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais pela paciência, prontidão e por sempre estarem solícitos em cooperar.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq e FUNDECT pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos amigos todos, em especial a Nayara, Cristiane, Paula, Nighel, Paulo, Vinicius, Tobias e Danilo, que, no momento da redação das partes finais do texto, me atrapalharam o suficiente para que o solilóquio com a dissertação não se transformasse em solidão. E sei que participarão de forma intensa na comemoração do final desta etapa.

A todos que de alguma maneira colaboraram para o desenvolvimento deste tra com sugestões, críticas e especialmente amizade.

Muito obrigada!

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, sonhar e querer."

"Enquanto mais me aprofundo nas ciências, mais me aproximo de Deus."

Louis Pasteur

RESUMO

GARCIA, N.F.L. **Produção de β -glicosidase por fermentação em estado sólido do fungo *Lichtheimia ramosa* em resíduos agroindustriais: caracterização e propriedades catalíticas do extrato enzimático.** 2014. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

As β -glicosidases tem despertado grande interesse industrial, pois são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, principal produto proveniente da hidrólise enzimática da celulose, em monômeros de glicose podendo ser convertida em combustíveis não fósseis como etanol. A propriedade de atuar em diferentes substratos possibilita a aplicação dessa enzima em diversos processos industriais, tais como: na hidrólise enzimática da celulose para a obtenção de açúcares fermentáveis, na obtenção de alimentos funcionais derivados de soja ou ainda na indústria de sucos e bebidas aumentando a qualidade aromática. De modo geral, a aplicabilidade industrial de uma enzima está intimamente relacionada com o custo de produção e com as características da mesma. Dessa forma, diversos trabalhos descrevem a incessante busca de linhagens microbianas hiperprodutoras de enzimas que apresentem características apreciáveis industrialmente. Considerando o exposto acima este trabalho teve como finalidade estudar a produção e caracterização da β -glicosidase produzida pelo fungo filamentosso *Lichtheimia ramosa*.

Palavras-chave: Celulases e hemicelulases, Enzimas industriais, Celobiase.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Estrutura representativa das cadeias de celulose. A) Unidade de celobiose; B) Extremidade redutora e não redutora.	1
Figura 2: Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: D-glucose (1); D-galactose (2); L-arabiose (3); D-xilose (4); D-manose (5); 4-O-metil-D-glucorônico (6); E-L-Ramnose (7); (SAHA, 2005).	2
Figura 3: Representação esquemática de um sistema celulolítico (YEOMAN et al., 2010).	3
Figura 4 : Estrutura da molécula de xilana e ação das xilanases (GOMES et al., 2007, modificada).	4

Capítulo 2

Figura 1: Variações dos parâmetros de cultivo em estado sólido do fungo <i>Lichtheimia ramosa</i> em farelo de trigo. A) Efeito do pH inicial do meio na produção da enzima; B) Efeito da umidade na produção da enzima; C) Efeito da temperatura na produção da enzima; D) Produção de β -glicosidase em função do tempo de cultivo.	17
Figura 2: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática. A) pH ótimo; B) Temperatura ótima; C) pH de estabilidade; D) Temperatura de estabilidade.	20
Figura 3: Efeito do etanol (A) e glicose (B) sobre a atividade da β -glicosidase produzida pelo fungo <i>L. ramosa</i>	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de β -glicosidase em diferentes substratos em FES pelo fungo <i>L. ramosa</i> , 96 horas de cultivo a 28°C, contendo 75% de umidade.	16
Tabela 2: Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNP β G) e inibidor.	22
Tabela 3: Potencial catalítico do extrato enzimático obtido pelo cultivo em estado sólido do fungo <i>L. ramosa</i> em farelo de trigo contendo 65% de umidade, com pH inicial 5,0, incubado por 96 h a 35°C.	23

Sumário

RESUMO	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
CAPÍTULO 1	
1. REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Biomassa lignocelulósica	1
1.2 Celulases e hemicelulases	2
1.3 Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)	5
1.4 Referências	7
OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
CAPÍTULO 2	
RESUMO	11
3.1 Introdução	12
3.2 Material e métodos	13
3.3. Resultados e discussão	15
3.4. Considerações finais	24
3.5 Agradecimentos	24
3.6 Referências	25

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Biomassa lignocelulósica

As matérias primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza e compõem mais de 60% de toda a biomassa produzida na Terra (SUKUMARAN et al., 2009). A biomassa vegetal é construída por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa e resistente (SÁNCHEZ, 2009).

A celulose é um polímero linear formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (ZHANG et al., 2006; CHAMPAGNE; LI, 2009). As moléculas de celulose ligam-se umas às outras por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, formando fibrilas (Figura 1). As fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas na forma de espirais para conferir força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A lignina é um heteropolímero constituído por anéis aromáticos, sendo fixadas as fibras de celulose pela hemicelulose (SÁNCHEZ, 2009).

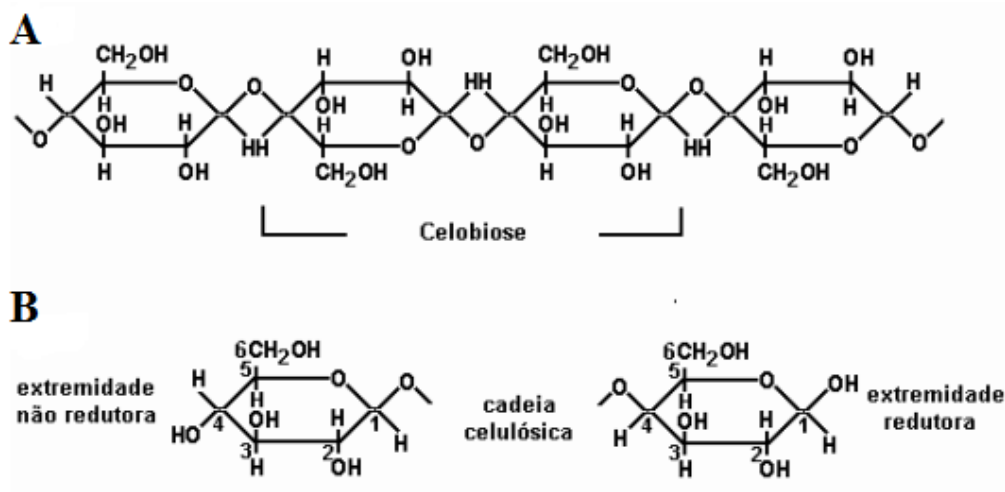


Figura 1: Estrutura representativa das cadeias de celulose. A) Unidade de celobiose; B) Extremidade redutora e não redutora.

A hemicelulose atua como um elo químico entre a celulose e a lignina. Contrariamente à celulose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos naturais de baixo grau de ramificação e, conseqüentemente, não apresentam regiões cristalinas. Sua grande variação contribui para uma alta complexidade da estrutura e diferentes conformações (COLLINS et al., 2005). Quimicamente, as hemiceluloses são compostas por um esqueleto de xilana, formando uma estrutura principal a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros (POLIZELI, et al., 2005). Estas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes.

