



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus São José do Rio Preto

Jaqueline Elaine Vaz

Avaliação das condições de cultivo para assimilação de xilose e secreção de enzimas e peptídeos pelas leveduras isoladas do ambiente

São José do Rio Preto

2020

Jaqueline Elaine Vaz

Avaliação das condições de cultivo para assimilação de xilose e secreção de enzimas e peptídeos pelas leveduras isoladas do ambiente

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2018/07036-4

CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

Co-orientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

São José do Rio Preto

2020

V393a Vaz, Jaqueline Elaine
Avaliação das condições de cultivo para assimilação de xilose e secreção de enzimas e peptídeos pelas leveduras isoladas do ambiente / Jaqueline Elaine Vaz. -- São José do Rio Preto, 2020
142 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Eleni Gomes
Coorientador: Ronivaldo Rodrigues da Silva

1. Microbiologia. 2. Leveduras. 3. Enzimas de leveduras. 4. Caracterização enzimática. 5. Assimilação de xilose. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Jaqueline Elaine Vaz

Avaliação das condições de cultivo para assimilação de xilose e secreção de enzimas e peptídeos pelas leveduras isoladas do ambiente

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2018/07036-4

CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Eleni Gomes

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Dra. Marcia Maria de Souza Moretti

UNESP – São Jose do Rio Preto

Dr. José Erick Galindo Gomes

UNORP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

09 de abril de 2020

Aos meus pais, Carlos Alberto Vaz e Maria Helena de
Oliveira Vaz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde e por me dar forças para vencer os obstáculos que encontrei no meu caminho ao longo do mestrado.

À minha orientadora, Prof. Dr. Eleni Gomes, pela oportunidade, confiança e paciência ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva, por ter sido sempre tão presente e paciente comigo, sou imensamente grata por todas as ajudas, pelos seus ensinamentos e conhecimentos compartilhados!

Aos meus pais, Carlos e Maria, e irmão, Diego, por terem sido sempre meu porto-seguro, mesmo que tão longe de casa, me amando, incentivando e dando todo o apoio que necessitei. Sou eternamente grata por poder ter pessoas como vocês em minha vida e poder chamar de família. Amo muito vocês!!!

Ao meu amigo, e irmão de toda uma vida acadêmica, Eduardo, por toda a parceria, por ter sido minha companhia diária no laboratório e na vida. Com você compartilhei todas minhas dúvidas, ansiedades, conquistas e alegrias. Você é sem dúvidas o maior presente que a graduação me deu!

Aos meus amigos, Dioni e Daniela, por não deixarem que 700 km de distância fizessem com que eu me sentisse menos amada. Obrigada por sempre me ouvirem, reconfortarem e me lembrarem o quão forte e inteligente sou!

Aos meus amigos, digo, presentes, de mestrado, Daniel e Tamara, por terem sido pessoas incríveis, compartilharem conhecimentos e, principalmente, tornarem esse período da minha vida mais leve e repleto de bons momentos.

Ao meu namorado, Sami, por ter sido a minha família aqui em Rio Preto. Sou eternamente grata por ter feito com que o período que passei aqui fosse maravilhoso, obrigada por sempre confiar no meu potencial, incentivar, amparar e me amar!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia aplicada, especialmente Gabi Okamura, Lorena, Carlos Eduardo, Cintia, Maite, Diego e Janaína, por todas as ajudas, aprendizagens e prazerosa convivência.

À Unesp e a todos os seus funcionários, em especial aos docentes e funcionários da Seção de Pós-Graduação, que permitiram com que esse objetivo fosse alcançado. Obrigada Ibilce, por me permitir experimentar a vida e integração universitária que não tive na graduação. Meu coração vai ser sempre azul!

À FAPESP, pela concessão da bolsa (Processo nº 2018/07036-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

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

Todos que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho, muito obrigada!

RESUMO

As leveduras são organismos quimiorganotróficos que utilizam principalmente glicose como fonte de energia e carbono. Além da glicose, outros açúcares fermentescíveis se encontram em abundância na natureza e têm sido subaproveitados na indústria, dos quais se destaca a xilose. Para algumas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, a utilização de pentoses é limitada pela carência de transportadores de membrana específicos e enzimas intracelulares para a metabolização deste açúcar. Entretanto, algumas leveduras são capazes de utilizar xilose como fonte de carbono e bioconverte-la em produtos como etanol, ácidos orgânicos ou peptídeos. Isso implica na existência de um sistema de transporte e enzimas intracelulares para metabolizá-la. Neste contexto, a prospecção de enzimas auxiliares despolimerizantes do material lignocelulósico, tais como β -glicosidases e α -L-arabinofuranosidases, também assume função importante para obtenção de açúcares fermentescíveis. Além disso, poucos estudos estão disponíveis a respeito da produção de peptídeos bioativos por leveduras, quais podem ser fontes promissoras de produção dos mesmos. Sendo assim, o presente trabalho buscou investigar o consumo de xilose, a produção de peptídeos com atividade biológica e a produção de β -glicosidases pelas espécies *Pichia ofunaensis* e *Trichosporon multisporon*, assim como a produção de α -L-arabinofuranosidases por *Aureobasidium pullulans* e *A. leucospermi*. As enzimas foram prospectadas utilizando farelo de trigo como substrato em cultivo em estado sólido e em seguida a caracterização bioquímica funcional das enzimas foi realizada. Quanto a assimilação de xilose, foram avaliados o crescimento celular e o consumo deste açúcar pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisporon* cultivadas em meio YEPX em diferentes pH iniciais: 4,5; 6,5 e 8,5; e temperaturas: 28, 32 e 36 °C. Por fim, foi avaliado a presença de peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana nos meios em que as leveduras foram cultivadas. Em nossos resultados, observamos maior atividade para β -glicosidases a pH 5,5-6 e 50-60 °C (*P. ofunaensis*, com 0,40 U mL⁻¹), e pH 5,5-6 e 55 °C (*T. multisporon*, com 0,21 U mL⁻¹). Ambas as β -glicosidases foram tolerantes ao etanol, metanol, isopropanol e acetona nas concentrações avaliadas. As α -L-arabinofuranosidases exibiram máxima atividade a pH 5,5-6,5 e 60-70 °C (*A. pullulans*, com 0,11 U mL⁻¹), e pH 5,0-7,5 e 60 °C (*A. leucospermi*, com 0,12 U mL⁻¹). A α -L-arabinofuranosidase produzida por *A. pullulans* exibiu maior tolerância a etanol do que a enzima produzida por *A. leucospermi*. Quanto ao consumo de xilose, as leveduras demonstraram melhor desempenho a pH inicial 4,5, indicando que o transporte de xilose tem sido realizado em associação com H⁺. Ainda, *P. ofunanesis* apresentou consumo mais rápido de xilose em 32/36 °C, enquanto *T. multisporon* em 28 °C. A análise do antibiograma para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* não resultou em formação de halo de inibição, indicando assim não ter sido secretado pelas leveduras moléculas que tivessem ação bactericida/bacteriostática, concluindo não ter ocorrido a produção de peptídeos bioativos de caráter antimicrobiano por estas leveduras. As informações obtidas aqui permitiram conhecer o perfil metabólico de consumo de xilose pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisporon* e as propriedades bioquímicas das enzimas secretadas pelas leveduras deste estudo. Estes resultados contribuirão para estudos futuros de clonagem e expressão heteróloga destas enzimas, assim como para aprofundar as investigações sobre os transportadores envolvidos no transporte de xilose.