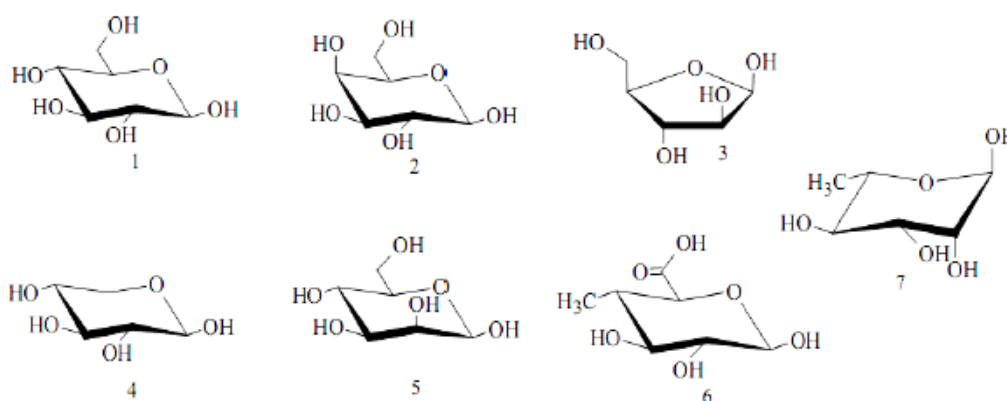


Figura 2: Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: D-glucose (1); D-galactose (2); L-arabiose (3); D-xilose (4); D-manose (5); 4-O-metil-D-glucorônico (6); E-L-Ramnose (7); (SAHA, 2005).

1.2 Celulases e hemicelulases

A hidrólise enzimática da celulose é conduzida por enzimas celulolíticas específicas, as quais geralmente produzem açúcares redutores, incluindo a glicose. Os custos são baixos quando comparados a tratamentos ácidos e alcalinos, devido às condições de condução do processo, normalmente moderadas e à ausência de corrosão (BALAT, 2011). Dentre elas é possível destacar: endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.9.1) e β -glucosidases (EC 3.2.1.2.1).

A endoglucanase ou endo- β -1,4-glucanase hidrolisa as cadeias ao acaso, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução no tamanho da cadeia ou no grau de polimerização, a exoglucanase ou exo- β -1,4-glucanase ou celobiohidrolase atua sobre a celulose, removendo unidades de celobiose a partir de

extremidades não redutoras da molécula e a β -1,4-glicosidase ou celobiase hidrolisa celobiose e outras celodextrinas a glicose (CASTRO; PEREIRA-JR, 2010) (Figura 2).

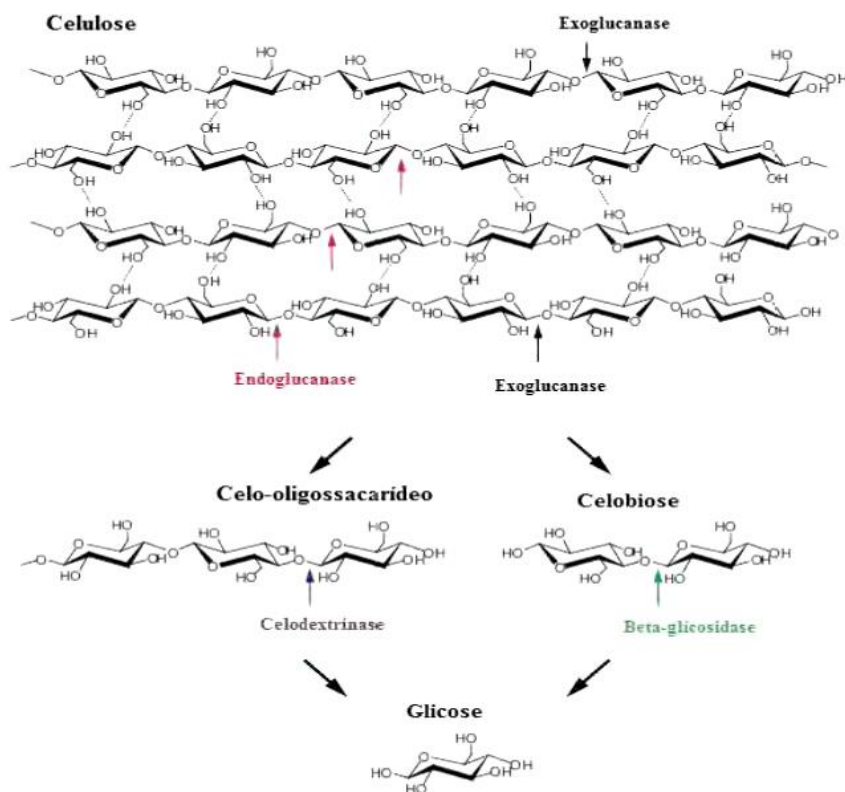


Figura 3: Representação esquemática de um sistema celulolítico (YEOMAN et al., 2010).

Todas as enzimas do complexo celulolítico sofrem repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. Por prevenir o acúmulo de celobiose, a β -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, desempenhando assim, efeito crucial na degradação enzimática da celulose. A função exercida pela β -glicosidase no processo de hidrólise da celulose faz com que esta enzima apresente um grande potencial para a indústria de etanol, dessa forma, pesquisas com β -glicosidases microbianas associadas às demais enzimas celulolíticas, podem contribuir para viabilizar a obtenção de combustíveis a partir de resíduos agroindustriais ricos em celulose (LEITE et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

As principais enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose são as xilanases, estas enzimas atuam na cadeia central da hemicelulose, a xilana, reduzindo drasticamente o grau de polimerização deste polissacarídeo. Assim como as celulases, apresentam ação sinérgica para promover a hidrólise do polímero a açúcares simples. As endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) atacam internamente o esqueleto estrutural da

molécula e as β -xilosidades (EC 3.2.1.3.7) hidrolisam externamente a cadeia de xilana e pequenos xilooligosacarídeos liberando xilose (KESHWANI; CHENG, 2009) (Figura 4).

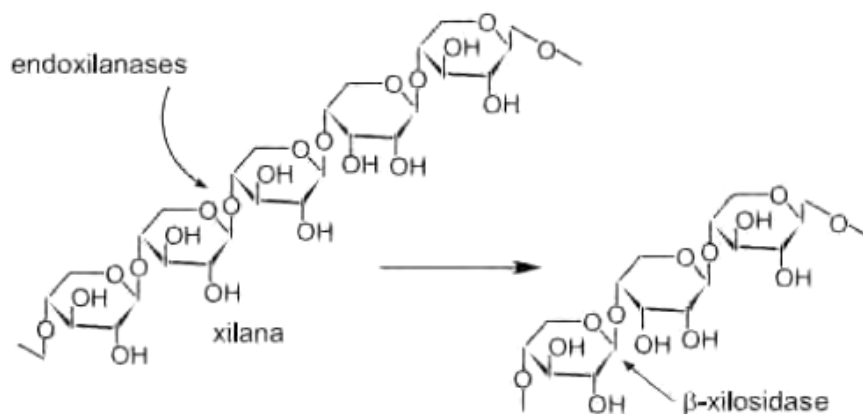


Figura 4: Estrutura da molécula de xilana e ação das xilanases (GOMES et al., 2007, modificada).

Celulases e hemicelulases comerciais têm sido usadas em diversas aplicações. Na indústria de sucos, as celulases auxiliam nos processos de extração, clarificação, reduzindo a viscosidade e a formação de agregados de carboidratos, proteínas e polifenóis, o que favorece a redução do tempo de filtração e contribui com a estabilidade do produto final (BHAT, 2000).

A tecnologia enzimática desempenha um papel central nos processos de produção do vinho e da cerveja. Complexos enzimáticos contendo celulases, glucanases, hemicelulases e pectinases são utilizados na indústria de vinho para acelerar o processo de vinificação e melhorar a qualidade do produto final (BHAT, 2000; ROLDÁN et al., 2006).

Na indústria de alimentos, as celulases atuam nos processamentos de sopas, cereais e vegetais desidratados, e são adicionadas para melhorar a rehidratabilidade dos produtos quando chegam aos consumidores (BHAT, 2000).

Na indústria de polpa de celulose e papel, as celulases são usadas misturadas com hemicelulase para melhorar a drenagem e execução de máquinas e também o destino de fibras recicladas (CAO; TAN, 2002).

1.3 Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)

De modo geral, a aplicabilidade industrial de uma enzima está intimamente relacionada com seu custo de produção e as características da mesma. A redução no custo de produção pode ser obtida pela seleção de linhagens hiperprodutoras da enzima de interesse, associada à otimização do processo de cultivo em meios de baixo valor agregado (LEITE et al., 2008).

Celulases e hemicelulases comerciais têm sido usadas em diversas aplicações, entretanto, o principal gargalo para a aplicação abrangente da celulase na indústria é o alto custo de produção da enzima (SOHAIL et al., 2009). Para solucionar este problema algumas estratégias podem ser usadas, como o uso de microrganismos com altas taxas de produção das enzimas e a utilização de processos fermentativos com menor custo (GAO et al., 2008; SUKUMARAN et al., 2009).

Vários subprodutos agroindustriais como, farelo de trigo, palhas, sabugo e sabugos de milho, polpa de frutas, resíduos de tubérculos, cascas de sementes e farelos residuais da obtenção de óleos, podem ser explorados por meio de fermentação em estado sólido (FES) para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas uma vez que contêm, além de fonte de carbono, diversos nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (DOGARIS et al., 2009). Dessa forma, a utilização desses resíduos como substratos para produção de enzimas através de FES sólido tem se mostrado muito interessante.

A FES envolve sólidos na ausência ou quase ausência de água livre entre as partículas do substrato, porém, com umidade suficiente para o crescimento e metabolismo microbiano (PANDEY, 2003). Este processo simula as condições de vida dos fungos filamentosos, que crescem sob materiais sólidos, produzindo enzimas para degradá-los e assim utilizar seus nutrientes para sua sobrevivência. Portanto, esta técnica reproduz processos microbiológicos naturais como a compostagem e a ensilagem (SINGHANIA et al., 2009). Fatores como temperatura, pH, aeração, natureza do substrato sólido empregado, atividade de água e umidade, influenciam os resultados a produção de bioprodutos microbianos por FES.

Dessa forma, a aplicação de celulases industrialmente requer a produção destas enzimas em larga escala, bem como o conhecimento detalhado de seus mecanismos de ação (BHATIA et al., 2002). O estudo das propriedades físico-químicas e bioquímicas das enzimas é de extrema importância para estabelecer em quais condições de processo seu uso propiciará melhores resultados técnicos e econômicos para os processos biotecnológicos. Os valores ótimos de temperatura e pH, a estabilidade da atividade

enzimática em função da temperatura, do pH e da estocagem em baixas temperaturas são algumas destas propriedades comumente avaliadas em estudos clássicos de enzimologia.

1.4 Referências

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*.v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 355-383, 2000.

BHATIA, Y.; MICHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.22, p.375-407, 2002.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of celulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research*, v.337, p. 1291-1296, 2002.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases nahidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHAMPAGNE, P.; LI, C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. *Bioresource Technology*, in press, 2009.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 29, n.1, p. 3–23, 2005.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Industrial Crops and Products*, v. 29, p. 404-411, 2009.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F. XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

KESHWANI, D. R.; CHENG, J. J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1515-1523, 2009.

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

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

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

POLIZELI, M. L. T. M. RIZZATTI, A. C. S., MONTI .R., TERENCEI . H. F. JORGE J. A. AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.67, p. 577-591, 2005.

ROLDÁN, A.; PALACIOS, V.; PENATE, X.; BENITEZ, T.; PEREZ, L. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino fino* grapes in the sherry region. *Journal of Food Engineering*, N. 75, p. 375–382. 2006.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 32, p. 421-424, 2009.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185-194, 2009.

SAHA, B.C., LOREN, B.I., MICHAEL, A.C., WU, Y.V. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnology Progress* 21, 816–822, 2005.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, in press, 2009.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, v. 25, n.06, 2009.

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 β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 272–278, 2010.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; RODERICK I.MACKIE, R. I.; CANN, I. K. O. Chapter 1. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel. *Advances in Applied Microbiology*, v. 70, 2010.

ZHANG, P. Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, p.452-481, 2006.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Produzir e caracterizar a β -glicosidase do fungo filamentoso *Lichtheimia ramosa* obtida por fermentação em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a produção de β -glicosidase pelo microrganismo em fermentação em estado sólido (FES);
- Caracterizar físico-quimicamente a β -glicosidase produzida;
- Avaliar o potencial catalítico do extrato enzimático obtido nas condições ótimas de cultivo.

CAPÍTULO 2

Produção de β -glicosidase por fermentação em estado sólido do fungo *Lichtheimia ramosa* em resíduos agroindustriais: caracterização e propriedades catalíticas do extrato enzimático

RESUMO

As β -glicosidases catalisam a hidrólise de dissacarídeos e celodextrinas a partir da extremidade não redutora, tendo como principal produto monossacarídeos de glicose. Esta enzima possui aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e biocombustível. Neste trabalho foi avaliado o perfil de produção enzimática do fungo *Lichtheimia ramosa* por fermentação em estado sólido (FES) em diversos resíduos agroindustriais. A maior produção de β -glicosidase, cerca de 274 U/g de substrato seco (ou 27,4U/mL), foi obtida pelo cultivo do fungo em farelo de trigo contendo 65% de umidade, após 96 horas de fermentação a 35°C. O extrato enzimático produzido nas condições anteriormente descritas apresentou 15,2U/mL de CMCcase, 2,8U/mL de xilanase e 11,5U/mL de β -xilosidase. A atividade ótima para β -glicosidase foi observada em pH 5,5 a 65°C, sendo estável em pH 3,5 - 10,5 e manteve sua atividade catalítica após 1 hora a 55°C. A enzima apresentou forte inibição por glicose, mas, em concentrações elevadas de substrato a inibição foi completamente revertida (inibição competitiva). A β -glicosidase manteve sua atividade catalítica em solução alcoólica contendo até 10% de etanol. As características descritas, associadas ao potencial de hidrolisar de forma eficiente celobiose, estimulam aplicação desta enzima em processos de sacarificação de celulose.

Palavras-chave: Celulasas e hemicelulasas, Enzimas industriais, Celobiase.

3.1 INTRODUÇÃO

A escassez anunciada de combustíveis fósseis, associados aos problemas ambientais decorrentes do seu processamento e consumo, resultam na busca de fontes alternativas de combustível e energia renováveis. Este cenário tem despertado grande interesse na utilização de celulases e outras enzimas para conversão de biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis (SINGHANIA et al., 2010).

Para hidrolisar enzimaticamente a celulose em glicose, pelo menos três classes de enzimas são necessárias, incluindo (1) endoglucanase (EC 3.2.1.4) que hidrolisa internamente as cadeias de celulose reduzindo drasticamente o grau de polimerização da molécula, (2) exo-glucanase (EC 3.2.1.91) que ataca as extremidades reductoras ou não reductoras da celulose liberando celobiose e (3) β -glicosidase (CE 3.2.1.21) que hidrolisa celobiose e oligossacarídeos obtendo monossacarídeos de glicose (NG et al., 2010).

A propriedade de atuar em diferentes substratos glicosídeos possibilita a aplicação desta enzima em vários processos industriais, tais como: na hidrólise enzimática da celulose para a obtenção de açúcares fermentescíveis, na obtenção de alimentos funcionais derivados de soja ou ainda na indústria de sucos e bebidas facilitando a ruptura da rede celulósica que ajuda a reter o líquido nas células vegetais e aumentando a qualidade. Na produção de vinhos melhoram a extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva, aumentando a qualidade aromática de vinhos e derivados de uva (LEITE et al., 2008).