Palavras-chave: β -glicosidases, α -L-arabinofuranosidases, caracterização enzimática, pentose, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Yeasts are chemorganotrophic organisms that mainly use glucose as a source of energy and carbon. In addition to glucose, other fermentable sugars are found in abundance in nature and have been underutilized in the industry, of which xylose stands out. For some yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae*, the use of pentoses is limited by the lack of specific membrane transporters and intracellular enzymes for the metabolization of this sugar. However, some yeasts are able to use xylose as a carbon source and bioconvert it into products such as ethanol, organic acids or peptides. This implies the existence of a transport system and intracellular enzymes to metabolize it. The fermentation of pentoses is an essential step to improve the yield in the production of ethanol and organic acids. In this context, the prospection of depolymerizing auxiliary enzymes of lignocellulosic material, such as β -glycosidases and α -L-arabinofuranosidases, also plays an important role in obtaining fermentable sugars. In addition, few studies are available regarding the production of bioactive peptides by yeasts, which can be promising sources of their production. Thus, the present work sought to investigate the consumption of xylose, the production of peptides with biological activity and the production of β -glycosidases by the species *Pichia ofunaensis* and *Trichosporon multisporon*, as well as the production of α -L-arabinofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* and *A. leucospermi*. The enzymes were prospected using wheat bran as a substrate in solid state fermentation and then the functional biochemical characterization of the enzymes was performed. Regarding xylose assimilation, were evaluated the cell growth and consumption of this sugar by the yeasts *P. ofunaensis* and *T. multisporon* cultivated in YEPX medium at different initial pH: 4.5; 6.5 and 8.5; and temperatures: 28, 32 and 36 °C. Finally, the presence of bioactive peptides with antimicrobial activity in the media in which the yeasts were grown was evaluated. In our results, we observed greater activity for β -glycosidases at pH 5.5-6 and 50-60 °C (*P. ofunaensis*, with 0.40 U mL⁻¹), and pH 5.5-6 and 55 °C (*T. multisporon*, with 0.21 U mL⁻¹). Both β -glycosidases were tolerant to ethanol, methanol, isopropanol and acetone at the concentrations evaluated. α -L-arabinofuranosidases exhibited maximum activity at pH 5.5-6.5 and 60-70 °C (*A. pullulans*, with 0.11 U mL⁻¹), and pH 5.0-7.5 and 60 °C (*A. leucospermi*, with 0.12 U mL⁻¹). The α -L-arabinofuranosidase produced by *A. pullulans* exhibited greater tolerance to ethanol than the enzyme produced by *A. leucospermi*. As for the consumption of xylose, yeasts showed better performance at initial pH 4,5, indicating that the transport of xylose has been carried out in association with H⁺. In addition, *P. ofunanesis* showed faster consumption of xylose at 32/36 °C, while *T. multisporon* at 28 °C. The analysis of the antibiogram for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* did not result in the formation of an inhibition halo, thus indicating that molecules that had bactericidal / bacteriostatic action were not secreted by the yeasts, concluding that the production of bioactive peptides of antimicrobial character by these yeasts did not occur. The information obtained here demonstrated the capacity of xylose consumption by the yeasts *P. ofunaensis* and *T. multisporon* and the biochemical properties of the enzymes secreted by the yeasts. These results will contribute to future studies of cloning and heterologous expression of these enzymes, as well as to further investigate the transporters involved in the transport of xylose.

Keywords: β -glycosidases, α -L-arabinofuranosidases, enzymatic characterization, solid state fermentation, agroindustrial residues.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Visão geral completa do transporte de hexose e pentose nas células de levedura e metabolismo adicional à produção de etanol.....24
- Figura 2.** Principais componentes e estrutura da lignocelulose.....25
- Figura 3.** Estrutura da molécula de celulose, apontando os monômeros de glicose e celobiose.....26
- Figura 4.** Estrutura da celulose. A) esquema mostrando organização das fibrilas e microfibrilas de celulose, com as regiões amorfas e cristalinas. B) Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre unidades de glicose da mesma cadeia (intra).....26
- Figura 5.** Esquemática da estrutura de uma xilana de planta hipotética.....27
- Figura 6.** Ação catalítica das enzimas celulases.....32
- Figura 7.** Estrutura da arabinoxilana com a ação de algumas enzimas do complexo hemicelulolítico.....33

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Cultivo em meio YEPD da levedura *P. ofunaensis* (A) e *T. multisoron* (B).....54
- Figura 2.** Assimilação de xilose (A), crescimento celular (B) e variação de pH dos meios (C) contendo 2% de xilose (YEPX) com pH inicial 4,5, 6,5 e 8,5 de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* cultivadas a 28 °C, 200 rpm. Os valores são expressos como média (n = 6) ± desvio padrão.....60
- Figura 3.** Assimilação de xilose (A), crescimento celular (B) e variação de pH dos meios (C) contendo 2% de xilose (YEPX) com pH inicial 4,5 de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* cultivadas a 28, 32 e 36 °C, 200 rpm. Os valores são expressos como média (n = 6) ± desvio padrão.....64
- Figura 4.** Assimilação de glicose em YEPD e avaliação da presença de açúcares em YEP (A), crescimento celular (B) e variação de pH do meio (C) contendo 2% de glicose (YEPD) e sem adição de açúcar (YEP) com pH inicial 4,5 de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* cultivadas a 28 °C, 200 rpm. Os valores são expressos como média (n = 6) ± desvio padrão.....67
- Figura 5.** Antibiograma de disco-difusão em meio sólido Mueller-Hinton. Placas incubadas após 18 horas a 37 °C com cultivo de *Escherichia coli* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) contendo discos embebidos em filtrado de meio YEPX coletadas em 4, 48 e 96 horas de cultivo,

em duplicata, das fermentações de *P. ofunaensis* (1) e *T. multisoron* (2) com pH inicial 4,5 a 28 °C.....70

CAPÍTULO III

Figura 1. Cultivo em meio YEPD da levedura *P. ofunaensis* (A) e *T. multisoron* (B).....79

Figura 2. Saco de cultivo contendo farelo de trigo e solução salina.....80

Figura 3. Sistema de bancada QSM-03SP QuixStand com bomba peristáltica e cartucho de fibra oca tamanho Xampler 4M.....81

Figura 4. Gráfico indicando a relação entre atividade enzimática relativa (%) e tempo (horas) para produção das enzimas β -glicosidase em bioprocessamento em estado sólido por *P. ofunaensis* e *T. multisoron* durante 288 horas, utilizando pNPG 4 mM diluído em tampão acetato pH 5,0 0,1M. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....89

Figura 5. Efeito do pH (A) e temperatura (B) sobre as atividades de β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, utilizando como substrato pNPG 4 mM diluído em tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M, para ensaio de pH, e em tampão MÊS 0,1 M pH 5,5, para temperatura. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....90

Figura 6. Efeito do pH sobre estabilidade das β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* após incubação a 4 °C (A) e 25 °C (B) por 24 horas, em ausência de substrato. A reação foi feita utilizando pNPG a 4 mM. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....91

Figura 7. Efeito da temperatura sobre as atividades das β -glicosidases de *P. ofunaensis* (A) e *T. multisoron* (B), quando incubadas por 15, 30 e 60 minutos nas temperaturas de 30-70 °C, com intervalo de 5 °C, em ausência de substrato. A reação foi feita utilizando pNPG a 4 mM diluído em tampão MÊS 0,1M pH 5,5. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....92

Figura 8. Efeito do pH (A) e temperatura (B) sobre as atividades de β -glicosidases de *P. ofunaensis* e de *T. multisoron* utilizando como substrato D-celobiose 1% diluída em tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M, para ensaio de pH, e diluído em tampão MÊS 0,1 M pH 5,5, para ensaio de temperatura. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....93

Figura 9. Efeito de solventes orgânicos etanol (A), metanol (B), isopropanol (C) e acetona (D) nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% na atividade de β -glicosidase de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....103

Figura 10. Efeito do etanol na concentração de 15% e tampão MES pH 3,5 e 5,5 ao longo de 120 horas nas atividades de β -glicosidasas de *P. ofunaensis* (A) e *T. multisoron* (B). Foi utilizado como substrato pNPG 4 mM diluído em tampão 0,1M correspondente das condições de incubação. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....105

Figura 11. Efeito dos açúcares glicose (A), celobiose (B) e xilose (C) sobre a atividade das β -glicosidasas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Glicose e xilose foram avaliadas nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810, 945, 1080, 1350 e 1615 mM. E celobiose nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675 e 810 mM. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....108

CAPÍTULO IV

Figura 1. Cultivo meio YEPD da levedura *A. pullulans* (A) e *A. leucospermi* (B).....124

Figura 2. Saco de cultivo contendo farelo de trigo e solução salina.....125

Figura 3. Gráficos indicando a relação entre atividade relativa (%) e tempo (horas) para produção da enzima α -L-arabinofuranosidase em bioprocesso em estado sólido das leveduras *A. pullulans* e *A. leucospermi* durante 288 horas, utilizando pNPA 2 mM diluído em tampão acetato 0,1 M pH 5,0. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....129

Figura 4. Efeitos do pH (A) e temperatura (B) sobre atividade de α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. Foi utilizado como substrato pNPA 2 mM diluído em tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M, para ensaio de pH, e em tampão MES 0,1M pH 6,0, para ensaio de temperatura. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....131

Figura 5. Efeito do pH em incubação por 24 horas a 4 °C (A) e a 25 °C (B), nas atividades de α -L-arabinofuranosidasas produzidas *A. pullulans* e *A. leucospermi*. A reação foi feita utilizando pNPA a 4 mM. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....133