A obtenção de enzimas industriais de maneira economicamente viável requer a busca de matérias-primas renováveis e processos de baixo custo. A utilização da fermentação em estado sólido (FES) pode reduzir o impacto ambiental e agregar valor aos subprodutos da agroindústria (PANDEY, 2003). Características típicas da FES têm estimulado diversos trabalhos científicos, que buscam entender como diferentes parâmetros de cultivo influenciam a produção de enzimas microbianas utilizando diferentes resíduos como substratos, visando assim, o aperfeiçoamento deste tipo de bioprocessos (SILVA et al., 2013; DELABONA et al., 2013; ALVES-PRADO et al., 2010; LEITE et al., 2007). Dentre as características é possível ressaltar a simplicidade e proximidade das condições de crescimento natural de muitos microrganismos (especialmente fungos filamentosos), o consumo reduzido de energia, a ausência de equipamentos complexos e sistema de controle sofisticado. As vantagens da FES para a produção de enzimas ainda incluem maiores níveis de produtividade, baixa repressão catabólica e aumento na estabilidade de enzimas excretadas (DEL BIANCHI et al., 2001).

De modo geral, a aplicabilidade industrial de uma enzima está intimamente relacionada com seu custo de produção e as características da mesma. A redução no custo de produção pode ser obtida pela seleção de linhagens hiperprodutoras da enzima de interesse, associada à otimização do processo de cultivo em meios de baixo valor agregado (LEITE et al., 2008). Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa evidenciaram expressiva produção de β -glicosidase pelo fungo *Lichtheimia ramosa*, cultivado em estado sólido utilizando diferentes resíduos de origem vegetal (GONÇALVES et al., 2013; SILVA et al., 2013). O presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de β -glicosidase pelo microrganismo em estado sólido, caracterizar físico-quimicamente a enzima produzida e avaliar o potencial catalítico da β -glicosidase e do extrato enzimático obtido.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Microrganismo

O fungo filamentosso *Lichtheimia ramosa* foi isolado de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar da usina sucroenergética São Fernando Açúcar e Álcool Ltda, Dourados –MS (GONÇALVES et al. 2013). O microrganismo foi mantido em meio Sabouraud Dextrose Agar, após o crescimento a 28°C por 48 horas, a linhagem foi estocada a 4°C.

3.2.2. Inóculo

O microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de Sabouraud Dextrose Agar inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do fungo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio heptahidratado e 0,1% nitrito de sódio). A inoculação do microrganismo nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL dessa suspensão.

3.2.3. Fermentação em estado sólido (FES)

A enzima foi produzida pelo cultivo do fungo em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de resíduo (farelo de trigo, farelo de soja, palha de milho, sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana de açúcar), a umidade foi ajustada para 75% com solução nutriente (descrito no item anterior). Após 96 horas de cultivo a 28°C a solução enzimática foi extraída dos resíduos fermentados. O melhor substrato para produção da enzima foi utilizado nas etapas subsequentes variando a umidade, temperatura e tempo de cultivo. O parâmetro selecionado em cada etapa foi utilizado no

cultivo posterior, visando a otimização do processo fermentativo para produção de β -glicosidase. Todo material foi previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C e os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.2.4. Extração da Enzima

A extração da enzima dos resíduos fermentados foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, mantidos em agitação de 100 rpm por 1 hora. A amostra foi filtrada e centrifugada a 3.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático extracelular e utilizado nas etapas seguintes.

3.2.5. Determinação da atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50 μ L de extrato enzimático, 250 μ L de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4 mM (pNP β G, Sigma), reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 mL de carbonato de sódio 2 M e o p-nitrofenol liberado quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

3.2.6. Caracterização físico-química da β -glicosidase

3.2.6.1. Efeito de pH

O pH ótimo da β -glicosidase foi determinado mensurando a atividade a 50°C em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0), nesta etapa foi utilizado tampão citrato-fosfato a 0,1 M. A estabilidade ao pH foi determinada incubando a enzima por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH. Os tampões utilizados foram citrato-fosfato 0,1 M (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1 M (8,0 - 8,5) e Glicina-NaOH 0,1 M (8,5 - 10,5). A atividade residual foi determinada na condição ótima de pH e temperatura da enzima.

3.2.6.2. Efeito da Temperatura

A temperatura ótima da β -glicosidase foi obtida pela determinação da atividade enzimática em temperaturas de 30 a 75°C, no respectivo pH ótimo da enzima. A termoestabilidade foi determinada incubando a enzima por 1 hora em diferentes valores de temperatura (30 a 70°C). As atividades residuais foram mensuradas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima.

3.2.6.3. Efeito da glicose e etanol

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de glicose e etanol, em diferentes concentrações, na mistura de reação (0-200 mM de glicose e 0-30% de etanol). Os ensaios foram realizados a 65°C em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5.

2.7. Potencial catalítico do extrato enzimático

As atividades de CMCase e xilanase foram quantificadas utilizando respectivamente Carboximetilcelulose 3% (C5678 Sigma) e xilana 1% (Birch-Wood Sigma). O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (MILLER, 1959). A atividade de β -xilosidase foi mensurada com substrato sintético p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo 4 mM (Sigma), seguindo a metodologia descrita no item 2.5. O potencial de hidrolisar celobiose foi avaliado com o kit glicose-oxidase (Glicose-PP Analisa), incubando 100 μ L do extrato enzimático em 0,9 mL tampão acetato de sódio 50 mM contendo 0,5% de Celobiose (Fluka). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de produto por minuto de reação.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Produção de β -glicosidase por fermentação em estado sólido

3.1.1. Seleção de substratos para produção de β -glicosidase

Dentre os substratos avaliados, o cultivo do fungo *L. ramosa* em farelo de trigo apresentou maior produção de β -glicosidase, 162,2 U/g (16,22 U/mL) (Tabela 1). O farelo de trigo apresenta composição nutricional interessante para o cultivo microbiano, contendo quantidades adequadas de hidratos de carbono, proteínas, gorduras, fibras, cinzas (Ca, Mg, P, K e S) e vários aminoácidos essenciais para o crescimento de fungos e produção de enzimas (RAJOKA et al., 2006).

Trabalhos anteriores relatam expressivas produções de β -glicosidasas pelo cultivo de microrganismos em estado sólido, utilizando farelo de trigo como principal substrato, ou ainda, com misturas deste resíduo em sua composição (BRIJWANI et al., 2010; KALOGERIS et al., 2003; LEITE et al., 2008; SUKUMARAN et al. 2009; FARINAS et al., 2008; GONÇALVES et al., 2013; RAJOKA et al., 2006). Dessa forma, o farelo de trigo foi selecionado para os ensaios posteriores, visando a otimização do processo de cultivo para produção da enzima.

Tabela 1: Produção de β -glicosidase em diferentes substratos em FES pelo fungo *L. ramosa*, 96 horas de cultivo a 28°C, contendo 75% de umidade.

Substrato	U/mL	U/g
Farelo de trigo	16,22±0,42	162,2±4,2
Farelo de soja	1,15±0,07	11,5±0,7
Palha de milho	0,35±0,045	3,5±0,45
Sabugo de milho	0,27±0,02	2,7±0,2
Casca de arroz	0,068±0,00	0,68±0,00
Bagaço de cana	1,11±0,025	11,1±0,25

3.1.2. Variação dos parâmetros de cultivo em farelo de trigo

Dentre os parâmetros que interferem a produção de enzimas pelo cultivo de microrganismos em estado sólido, o presente trabalho avaliou o efeito do pH, umidade, temperatura e tempo de cultivo. Todos os ensaios foram realizados utilizando farelo de trigo como substrato.

A maior produção de β -glicosidase pelo fungo foi obtida no cultivo onde o pH inicial da solução nutriente foi ajustado para 5,0 (Figura 1A). Trabalhos anteriores relatam a produção celulasas por fungos filamentosos em valores abaixo da neutralidade (DHAKI; PATIL 2005; SHAHRIARINOUR et al., 2011). A maioria dos fungos filamentosos apresentam crescimento ótimo em pH que tendem a acidez. Geralmente, valores de pH superiores a 7,0 reduzem o crescimento fúngico e conseqüentemente a produção enzimática. (BAKRI et al., 2008).

Os valores apresentados são referentes ao pH inicial da solução nutriente utilizada para umedecer o substrato. O pH do meio não foi controlado durante o processo fermentativo, devido a heterogeneidade do cultivo em estado sólido. Segundo Pandey et al. (2000) a dificuldade de monitoramento e controle dos parâmetros fermentativos no cultivo em estado sólido, talvez seja a principal desvantagem neste tipo de processo. Variações do pH durante o processo fermentativo são ocasionadas devido a atividade metabólica microbiana, podendo ser aumentado ou diminuído de acordo com o que é liberado ou consumido no meio de cultivo (RAIMBAULT, 1998).

Dentre os valores de umidades avaliados, a maior produção da enzima foi obtida em farelo de trigo contendo 65% de umidade inicial (Figura 1B). Valores entre 60 e 70% de umidade são descritos na literatura para o cultivo de fungos filamentosos,

visando a produção de β -glicosidase por fermentação em estado sólido. Leite et al. (2008) relatam a produção de β -glicosidase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* cultivado em farelo de trigo com umidade de 60%; Brijwani et al. (2010) obtiveram maior produção de β -glicosidase (10,71 U/g) utilizando casca de soja e farelo de trigo com 70% de umidade para o co-cultivo dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae* em estado sólido.

A umidade em processos de fermentação em estado sólido pode influenciar na síntese e secreção de enzimas extracelulares. A presença de água livre entre as partículas do substrato reduz a porosidade do meio, interferindo na transferência de gases e calor. Por outro lado, o baixo teor de umidade pode reduzir a solubilidade de nutrientes, o que retarda a atividade metabólica microbiana (ELLAIHAH et al., 2002).

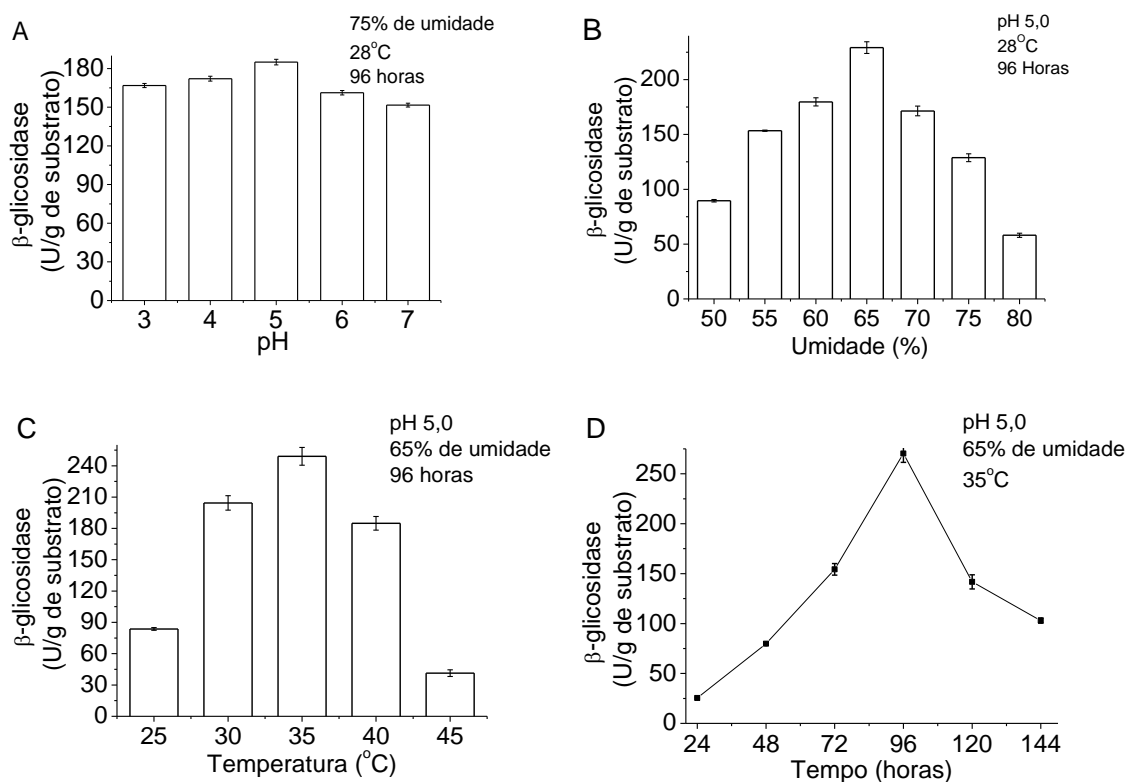


Figura 1: Variações dos parâmetros de cultivo em estado sólido do fungo *Lichtheimia ramosa* em farelo de trigo. **A)** Efeito do pH inicial do meio na produção da enzima; **B)** Efeito da umidade na produção da enzima; **C)** Efeito da temperatura na produção da enzima; **D)** Produção de β -glicosidase em função do tempo de cultivo.

A temperatura ideal para produção de β -glicosidase pelo fungo *L. ramosa* foi de 35°C, apresentando cerca de 249,0 U/g (24,9 U/mL) (Figura 1C). Gonçalves et al. (2013) estudaram o crescimento do fungo *L. ramosa* em diferentes temperaturas

utilizando o meio potato dextrose agar (PDA). A temperatura máxima de crescimento descrita pelos autores coincidiu com a descrita no presente trabalho para produção da enzima.

A Figura 2 permite ainda observar elevada quantidade de enzima nos cultivos realizados a 30 e 40°C. Dessa forma, é possível inferir que a temperatura para produção da enzima foi superior a descrita na literatura, para cultivo de microrganismos mesófilos, que geralmente variam entre 28 e 30°C (BRIJWANI et al., 2010; DESWAL et al., 2011; LEITE et al., 2007). O que favorece o emprego desta linhagem em processos industriais, onde é aceitável variações na temperatura do processo, considerando que o controle dos parâmetros fermentativos em larga escala não é extremamente preciso.

Nos cultivos realizados a 25 e 45°C foi evidenciado considerável redução na produção da enzima (Figura 1C). Temperaturas muito inferiores, à ótima do crescimento microbiano, desfavorecem o transporte de nutrientes e secreção de produtos entre o meio intra e extracelular, considerando que reduzem a permeabilidade da membrana plasmática e a velocidade das reações metabólicas. Por outro lado, temperaturas muito elevadas ocasionam colapso de estruturas membranosas e desnaturam proteínas estruturais e enzimas. Ambos os casos resultam em menor produção enzimática (RAJOKA et al., 2004).

O último parâmetro avaliado foi o tempo de cultivo, os demais parâmetros previamente selecionados foram adotados na fase final dos ensaios fermentativos. A maior produção da enzima foi obtida em 96 horas de cultivo a 35°C, utilizando farelo de trigo como substrato com 65% de umidade e o pH da solução nutriente ajustado para 5,0 (Figura 1D). A otimização do processo de cultivo aumentou a produção de β -glicosidase pelo fungo de 162,2 U/g (16,22 U/mL) para 274,0 U/g (27,4 U/mL) (Tabela 1 e Figura 1D). Além do aumento da produção da enzima, também foi observada a redução do tempo de cultivo, comparado aos ensaios preliminares realizados pelo Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos. Gonçalves et al. (2013) relatam a produção de 17,26 U/mL para β -glicosidase, após 120 horas de cultivo em estado sólido do fungo *L. ramosa*. Os dados descritos no presente trabalho reforçam a importância da otimização dos parâmetros de cultivo, evidenciado pelo aumento de 68,9% na produção da enzima, comparado aos valores iniciais.