Figura 6. Efeito da temperatura sobre as atividades de α -L-arabinofuranosidasas de *A. pullulans* (A) e de *A. leucospermi* (B) quando incubadas por 15, 30 e 60 minutos nas temperaturas de 30-80 °C, com intervalo de 5 °C, na ausência de substrato. Para reação foi utilizado pNPA 2 mM diluído em tampão MES 0,1M pH 6,0 como substrato. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....134

Figura 7. Efeito do etanol nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% na atividade de α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. Foi utilizado como substrato pNPA 2

mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 6,0. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.....135

Figura 8. Efeito dos açúcares glicose (A) e arabinose (B) sobre a atividade de α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. Glicose foi avaliada nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810, 945, 1080, 1350 e 1615 mM. E arabinose nas concentrações de 3, 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810 mM. Foi utilizado como substrato pNPA 2 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 6,0. Os valores são expressos como média (n = 3) ± desvio padrão.....137

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição química do farelo de trigo.....30

CAPÍTULO III

Tabela 1. Avaliação de atividade hidrolítica das soluções enzimáticas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* obtidas dos 12 dias de cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato sobre os substratos 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, 4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, 4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo, 4-Nitrofenil acetato (4 mM diluído em tampão acetato pH 5,0 0,1M); caseína (caseína 1% em tampão MES pH 6,5 à 0,1M); amido e carboximetilcelulose (amido e carboximetilcelulose, repectivamente, a 1%, em tampão acetato pH 5,0 a 0,1M). Presença de atividade sendo representada como (+) e ausência como (-).....88

Tabela 2. Influência de cátions nas concentrações de 5 e 10 mM sobre as atividades β -glicosídeses de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Os íons foram derivados sais de cloro. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....96

Tabela 3. Efeito dos reagentes β -Mercaptoetanol, SDS, EDTA e DDT e nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 mM na atividade de β -glicosíde de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....99

Tabela 4. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mM na atividade enzimática de β -glicosíde de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....110

Tabela 5. Avaliação da atividade hidrolítica da solução enzimática obtida de cultivo em estado sólido das leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron* sobre os substratos avicel, carboximetilcelulose, celobiose, xilana *beechwood* e amido (substratos a 1% foram diluídos em tampão MES 0,1 M pH 5,5); 4-Nitrofenil- β -D- xilopiranosídeo, 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, 4-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo e 4-Nitrofenil acetato (substratos a 4 mM foram diluídos em tampão MES 0,1 M pH 5,5); caseína (caseína 1% em tampão MES pH 6,5 à 0,1 M); D-(+)-Celobiose, maltose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose e D-(+)-Celotriose (substrato a 1% diluído em tampão MES pH 5,5 0,1M). Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....112

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Atividades de α -L-arabinofuranosidase obtidas das reações da solução enzimática de *A. pullulans* e *A. leucospermi* utilizando como substrato pNPA 2 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 6,0 a 60 °C (condições ótimas de pH e temperatura). Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.....130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>
Da	Dalton
DNS	Ácido 3, 5 - Dinitrossalicílico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
min	Minuto
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica
pH	Potencial Hidrogeniônico
pNPA	4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosideo
pNPG	4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosideo
pNPX	4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosideo
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCA	Ácido tricloroacético
U	Unidade de atividade enzimática
xg	Força centrífuga

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Introdução e Revisão Bibliográfica.....	18
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE.....	21
2.2 TRANSPORTE DE XILOSE EM LEVEDURAS.....	23
2.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	24
2.4 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	28
2.4.1 RESÍDUOS DE TRIGO.....	29
2.5 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS.....	30
2.5.1 Celulases.....	30
2.5.2 Hemicelulases.....	32
2.6 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE B-GLICOSIDASES E A-L-ARABINOFURANOSIDASES.....	34
2.7 PEPTÍDEOS E SUA PRODUÇÃO POR MICRORGANISMOS.....	37
3. OBJETIVO GERAL.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO II - Avaliação das melhores condições de assimilação de xilose e investigação da produção de peptídeos antimicrobianos pelas leveduras <i>Pichia ofunaensis</i> e <i>Trichosporon multisporon</i>.....	51
RESUMO.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. OBJETIVOS.....	54
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1 OS MICRORGANISMOS.....	54
3.2 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS NOS MEIOS CONTENDO XILOSE E GLICOSE.....	55
3.3 QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO, AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DE PH E ASSIMILAÇÃO DE AÇÚCARES DOS MEIOS DE CULTIVO CONTENDO GLICOSE E XILOSE.....	55
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR ANTIBIOGRAMA DE DISCO-DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 AVALIAÇÃO DA ASSIMILAÇÃO, CRESCIMENTO E VARIAÇÃO DO PH DOS MEIOS CONTENDO XILOSE E GLICOSE.....	57
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR ANTIBIOGRAMA DE DISCO-DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO.....	68

5. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	72
CAPÍTULO III – Investigação da produção e caracterização de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelas leveduras <i>Pichia ofunaensis</i> e <i>Trichosporon multisporon</i> em cultivo em estado sólido contendo farelo de trigo.....	75
RESUMO.....	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. OBJETIVO.....	78
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
3.1 OS MICRORGANISMOS.....	78
3.2 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E OBTENÇÃO DE SOLUÇÃO ENZIMÁTICA.....	79
3.3 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	81
3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA FUNCIONAL DAS ENZIMAS.....	82
3.4.1 Influência do pH e temperatura na atividade e estabilidade das β-glicosidases.....	82
3.4.2 Efeito de íons metálicos e outras substâncias sobre as atividades das β-glicosidases.....	84
3.4.3 Efeito de solventes orgânicos sobre as atividades das β-glicosidases.....	85
3.4.4 Efeito de açúcares sobre as atividades das β-glicosidases.....	85
3.4.5 Efeito de compostos fenólicos sobre as atividades das β-glicosidases.....	86
3.4.6 Atividade enzimática sobre diferentes substratos.....	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.1 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS.....	87
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	89
4.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das β-glicosidases.....	89
4.2.2 Efeito de íons metálicos e outras substâncias sobre a atividade das β-glicosidases.....	94
4.2.3 Efeito de solventes orgânicos sobre a atividade das β-glicosidases.....	99
4.2.4 Efeito de açúcares sobre a atividade das β-glicosidases.....	105
4.2.5 Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade das β-glicosidases.....	109
4.3 AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES SUBSTRATOS.....	111
5. CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS.....	116
CAPÍTULO IV – Investigação da produção e caracterização de arabinofuranosidases produzidas por <i>Aureobasidium pullulans</i> e <i>A. leucospermi</i> em cultivo em estado sólido contendo farelo de trigo.....	121
RESUMO.....	122

1. INTRODUÇÃO.....	123
2. OBJETIVO.....	124
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	124
3.1. OS MICRORGANISMOS.....	124
3.2. CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E OBTENÇÃO DE SOLUÇÃO ENZIMÁTICA.....	125
3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	126
3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA FUNCIONAL DAS A-L-ARABINOFURANOSIDASES.....	126
3.4.1 Influência do pH e temperatura na atividade e estabilidade das α -L-arabinofuranosidases.....	127
3.4.2 Efeito de solvente orgânico sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidases.....	128
3.4.3 Efeito de açúcares sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidases.....	128
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	129
4.1 PRODUÇÃO DAS A-L-ARABINOFURANOSIDASES.....	129
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	130
4.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das α -L-arabinofuranosidases.....	130
4.2.2 Efeito de solvente orgânico sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidases.....	134
4.2.3 Efeito de açúcares sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidases.....	136
5. CONCLUSÕES.....	138
REFERÊNCIAS.....	139
CONCLUSÕES GERAIS.....	141

CAPÍTULO I

Introdução e Revisão bibliográfica

1. INTRODUÇÃO GERAL

A xilose é uma pentose encontrada constituindo a cadeia principal das xilanas, principal tipo de hemicelulose das paredes celulares vegetais. A xilose é o açúcar renovável mais abundante na biomassa vegetal depois da glicose, no entanto, diferente da glicose, a xilose não é fermentada por *Saccharomyces cerevisiae*, limitando o aproveitamento desse açúcar nas fermentações industriais para produção de etanol de segunda geração (ZUO et al., 2013). Entretanto, várias outras espécies de levedura apresentam a maquinaria de transporte e enzimática específica para metabolização desse açúcar (GONG et al, 1981; MCMILLAN, 1993; CHANDRAKANT, BISARIA, 1998). A assimilação de xilose por estas leveduras é dependente de vários fatores, tais como a concentração do açúcar, estado nutricional e condições físico-químicas de cultivo como: aeração, pH e temperatura (MCMILLAN, 1993). Essas cepas são capazes de produzir além do etanol, outros bioprodutos de alto valor agregado a partir da utilização da xilose como fonte de carbono, como glicolipídios, surfactantes (FARIA et al., 2014), arabitol e xilitol (GÍRIO et al, 2000), ácidos orgânicos, entre outros (CHEN, ZHU, XIA, 2014). A fermentação de pentoses é, portanto, uma etapa essencial para melhorar o rendimento na produção de etanol e bioprodutos a partir de biomassa vegetal.