O reduzido tempo de cultivo para produção da enzima pelo fungo *L. ramosa*, cerca de 96 horas, também deve ser destacado. Quanto menor for o tempo de fermentação, menor será o custo de produção da enzima (SONJOY et al., 1995). Após

96 horas de cultivo foi possível observar uma queda na quantidade de enzima nos extratos obtidos (Figura 1D). A redução da atividade enzimática pelo tempo de incubação adicional, pode ser justificada pela alteração da composição do meio de cultivo devido à atividade metabólica microbiana. Durante o crescimento do microrganismo ocorre o consumo dos constituintes do meio de cultura e liberação de subprodutos que podem interferir tanto na síntese protéica como na atividade enzimática, ex: redução de macro e micronutrientes, alteração do pH, produção de proteases, diminuição da disponibilidade de água, dentre outros (HAQ et al., 2006).

A produção de β -glicosidase obtida no presente trabalho é bastante expressiva comparada as descritas por outros trabalhos. Leite et al. (2008) obtiveram 7,0 U/mL após 72 horas de cultivo do fungo *Thermoascus aurantiacus* em farelo de trigo. Delabona et al. (2012) obtiveram 105,82 U/g de β -glicosidase cultivando o fungo *Aspergillus fumigatus* por 96 horas em farelo de trigo. Adsul et al. (2004) utilizaram bagaço de cana para cultivar o fungo *Penicillium janthinellum*, os autores relatam a produção de 2,3 U/mL de β -glicosidase após 192 horas de cultivo. Xin e Geng (2010) obtiveram 61.6 U/g de β -glicosidase com *Trichoderma reesei* cultivado a 26°C por 192 horas em lascas de madeira. Ng et al. (2010) relatam a produção de 159,1 U/g pelo fungo *Penicillium citrinum* YS40 -5 cultivado em farelo de arroz por 96 horas. A produção de β -glicosidase pelo fungo *Colletotrichum graminicola* foi otimizada por Zimbardi et al. (2013) obtendo o máximo de produção, 159,3 U/g, em farelo de trigo por 168 horas. Silva et al. (2013) relatam a produção de 0,061 U/ml de β -glicosidase pelo fungo *Lichtheimia ramosa* em resíduo de pequi (fruta típica do cerrado) após 48 horas de cultivo em estado sólido.

O extrato enzimático obtido nas condições ideais de cultivo, para a produção da enzima, foi utilizado nas etapas subsequentes de caracterização bioquímica da β -glicosidase.

3.2. Caracterização da β -glicosidase produzida pelo fungo *Lichtheimia ramosa*

3.2.1. Efeito do pH e temperatura

A β -glicosidase produzida pelo fungo *L. ramosa* apresentou maior atividade catalítica em pH 5,5 a temperatura de 65°C (Figuras 2A e 2B). A enzima ainda apresenta expressiva atividade em pH 5,0 e 6,0, sendo possível observar significativa queda na atividade a medida que o pH se distancia dos valores descritos como ótimos.

Surpreendentemente a enzima apresentou maior atividade catalítica em temperaturas superiores a 50°C, fato não observado corriqueiramente em enzimas

produzidas por microrganismos mesófilos, apesar de trabalhos anteriores relatarem a produção de β -glicosidases extremamente estáveis por linhagens mesófilas (LEITE et al., 2007; LEITE et al., 2008). Belancic et al. (2003) descreveram pH 5,0 e 40°C como ótimo para β -glicosidase produzida por *Debaryomyces vanrijae*. A maioria das β -glicosidases fúngicas exibem temperaturas ótimas entre 40 e 50°C, e ótimos de pH entre 4,0 e 6,0 (BHATIA et al., 2002; SARRY; GUNATA, 2004; LANGSTON., 2006; BAFFI et al., 2011).

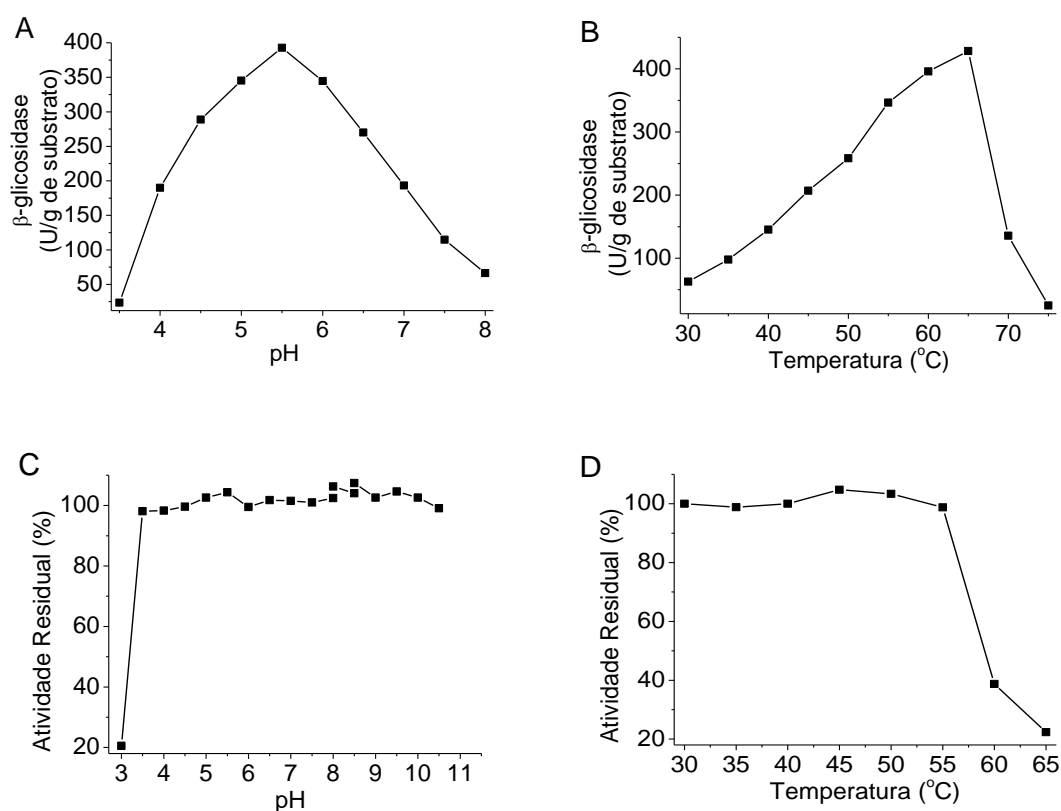


Figura 2: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática. **A)** pH ótimo; **B)** Temperatura ótima; **C)** pH de estabilidade; **D)** Temperatura de estabilidade.

A β -glicosidase produzida pelo fungo *L. ramosa* apresentou expressiva estabilidade estrutural. A enzima manteve sua atividade original após 24h de incubação entre pH 3,5 a 10,5 (Figura 2C). Quanto à estabilidade térmica, cerca de 90% da atividade catalítica foi recuperada após 1 hora a 55°C (Figura 2D).

Os resultados obtidos ficam ainda mais significativos quando comparados com dados descritos na literatura científica. β -glicosidases produzidas por diferentes espécies de *Penicillium* apresentaram estabilidade de pH 4,0 a 6,0 (RAMANI et al., 2012; KROGH et al., 2010; JEYA et al., 2010). A β -glicosidase produzida pelo fungo

Xylaria regalis manteve aproximadamente 78% da atividade após 30 minutos a 50°C (WEI et al., 1996). A enzima produzida pelo fungo *Thichoderma harzianum* apresentou estabilidade em temperaturas inferiores a 55°C por 15 minutos, mantendo apenas 36% da atividade inicial após 15 minutos a 60°C (YUN et al., 2001). Peralta et al. (1997) relatam que a β -glicosidase produzida pelo fungo termófilo *Humicola grisea* var. *thermoidea* manteve sua estabilidade estrutural até 60°C. Delabona et al. (2013) descrevem a estabilidade da β -glicosidase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* P40M2 em temperaturas de 40 a 60°C e na faixa de pH 3,0 a 5,5. A β -glicosidase produzida pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* manteve sua atividade catalítica por 1 hora a 40°C, em temperaturas superiores, foi recuperado apenas 30% da atividade inicial (BAFFI et al., 2011).