As produções agrícola e agroindustrial são responsáveis por originar grandes quantidades de resíduos vegetais, os quais, por possuírem composição rica em açúcares, podem ser fontes abundantes de substrato para processos fermentativos e obtenção de produtos de alto valor agregado (REDDY et al., 2003; SÁNCHEZ, 2009). A produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por microrganismos que crescem utilizando resíduos agroindustriais como substrato têm sido amplamente realizadas e estudadas em função do potencial dessas enzimas para uso em diversos processos biotecnológicos (BHATIA et al., 2002).

As celulasas são enzimas que atuam de forma sinérgica no processo de conversão da celulose em glicose e incluem as endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidasas. As β -glicosidasas se destacam pela ampla gama de aplicações industriais como no processamento de alimentos, realce do aroma de vinhos (GONZÁLEZ-POMBO et al., 2011), melhoramento do sabor de chá e suco de frutas (KEERTI et al., 2014), produção de biocombustíveis (MÉNDEZ-LÍTER et al., 2017), liberação de compostos aromáticos (ZANG et al., 2018), entre outros.

Entre as hemicelulasas, enzimas responsáveis por degradarem todas as frações da hemicelulose da matéria lignocelulósica, existe um conjunto de enzimas que degradam a cadeia principal de xilano, as xilanasas e β -xilosidasas, e outras acessórias, responsáveis por clivarem as cadeias laterais da hemicelulose como as endomananases, β -manosidasases e α -L-

arabinofuranosidasas. As arabinofuranosidasas se destacam pelas inúmeras aplicações industriais que apresentam, como na produção de fármacos, alimentos, ração animal, têxteis, biocombustíveis, detergentes, entre outras (SAHA, 2000; NUMAN; BHOSLE, 2006; TERRONE, 2017).

Durante um processo fermentativo, além do produto alvo, diversos outros compostos químicos são liberados, os quais podem apresentar aplicabilidade industrial (ALBAEK et al., 2011). Sabe-se que microrganismos podem secretar peptídeos ou os produzirem a partir da hidrólise enzimática das proteínas presentes no meio de cultivo. Os peptídeos podem exercer uma grande variedade de funções, podendo atuar como hormônios ou fatores liberadores destes, toxinas, neurotransmissores, antimicrobianos, adoçantes ou substratos de proteases (MACHADO et al, 2004). Os que exercem efeito benéfico para os organismos são conhecidos como peptídeos bioativos, os quais já foram relatados na literatura serem produzidos durante o processo de fermentação microbiana (RAI, SANJUKTA, JEYARAM, 2017). Na literatura há muitos relatos sobre a aplicação de bactérias para a produção de peptídeos bioativos (MOSLEHISHAD et al., 2013; RAI, JEYARAM, 2015; ELFAHRI et al., 2016), mas poucos estudos estão disponíveis a respeito da produção de peptídeos bioativos por leveduras.

Neste contexto, o presente trabalho propôs investigar a capacidade de assimilação de xilose pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, e contribuir com o atual investimento em pesquisas para a obtenção de moléculas biotecnologicamente importantes, por meio da avaliação da presença de peptídeos bioativos nesses meios de cultivo. Assim como avaliar a produção de enzimas dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos pelas leveduras *P. ofunaensis*, *T. multisoron*, *Aureobasidium pullulans* e *A. leucospermi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leveduras fermentadoras de xilose

As leveduras são microrganismos classificados como quimiorganotróficos, ou seja, que utilizam diversos compostos orgânicos como fonte de energia e carbono, como por exemplo glicose, galactose, xilose, glicerol, entre vários outros. Entretanto, as diferentes espécies exibem uma variação na habilidade de assimilação desses compostos, assim como na forma de metabolizá-los, por vias oxidativas ou fermentativas no processo de geração de energia a partir dos mesmos (MARTINS, 2011).

A xilose é uma aldopentose que ocorre majoritariamente constituindo a cadeia principal da xilana, tipo mais frequente de hemicelulose das paredes celulares vegetais, presente em gramíneas e plantas de madeira dura (TERRONE, 2017). Este monossacarídeo é o açúcar renovável mais abundante na biomassa vegetal depois da glicose, constituindo até 25% do peso seco total de alguns resíduos florestais e agrícolas (MORI et al., 2015).

No entanto, a xilose não é tão facilmente fermentada quanto a glicose (WEN et al., 2016). As cepas nativas (forma selvagem) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são, de forma geral, incapazes de fermentar pentoses. Isso porque essas cepas não expressam os transportadores de membrana e as enzimas específicas para a assimilação e transformação da xilose em etanol (MCMILLAN, 1993). Entretanto, algumas leveduras são capazes de utilizar xilose como fonte de carbono e bioconverte-la em produtos como etanol, xilitol ou ácidos orgânicos. Isso implica na existência de um sistema de transporte e enzimas intracelulares para metabolizá-la. A fermentação de pentoses é uma etapa essencial para melhorar o rendimento na produção de etanol e outros bioprodutos de interesse biotecnológico a partir de biomassa vegetal (MARTINS et al., 2018; AMOAH et al., 2019).

Além das leveduras, outros microrganismos como bactérias são fundamentais na fermentação da xilose (DIEN; COTTA; JEFFRIES, 2003; JEFFRIES; JIN, 2004). Porém, características, como maior tamanho celular, paredes celulares mais espessas, melhor crescimento em pH ácido, exigências nutricionais menos rigorosas e maior resistência à contaminação, proporcionam vantagens às leveduras sobre as bactérias nas fermentações comerciais (JEFFRIES, 2006).

Neste contexto, a descoberta de leveduras fermentadoras de xilose no início da década de 1980 foi considerada um marco para a biotecnologia, permitindo assim com que esse açúcar

fosse mais bem aproveitado. Desde esse período, numerosas leveduras fermentadoras de xilose foram relatadas (JEFFRIES, 1981; SCHNEIDER, 1981; SLININGER et al., 1982).

Entre as leveduras descritas como assimiladoras de xilose por vias oxidativas ou fermentativas, os gêneros mais frequentemente citados são *Brettanomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Pachysolen*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces* (GONG et al, 1981; MCMILLAN, 1993; CHANDRAKANT, BISARIA, 1998). *Scheffersomyces stipitis* é a espécie aplicada na fermentação de pentoses, com cerca de mais de 85 publicações científicas entre 2005 e 2016. Há ainda outras culturas estudadas com menor frequência como *Spathaspora arborariae* (CUNHA-PEREIRA et al., 2011; HICKERT et al., 2014), *Pichia guilliermondii* (FAN et al., 2013), *Hansenula polymorpha* (VORONOVSKY et al., 2009), *Rhodotorula sp* (MARTINS, 2011), *Pichia ofunaensis* (KURTZMAN, 1998; MARTINS, 2011; ROBERT; SMITH, 2011) e *Trichosporon multisoron* (MARTINS, 2011; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015).

As leveduras capazes de converter xilose em etanol foram descritas como *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *S. (Candida) shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, *Rhodotorula sp* e *Pichia guilliermondii* (WEBB, LEE, 1990; BAJWA et al., 2011; MARTINS, 2011). No entanto, o rendimento não atingiu um nível satisfatório para aplicações industriais.

Vários estudos recentes têm focados na engenharia genética de *S. cerevisiae*, com o objetivo de torná-la capaz de produzir etanol também a partir de xilose (MOON et al., 2013). Isso tem sido feito através da clonagem e expressão de diversos transportadores de membrana específicos de xilose e, principalmente, de enzimas presentes em leveduras que utilizam essa pentose para produção de etanol com maior eficiência (SHARMA et al., 2018).

No entanto, o transporte da xilose é restrito na presença de glicose através da inibição competitiva, ou seja, na presença destes dois açúcares, as leveduras primeiro utilizam a glicose e sequencialmente a xilose, apresentando assim um crescimento diaúxico, constituído por duas fases lag (LEE et al., 2002). Dessa maneira, o gargalo dos pesquisadores há décadas tem sido a inibição de assimilação de xilose na presença de glicose e outras pentoses em cepas produtoras de etanol, o que não possibilita haver realmente uma co-fermentação de ambos os açúcares, para que sejam assimilados ao mesmo tempo (JEFFRIES; JIN, 2004). Portanto, apesar do sucesso de produção de etanol das cepas de *S. cerevisiae* engenheradas, o rendimento alcançado por essas cepas manipuladas se assemelha às espécies fermentadoras de xilose. A utilização de xilose é lenta e ocorre apenas após a exaustão da glicose, limitando assim a viabilidade econômica das fermentações industriais com o propósito de produção de etanol (GÍRIO et al.,

2000; WOHLBACH et al., 2011; HECTOR et al., 2013; GUO, JIANG, 2013; FARIA et al., 2014).

Por outro lado, as leveduras assimiladoras de pentose podem ser utilizadas para a obtenção de diversos produtos de alto valor agregado além do etanol, como por exemplo a produção de biossurfactantes de glicolípidios (FARIA et al., 2014), bem como a produção de xilitol e arabitol (GÍRIO et al., 2000; TAMANINI; HAULY, 2004; JAROS; ROVA, BERGLUND, 2013), ácidos orgânicos (ZHAO et al., 2013; CHEN; ZHU; XIA, 2014), lipídios para produção de biodiesel (GAO, 2013; IVERSON et al., 2014) e hidrogênio (BRAT; BOLES, 2013), permitindo assim um melhor aproveitamento desse açúcar.

2.2 Transporte de xilose em leveduras

O transporte de D-xilose através da membrana de leveduras ocorre por sistemas de baixa e alta finidade. Entre esses sistemas estão a difusão facilitada e o mecanismo simportador ligado a co-transporte de próton (MONTEIRO, 2015) (Figura 1).

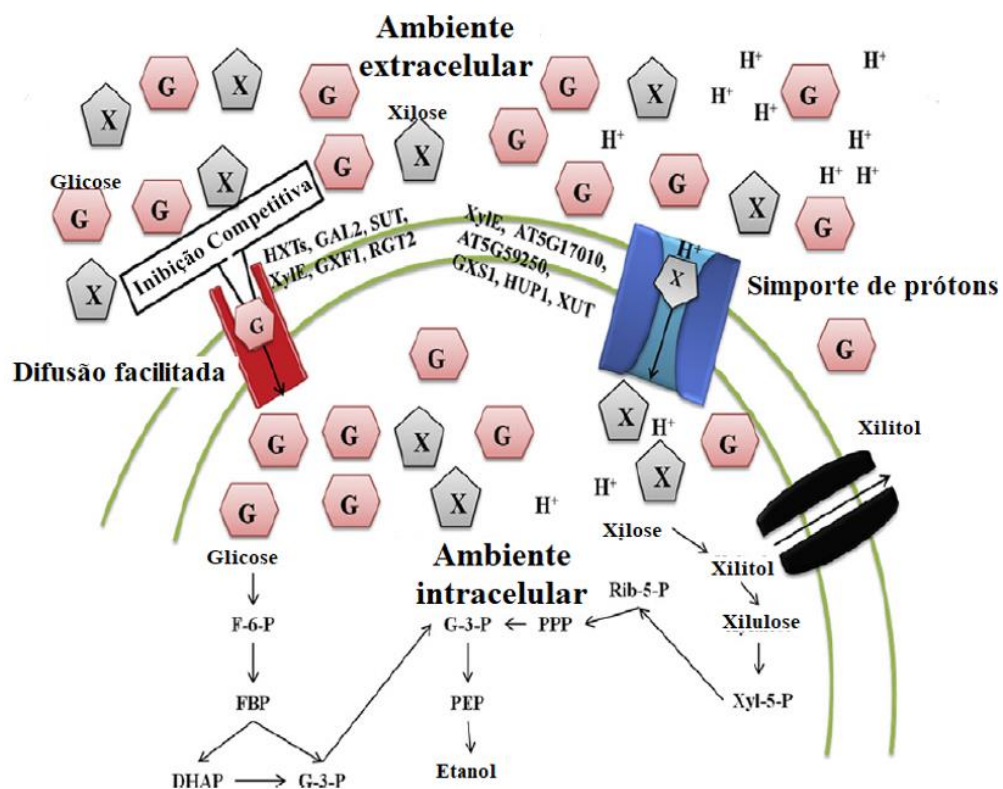
No caso de difusão facilitada, o transporte ocorre por sequestro dos transportadores de hexose, ou seja, não envolvendo transportadores específicos de xilose. Por conta disso, o transporte desse açúcar por esse sistema é mais lento quando comparado ao simporte. A maioria das leveduras que assimilam xilose possuem a maquinaria de transporte de difusão facilitada. As leveduras *S. cerevisiae*, *Candida shehatae* e *Schizosaccharomyces pombe* são exemplo de microrganismos que adotam a difusão facilitada para o transporte dessa pentose (SHARMA et al., 2018)

Já no sistema simporte, o transporte ocorre ligado a um fluxo de prótons. A xilose é geralmente transportada com muita eficiência através deste. Esse sistema tem uma afinidade muito maior pela xilose em comparação com o sistema de difusão facilitada. Esse mecanismo de transporte é observado principalmente em leveduras fermentadoras de xilose, como *Kluyveromyces marxianus*, *C. intermedia*, *S. stipitis* e *C. shehatae* (GÁRDONYI, et al., 2003; LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009). A maioria dos transportadores específicos de xilose usa esse sistema para o transporte de xilose.

Como já mencionado, a literatura destaca a inibição de transportadores específicos de xilose como um grande gargalo na produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. Para superar esse problema, muitos estudos foram e estão sendo realizados por meio de várias abordagens acerca de engenharia genética para melhorar o transporte de xilose (SHARMA et al., 2018).

Além disso, as maquinarias de transporte e sua regulação, ou seja, a assimilação dessa pentose pelos microrganismos, dependem de vários fatores, tais como espécies da levedura, disponibilidade de moléculas de açúcar específicas como fonte de carbono e condições de cultivo, como: aeração (condições aeróbias e anaeróbicas), pH e temperatura (MCMILLAN, 1993).

Figura 1. Visão geral completa do transporte de hexose e pentose nas células de levedura e metabolismo adicional à produção de etanol.



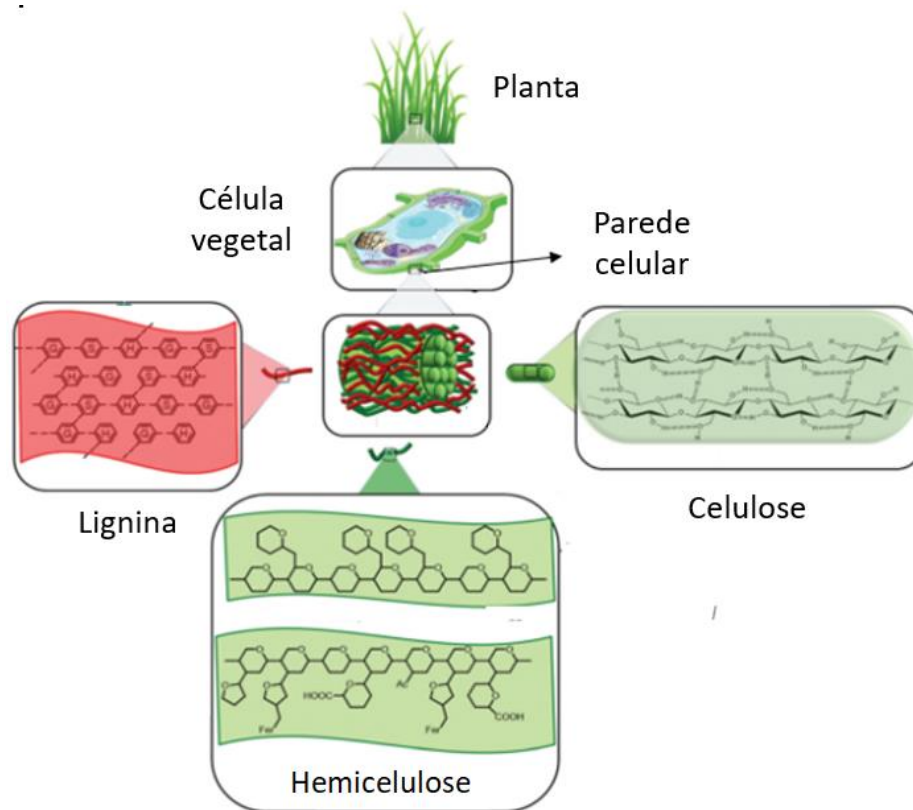
Fonte: adaptado de Sharma et al., 2018.