3.2.2. Efeito de etanol e glicose

O efeito de etanol sobre atividade enzimática é imprescindível em estudos com β -glicosidase, considerando que estas enzimas geralmente são expostas a concentrações substanciais de álcool em diversas aplicações industriais (SUN; CHENG, 2002).

A Figura 3A apresenta o efeito de diferentes concentrações de etanol (0 – 30%) sobre a atividade enzimática. Concentrações próximas a 5% de etanol potencializaram a atividade enzimática, aumentando em cerca de 20% a atividade inicial. Quando a concentração foi elevada para 15% de etanol, foi recuperado apenas 22% da atividade original da enzima. No entanto, em concentrações iguais a 10% de etanol, a β -glicosidase manteve sua atividade catalítica idêntica ao controle, isto é, não apresentou alteração na atividade funcional. Considerando que, as concentrações finais de etanol nos caldos fermentados obtidos por processos tradicionais giram em torno de 10% (GU et al., 2001), é possível inferir que a enzima é suficientemente estável para ser aplicada em processos fermentativos contendo etanol.

O aumento do potencial catalítico pelo etanol está associado a atividade glicosiltransferase (VILLENA et al., 2006). O etanol pode aumentar a velocidade da reação atuando como aceptor preferencial dos resíduos glicosil durante a catálise enzimática (BARBAGALLO et al., 2004). A hidrólise e a transglicosilação ocorrem através da mesma rota bioquímica, diferindo apenas a natureza do aceptor final (ZOROV et al., 2001; BHATIA et al., 2002).

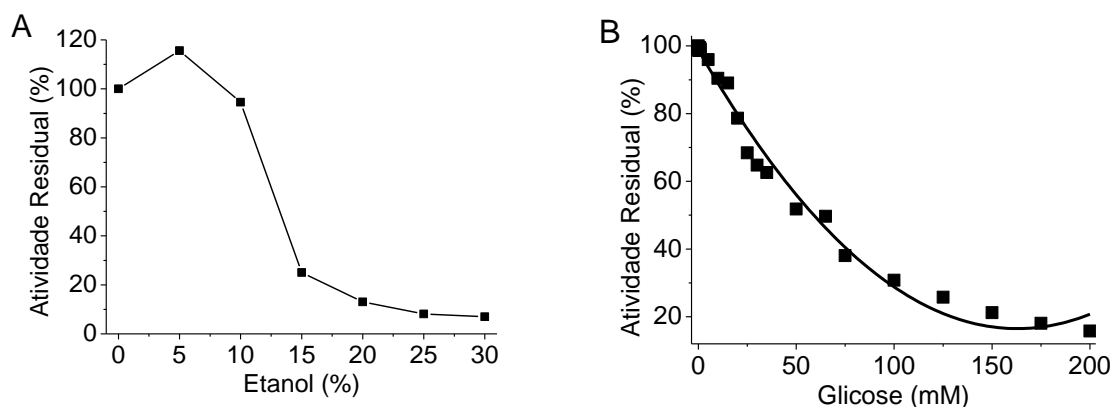


Figura 3: Efeito do etanol (A) e glicose (B) sobre a atividade da β -glicosidase produzida pelo fungo *L. ramosa*.

Diferentes concentrações de glicose foram adicionadas na mistura de reação para avaliar o comportamento da β -glicosidase na presença deste inibidor. A enzima foi fortemente inibida por glicose, mantendo cerca de 30% de sua atividade original na reação realizada com 100 mM de glicose (Figura 3B).

A grande maioria das β -glicosidases microbianas apresenta inibição por glicose, sendo um dos principais problemas na utilização desta enzima em processos industriais (ZANOELO et al., 2004; LEITE et al., 2008). Elevadas concentrações de glicose podem interferir direta ou indiretamente na ligação do substrato ao sítio ativo da enzima, reduzindo assim a velocidade da reação (SINGHANIA et al., 2013). No presente trabalho, a inibição da β -glicosidase produzida pelo fungo *L. ramosa* foi completamente revertida, quando a concentração do substrato foi elevada para mesma concentração de glicose, indicando que a interação da enzima com o inibidor é competitiva (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade residual em concentrações diferentes de substrato (pNP β G) e inibidor.

Enzima	At. Residual (%) PNPG – 2 mM	At. Residual (%) PNPG – 2 mM Glicose – 50 mM	At. Residual (%) PNPG – 50 mM Glicose – 50 mM	Tipo de inibição
<i>L. ramosa</i>	100	51,07	158,66	Competitiva

A inibição competitiva pode ser revertida pelo aumento da concentração do substrato, o mesmo não pode ser observado na inibição não competitiva. Na inibição competitiva o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação da enzima (neste caso o sítio ativo), dessa forma, o aumento da concentração de substrato para valores iguais ou superiores aos do inibidor, favorece a ligação enzima ao substrato, refletindo na reversibilidade da inibição enzimática (CAMPBELL, 2000).

A reversibilidade da inibição por glicose e a estabilidade ao etanol apresentada pela enzima, confirmam o potencial desta β -glicosidase para a aplicação em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (LEITE et al., 2008), onde os monossacarídeos liberados pela hidrólise enzimática são simultaneamente convertidos em etanol por microrganismos fermentadores (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

3.3. Avaliação do perfil catalítico do extrato enzimático

O potencial do fungo *L. ramosa* para produção de outras hidrolases de degradação de parede vegetal também foi avaliado (Tabela 3). O extrato enzimático obtido pelo cultivo do microrganismo nas condições otimizadas, apresentou atividades de CMCCase (152,1 U/g), xilanase (28,5 U/g) e de β -xilosidase (115,7 U/g).

Tabela 3: Potencial catalítico do extrato enzimático obtido pelo cultivo em estado sólido do fungo *L. ramosa* em farelo de trigo contendo 65% de umidade, com pH inicial 5,0, incubado por 96 h a 35°C.

Enzima	Substrato	U/mL	U/g
β – glicosidase	p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G)	23,47	237,7
β – glicosidase	Celobiose	23,45	234,5
CMCase	Carboximetilcelulose	15,21	152,1
Xilanase	Xilana	2,85	28,5
β - xilosidase	p-nitrofenil- β -D xilopiranosídeo(pNPX)	11,57	115,7

Apesar da produção de CMCCase e Hemicelulases pelo fungo *L. ramosa* não ser muito expressiva, quando comparado a linhagens hiper-produtoras, a ausência de trabalhos descrevendo as características destas enzimas estimulam a continuidade deste estudo. Da-Silva et al. (2005) relataram a produção de 60 U/mL de CMCCase e 107U/mL pelo cultivo do fungo *Thermoascus aurantiacus* em estado sólido, utilizando sabugo de milho como substrato. Delabona et al. (2012) relatam a produção de 160,1 U/g de CMCCase e 1055,62 U/g de xilanase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* cultivado em resíduos agroindustriais.