2.3 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o recurso biorenovável mais abundante da Terra (ZHOU et al., 2011). Além de ser barata, amplamente distribuída e disponível no planeta, é considerada uma fonte de carbono sustentável (LIN et al., 2018). Dessa forma, demonstra grande potencial para a obtenção de produtos de interesse comercial (TAARNING et al., 2011), sendo atualmente explorada por diversos setores, como o de produção de enzimas (PERIYASAMY et al., 2018), biocombustíveis e outros produtos químicos (NIE et al., 2018).

O componente predominante da biomassa vegetal são as paredes celulares das células vegetais (SOREK et al., 2014), as quais são formadas principalmente por três diferentes macromoléculas: a celulose, a hemicelulose e a lignina (TAIZ, ZIEGER, 2013; WALIA et al., 2017) (Figura 2). A proporção entre esses três componentes é muito relativa, dependendo de fatores como a fonte do material (SERRANO-RUIZ; LUQUE; SEPÚLVEDA-ESCRIBANO, 2011), tipo de tecido vegetal em questão e resposta às condições ambientais (KNOX, 2008).

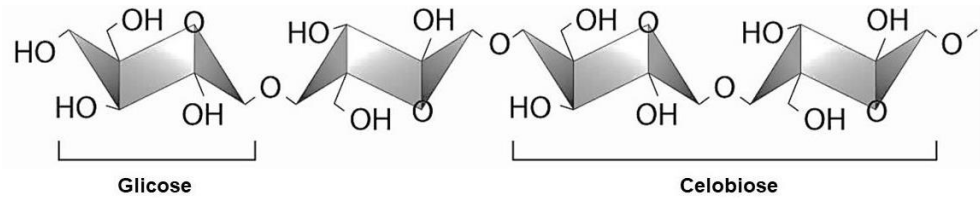
Figura 2. Principais componentes e estrutura da lignocelulose.



Fonte: Adaptado de Isikgor; Becer, 2015.

O componente principal da biomassa lignocelulósica é a celulose, sendo também o polissacarídeo mais abundante no mundo (SOMERVILLE, 2006). É um homopolímero linear, que possui de 8.000 a 12.000 unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), com orientações alternativas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ (STELTE et al., 2011). Os dímeros de glicose são denominados celobiose (Figura 3), considerados então a unidade básica do polímero celulose, e não a glicose (POLETTI; ORNAGHI JUNIOR, 2015).

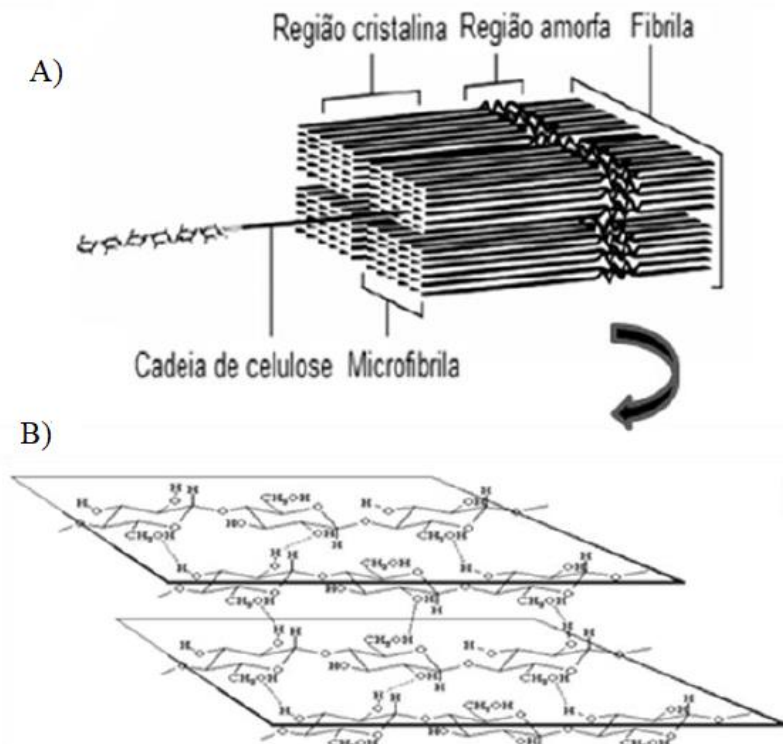
Figura 3. Estrutura da molécula de celulose, apontando os monômeros de glicose e celobiose.



Fonte: Adaptado de US Department of Energy Genome Programs (US DOE), 2007.

Sua estrutura é constituída por extensas redes de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares que ligam fortemente unidades de glicose formando microfibrilas (ARO et al., 2005; SOMERVILLE et al., 2010). Conforme a organização e compactação das microfibrilas, a celulose apresenta dois tipos de regiões diferenciadas: regiões cristalinas e amorfas (Figura 4).

Figura 4. Estrutura da celulose. A) esquema mostrando organização das fibrilas e microfibrilas de celulose, com as regiões amorfas e cristalinas. B) Representação das ligações de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre unidades de glicose da mesma cadeia (intra).



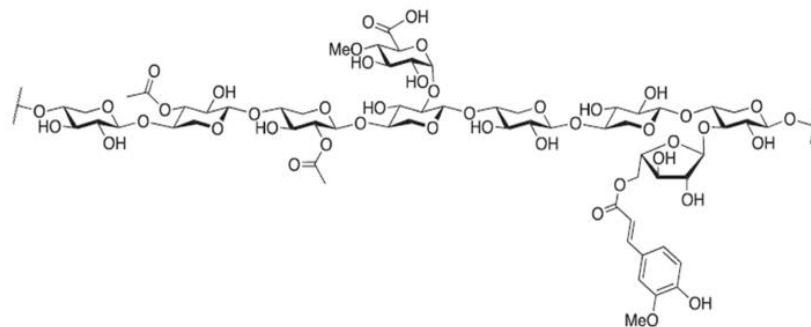
Fonte: Colussi, 2016.

As porções cristalinas da celulose são extremamente estáveis, sendo menos suscetíveis a degradação, principalmente pela ação de enzimas, do que as porções amorfas, por conta do

seu maior grau de organização e compactação (MATHEWS et al., 2015). A elevada compactação das moléculas de glicose, também confere à celulose alta massa molecular, o que culmina na sua insolubilidade em água (BRANDT et al., 2013).

A hemicelulose corresponde de 20 a 35% da biomassa proveniente de materiais lignocelulósicos, sendo considerada o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (LUO et al., 2012). Sua característica amorfa permite com que seja mais facilmente hidrolisada em relação a celulose (ZHOU et al., 2017). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo altamente diversificado constituído de diferentes graus de variados tipos de açúcares, como pentoses (arabinose, xilose, ramnose), hexoses (manose, glicose, galactose), açúcares acetilados e ácidos urônicos (ácido α -D-galacturônico) (GÍRIO et al., 2010; ISIKGOR; BECER, 2015), sendo comumente classificadas conforme o resíduo de açúcar predominante presente na cadeia principal. A xilana (Figura 5) é o tipo mais frequente de hemicelulose, a qual apresenta uma cadeia principal formada por monômeros de xilose unidos através de ligações β (1 \rightarrow 4) (TERRONE, 2017). Dessa maneira, a xilose representa 83,1 - 84,6% da constituição das hemiceluloses (BIAN et al., 2012). Em virtude disto, a xilose é um dos carboidratos mais abundantes da Terra.

Figura 5. Esquemática da estrutura de uma xilana de planta hipotética.



Fonte: Thorsheim et al., 2015.

A lignina é um heteropolímero amorfo que confere rigidez e resistência a parede celular vegetal, aumentando assim sua integridade, promovendo resistência aos ataques de patógenos, à danos mecânicos, à degradação enzimática, à oxidação e impermeabilização dos vasos condutores das plantas, garantindo proteção a estas (SANTOS et al., 2012; BROWN; CHANG, 2014). É composta por unidades fenilpropanóides derivadas da polimerização oxidativa de três álcoois precursores coniferílico, sinapílico e p-cumarílico (BOURBONNAIS; PAICE, 1988). A proporção destes três compostos resulta em diferentes tipos de lignina.