Outra informação interessante demonstrada na tabela 3 é o expressivo potencial da enzima de hidrolisar celobiose, alcançando valores similares aos obtidos com substrato sintético (pNPG). As β -glicosidases microbianas podem ser classificadas em três grandes grupos: (1) Aril β -glicosidases são enzimas que apresentam elevada especificidade para hidrolisar substratos aril-glicosídeos; (2) celobiasas verdadeiras são enzimas com elevada especificidade para hidrolisar celobiose e (3) enzimas com baixa

especificidade, que atuam em diferentes tipos de substratos (BHATIA et al., 2002; VILLENA et al., 2006). Aparentemente, a β -glicosidase do fungo *L. ramosa* possui baixa especificidade, isto é, apresenta potencial para hidrolisar diferentes substratos glicosídeos. No entanto, para confirmação desta hipótese novos estudos deverão ser realizados com a enzima purificada. Segundo Bhatia et al. (2002) a maioria das β -glicosidases microbianas são classificadas no terceiro grupo.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descritos permitem inferir que o fungo *L. ramosa* apresenta expressiva produção de β -glicosidase, quando cultivado em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato. A otimização das condições de cultivo microbiano para produção de β -glicosidase, resultou no aumento de 68% na quantidade desta enzima no extrato enzimático, obtido com os parâmetros fermentativos definidos como ótimos, o que reforça a importância deste tipo de trabalho. O microrganismo *L. ramosa* também apresentou potencial para produção de CMCase e β -xilosidase, nas condições de cultivo anteriormente descritas.

A β -glicosidase demonstrou elevada estabilidade ao pH e à temperatura, manteve sua atividade original em concentrações próximas a 10% de etanol e a inibição exercida pela glicose foi totalmente revertida, em concentrações elevadas de substrato. Aparentemente, a enzima apresenta potencial para hidrolisar diferentes substratos glicosídeos. Os resultados obtidos nos permitem inferir que a β -glicosidase produzida pelo fungo *L. ramosa* apresentam ampla aplicabilidade industrial, justificada pelas suas características e pela elevada produção em meios de cultivo de baixo valor agregado (resíduos), podendo ser utilizada em processos para obtenção de etanol de segunda geração, assim como, na indústria de sucos e bebidas.

3.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

3.6 REFERÊNCIAS

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H., BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 67-72, 2004.

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DA SILVA, R.. Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 333-346, 2010.

BAFFI, M.A.; TOBAL, T.M.; HENRIQUE, J.; LAGO, G.; LEITE, R.S.R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. e DA-SILVA, R. A Novel β -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking. *Journal of Food Science*, v. 76, p.C997-C1002, 2011.

BAKRI, Y., M. JAWAHAR AND M.I.E. ARABI. Improvement of xylanase production by *Cochliobussativus* in submerged culture. *Food Technology and Biotechnology*, v.46 (1), p.116-118, 2008.

BARBAGALLO, R.N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeast employable for enological applications. *Enzyme and Microbial technology*, v. 35, p. 58-66, 2004.

BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, Marie-Jose and AGOSIN, Eduardo. β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a muscat grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, no. 5, p.1453-1459, 2003.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, p. 375-407, 2002.

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 Biochemistry*, v. 45, p. 120 – 128, 2010.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica. Porto Alegre, Artmed, cap.12, p. 410-439, 2000.

CARDONA C.A.; SÁNCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova. São Paulo*. v. 33, n. 1, p. 1-12, 2010.

DA-SILVA, R.; LAGO, E.S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y.K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 235-241, 2005.

DEL BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). *Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica*. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 13. p. 247-276, 2001.

DELABONA, P.D.S, PIROTA, R.D.P.B., CODIMA, C.A., TREMACOLDI, C.R., RODRIGUES, A. FARINAS, C.S. Using Amazon Forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 243-250, 2012.

DELABONA, P.D.S; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and Products*, v. 42, n. 0, p. 236-242, 2013.

DESWAL, D.; KHASA, Y.P.; KUHAD, R.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6065-6072, 2011.

DHAKE, A.B.; PATIL, M.B. Production of β -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p.170-176, 2005.

ELLAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*, v.38, p.615–620, 2002.

FARINAS, C. S.; LEMOS, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. *Boletim Técnico Embrapa*, 2008.

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

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

HAQ I, JAVED MM, KHAN TS. An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-1 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African Journal of Biotechnology*, v.5 (8) p.609-614, 2006.

HAQUE, M. A.; SHAMS-UD-DIN, M.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 453-62, 2002.

JEYA, M.; JOO AR.; LEE KM.; TIWARI MK.; LEEKM.; KIM SH.; Lee, JK. Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.86 p.1473-84, 2010.

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

KROGH KB, HARRIS PV, OLSEN CL, JOHANSEN KS, HOJER-PEDERSEN J, BORJESSON J ET AL. Characterization and kinetic analysis of athermostable GH3 β -glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.86 p.143-54, 2010.

LANGSTON, J., SHEEHY, N. AND XU, F. Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 β -glucosidase. *Biochimica Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, v.1764, p. 972-978, 2006.

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

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.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NG IS, LI C-W, CHAN S-P, CHIR J-L, CHEN PT, TONG C-G, YU S-M, HO T-HD. High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran, *Bioresource Technology*, v. 101,p. 1310-1317, 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*,v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.2-3, p. 81-84, 2003.

PERALTA, R.M.; KADOWAKI, M.K.; TERENCE, H.F.; JORGE, J.A. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea*, var *thermoidea*: Purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiology Letters*, v. 146, p. 291 295, 1997.

RAJOKA MI, KHAN S, LATIF F, SHAHID R. Influence of carbon and nitrogen sources and temperature on hyperproduction of a thermotolerant β -glucosidase from synthetic medium by *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 117(2) p. 75-92, 2004.

RAJOKA, M.I., M.W. AKHTAR, A. HANIF AND A.M. KHALID. Production and characterization of a highly active cellobiose from *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.22 (9) p. 991-998, 2006.

RAMANI G, MEERA B, VANITHA C, RAO M, GUNASEKARAN P. Production, purification, and characterization of a β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 167 p.959-72, 2006.

SARRY, J.E.; GUNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, v. 87, p. 509-521, 2004.

SHAHRIARINOUR, M.; WAHAB, M.N.A.; MOHAMAD, R.; MUSTAFA, S.; ARIFF, A.B. Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 38, p. 7459-746, 2011.

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.; 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*. New York. v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SUKUMARAN, R.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of β -glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 127, p. 500-507, 2013.

SONJOY, S.B.; BEX, K.; HONSTON, H. Cellulase activity of *Trichoderma reesei* (RUT-C30) on municipal solid waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.51-52, p.145-153, 1995.

SUKUMARAN, R.K., R.R. SINGHANIA, G.M. MATHEW AND A. PANDEY. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol 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.

VILLENA, M.A.; IRANZO, J.F.U.; GUNDLLAPALLI, S.B.; OTERO, R.R.C.; PÉREZ, A.I.B. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudo polymorphus*. *Enzyme Microbial Technology*, v.39, p. 229-234, 2006.

WEI, D.L.; KIRIMURA, K.; USAMI, S.; LIN, T.H. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood grown fungus *Xylaria regalis*. *Current Microbiology*, v. 33, p. 297-301, 1996.

XIN, FENGXUE; GENG, ANLI. Horticultural Waste as the Substrate for Cellulase and Hemicellulase Production by *Trichoderma reesei* Under Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* vol. 162, p. 295 – 306, 2010.

YUN, S.I.; JEONG, C.S.; CHUNG, D.K.; CHOI, H.S. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type c-4. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 65, p. 2028-2032, 2001.

ZIMBARDI ALRL, SEHN C, MELEIRO LP, SOUZA FHM, MASUI DC, NOZAWA MSF, GUIMARÃES LHS, JORGE JA, FURRIEL RPM. Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification. *International Journal of Molecular Sciences*, v.14 (2) p. 2875-2902, 2013.

ZOROV, I.N.; GUSAKOV, A.V.; BARAZNENOK, V.A.; BEKKAREVICH, A.O.; OKUNEV, O.N.; SINITSYN, A.P.; KONDRAT'EVA, E.G. Isolation and properties of cellobiase from *Penicillium verruculosum*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.37, p. 587-592, 2001.