A robustez e recalcitrância da biomassa lignocelulósica está atrelada ao índice de cristalinidade da celulose, às ligações entre a hemicelulose e a lignina e ao teor e composição da lignina da parede celular das plantas. Dessa forma, o processo de deslignificação se torna fundamental para o acesso das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas durante o processo de hidrólise da sacarificação (LI et al., 2015).

2.4 Resíduos agroindustriais

Anualmente a população humana produz milhões de toneladas de resíduos agroindustriais. Na América Latina, por exemplo, são produzidos mais de 500 milhões de toneladas/ano de subprodutos e resíduos agroindustriais, sendo que o Brasil é responsável por quase metade deste montante (SOUZA; SOUZA; SANTOS, 2007).

Na maioria das vezes, esses rejeitos são dispensados no meio ambiente sem o procedimento adequado de descarte, representado uma relevante fonte de poluição ambiental e ocasionando efeitos prejudiciais na saúde humana e animal (SADH, DUHAN, DUHAN, 2018). Embora este tipo de resíduo seja biodegradável, torna-se necessário um tempo mínimo para ser mineralizado e, em virtude da intensa atividade humana na Terra, observa-se a cada dia um aumento na dificuldade de reciclagem natural desses nutrientes (BÔAS; ESPOSITO, 2000).

Estes resíduos contêm uma rica composição nutricional, como grande quantidade de proteínas, açúcares e minerais, além de ser uma fonte abundante e barata de carboidratos. Devido à essas características, os resíduos agroindustriais não devem ser simplesmente descritos como "resíduos", mas sim serem considerados como matérias-primas para a formação e desenvolvimento de outros produtos químicos de alto valor agregado (CARVALHO et al., 2002, 2005; SADH, DUHAN, DUHAN, 2018).

Inúmeros resíduos agroindustriais vêm sendo extensivamente avaliados como potenciais substratos para a produção de enzimas microbianas, incluindo resíduos de babaçu, canola, mamona e girassol (CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2016), farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja e sabugo de milho (LEITE et al., 2007), resíduos de peixe (NOOH et al., 2018), casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho (DE CASSIA PEREIRA et al., 2014), palha de arroz (DAS et al., 2013), resíduos de indústria têxtil (HU et al., 2018), entre outros.

Esses materiais podem ser, portanto, uma solução para reduzir o custo da produção comercial de enzimas microbianas obtidas por processos fermentativos, tendo em vista o dispêndio na obtenção desses biocatalizadores, além de contribuírem na minimização de problemas ambientais causados por seu acúmulo no ambiente (DASHTBAN, SCHARAFT,

WHENSHENG, 2009; ALVIRA et al., 2010; MURUGAN et al., 2011) e por serem substratos com suprimento garantido, devido ao fato de os resíduos agroindustriais serem os recursos renováveis mais abundantes do mundo (BHATIA et al., 2012).

2.4.1 Resíduos de trigo

O trigo é uma das culturas de cereais mais importantes do mundo (DE-OLIVEIRA NETO; SANTOS, 2017). No último levantamento realizado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of United Nations*), em 2017, o trigo foi ranqueado como uma das 10 commodities mais produzidas no mundo, sendo produzidas cerca de 750 milhões de toneladas (FAO, 2019). No Brasil, especificamente, no ano de 2017, aproximadamente 4,27 milhões de toneladas de trigo foram produzidas, com base nos dados divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB (CONAB, 2019).

O trigo sofre o processo de moagem para originar a farinha. Durante o processo de moagem do grão são obtidos a casca, o endosperma e o gérmen, considerados matérias-primas para a indústria (DE-OLIVEIRA NETO; SANTOS, 2017). No caso da farinha de trigo refinada, as cascas e o gérmen são retirados e adquirem outro fim. A casca, por fim, constitui o subproduto da moagem denominado farelo (AGEITEC, 2018). Esse resíduo de moagem é produzido em grandes quantidades e é responsável por 14-25% do grão (NANDINI, SALIMATH, 2001; DAS NEVES et al., 2006). Considerando que todo o trigo para consumo alimentício humano seja moído, cerca de 163 milhões de toneladas de farelo são geradas por ano, tomando como base a produção mundial de farelo de trigo de 2017 (PRÜCKLER et al., 2014).

O farelo de trigo é um substrato hemicelulósico complexo (Tabela 1), contém grandes quantidades de arabinoxilana (ÁLVAREZ-CERVANTES et al., 2016), e rico em proteínas (11%), carboidratos (61%), lipídios (5%) e em fibras (14%) (GWIRTZ; WILLYARD; MCFALL, 2014), o que provavelmente favorece o crescimento e a produção de enzimas por microrganismos, utilizando esse subproduto como fonte alternativa de carbono no processo fermentativo (LEITE et al., 2008). Trabalhos anteriores relacionam produções expressivas de celulases e hemicelulases, utilizando derivados de trigo (farelo e palha) como substrato (KALOGERIS et al., 2003; LEITE, et al., 2007; DA SILVA, et al., 2019).

Tabela 1. Composição química do farelo de trigo.

Componente	Quantidade (%)
Água	12,1
Proteína	13,2 – 18,4
Gordura	3,5 – 3,9
Fitoesteróis	0,16 – 0,17
Ácido α -linolênico	0,16
Carboidratos totais	56,8
Amido	13,8 – 24,9
Celulose	11,0
Arabinoxilanas totais	10,9 – 26,0
B-glucana totais	2,1 – 2,5
Ácidos fenólicos	1,1
Ácido ferúlico	0,02 – 1,5
Ácido fítico	4,2 – 5,4
Cinzas	3,4 – 8,1

Fonte: Apprich et al., 2014.

Considerando a composição e as grandes quantidades de biomassa de farelo produzidas anualmente, além do baixo valor desse produto, o uso do farelo de trigo como substrato para cultivo de microrganismos e conseqüentemente produção de enzimas de interesse industrial se torna uma boa alternativa de aplicação com maior valor agregado para este subproduto.

2.5 Enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas

2.5.1 Celulases

As celulases, também conhecidas como enzimas celulolíticas, desempenham um papel fundamental na hidrólise da biomassa lignocelulósica, pois degradam a celulose liberando monômeros de açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados para produção de biocombustíveis, produtos alimentícios e outros compostos químicos de interesse (BHAT; BHAT, 1997; ROMERO et al., 1999; KANG et al., 2004; FALKOSKI et al., 2013).

O grupo das celulases é constituído pelas endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (SWEENEY; XU, 2013), que, em conjunto, formam um grupo de glicosil-hidrolases (GH), capaz de realizar a hidrólise da celulose na natureza (SRIVASTAVA et al., 2018). A classificação das celulases é realizada de acordo com as suas propriedades estruturais, sua sequência de aminoácidos e em seu local de atuação no substrato celulósico (CASTRO; PEREIRA, 2010; SHARMA et al., 2016).

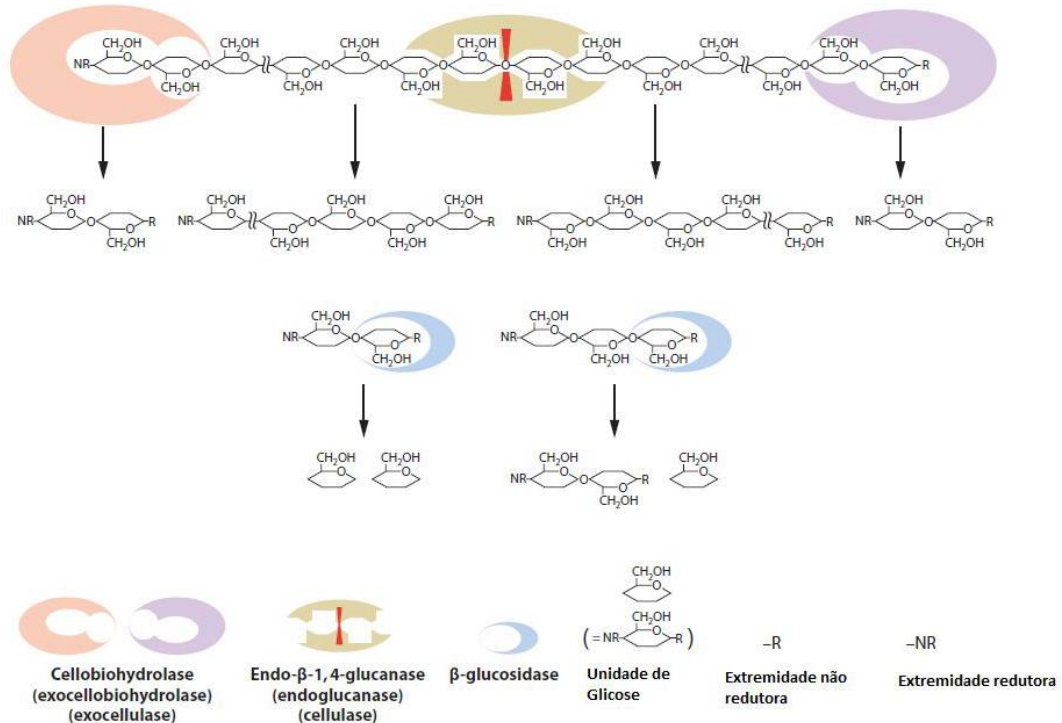
As endo-1,4- β -D-glucanases são enzimas que atuam na catalisação da clivagem das ligações glicosídicas β (1-4) internas presentes nas regiões amorfas da celulose, liberando celo-oligossacarídeos e, conseqüentemente, expondo um novo terminal redutor e um não redutor (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988; CASTRO; PEREIRA JR., 2010). A liberação de oligossacarídeos por essas enzimas, resulta na rápida solubilização da celulose, visto que seu grau de polimerização é diminuído (LEITE et al., 2007; CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

As celobiohidrolases ou exoglucanases, se movem progressivamente ao longo da cadeia e catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas nas porções cristalinas e amorfas da celulose, a partir das extremidades redutoras e não redutoras da cadeia, liberando unidades de celobiose e celo-oligossacarídeos. Isso diminui ainda mais o grau de polimerização da celulose (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988; LEITE et al., 2007).

As β -glicosidases ou celobiasas são as enzimas responsáveis pela hidrólise da celobiose e de outras celodextrinas à glicose, rompendo as ligações glicosídicas a partir de extremidades redutoras ou não redutoras, contribuindo para a finalização do processo catalítico da celulose (PARTRIDGE; BEDFORD, 2001; LEITE et al., 2007; VOUTILAINEN et al., 2007; TANI; KAWAGUCHI; KOBAYASHU, 2014). Elas utilizam como substrato o produto final das demais enzimas celulolíticas, os quais, ao se acumular no meio, poderiam promover a inibição das outras duas celulases. Assim, tornam-se o fator limitante e são responsáveis pela regulação de todo o processo, sendo consideradas as enzimas-chaves da hidrólise da celulose (YEOMAN et al., 2010).

A ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico depende diretamente da natureza do substrato sobre os quais elas atuam (WOODWARD, 1991) e tem como resultado a redução das cadeias de celulose a monômeros de glicose, o que pode ser observado na Figura 6.

Figura 6. Ação catalítica das enzimas celulases.



Fonte: Adaptado de Watanabe; Tokuda, 2010.

As β-glicosidases são amplamente empregadas em processos de geração de produtos de valor comercial, como a produção de biocombustíveis (ARAÚJO et al., 2017), desenvolvimento de novos alimentos à base de soja (SINGH; VERMA; KUMAR, 2015), cosméticos (BANKOVA et al., 2006), produtos derivados da celulose (KRISCH et al., 2010), cervejas, sucos e vinhos (JANG; CHEN, 2003; WILKOWSKA; POGORZELSKI, 2017), ração animal (JANG; CHEN, 2003), biopolimento de fibras têxteis (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011), entre outros.

As diferentes possibilidades para a aplicação industrial de β-glicosidases justificam a busca incessante por novas fontes de enzimas microbianas que possam ser produzidas com alta estabilidade estrutural em meios de cultivo de baixo valor econômico.

2.5.2. Hemicelulases

Devida a sua composição heterogênea, a hidrólise das hemiceluloses requer um conjunto mais complexo de enzimas principais e acessórias, que são necessárias para aumentar

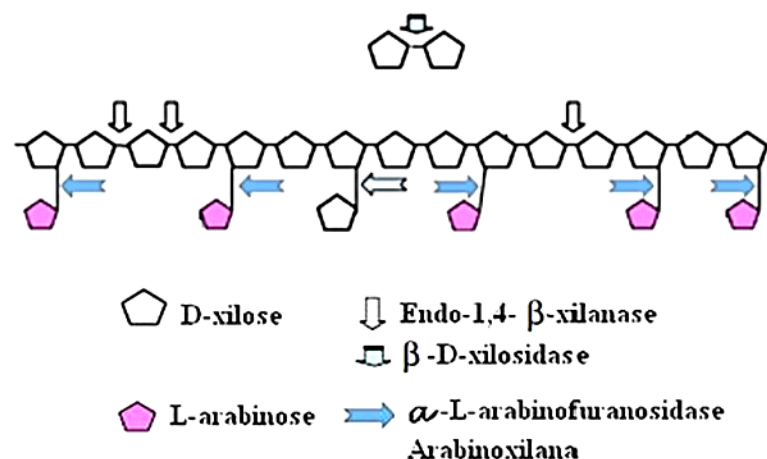
a eficiência da hidrólise (MAITAN-ALFENAS et al., 2015). Esse complexo inclui enzimas que degradam todas as frações da hemicelulose, podendo quebrar xilana, xilobiose, manana, arabinana, ácido galacturônico, entre outras (MADADI et al., 2017). Porém, como a xilana é o principal constituinte da hemicelulose, enfoques quanto às enzimas hemicelulolíticas são baseados em xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37), as quais são responsáveis pela hidrólise de sua cadeia principal (BIAN et al., 2012).

As xilanases, ou endo-1,4- β -D-xilanases, hidrolisam as ligações 1,4- β -D-xilosídicas internas randomicamente, diminuindo o grau de polimerização do polissacarídeo, liberando xilobiose e outros xilo-oligossacarídeos (SWEENEY; XU, 2012).

As β -xilosidases, ou 1,4- β -D-xilosidases, possuem afinidade por xilobiose e xilo-oligossacarídeos e atuam a partir do terminal não-redutor da xilana, liberando xilose como produto final (KOLENOVA et al., 2006; RASMUSSEM et al., 2006; BUSSAMRA et al., 2015).

Contudo, para a hidrólise completa da hemicelulose, também é fundamental a ação de enzimas envolvidas na clivagem das cadeias laterais desta. Essas enzimas são chamadas de enzimas acessórias, podendo ser citadas α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), endomananases (EC 3.2.1.78), β -manosidases (EC 3.2.1.25), e α -galactosidases (EC 3.2.1.22) (JORGENSEN, et al., 2005). A Figura 7 representa a estrutura da arabinoxilana com a ação de algumas enzimas do complexo hemicelulolítico.

Figura 7. Estrutura da arabinoxilana com a ação de algumas enzimas do complexo hemicelulolítico.



Fonte: Adaptado de Aro et al., 2005.

As α -L-arabinofuranosidasas, são enzimas acessórias do complexo hemicelulolítico, mais precisamente do xilanolítico, que catalisam a hidrólise dos resíduos de L-arabinose nos terminais não redutores de oligo e polissacarídeos (PÉREZ; EYZAGUIRRE, 2016; TERRONE, 2017). Elas atuam sobre ligações α -1,2-, α -1,3-, e α -1,5- existentes entre os α -L-arabinofuranosídeos e a cadeia principal de polímeros que as contém, como α -L-arabinanas, arabinoxilana, goma arábica e arabinogalactanas, liberando arabinose e arabinofuranose destes substratos (KAJI, 1984; SAHA, 2000; CAZY, 2019).

Muitos ramos industriais, como a produção de fármacos, alimentos, ração animal, têxteis, biocombustíveis, detergentes, entre outras, tem se utilizado das α -arabinofuranosidasas, para aumentar a eficiência tanto na produção, quanto na qualidade dos seus produtos (SAHA, 2000; NUMAN; BHOSLE, 2006; TERRONE, 2017).

O interesse nas α -L-arabinofuranosidasas aumentou nos últimos anos, estimulando estudos da produção com maior rendimento e obtenção mais eficiente dessa enzima. A justificativa se dá pela crescente exigência ambiental e de políticas governamentais, por processos industriais mais limpos e sustentáveis, que utilizem menos produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente e sua aplicação na conversão de vários substratos hemicelulósicos em açúcares fermentáveis para posterior produção de álcool combustível (SAHA 2000; TERRONE, 2017).

2.6 Microrganismos produtores de β -glicosidasas e α -L-arabinofuranosidasas

As enzimas são biocatalizadores que aumentam a velocidade das reações bioquímicas nos seres vivos (ROBINSON, 2015). Quando comparadas à compostos químicos de ação catalítica, as enzimas atuam de maneira mais eficiente, pois agem diretamente e apenas sobre a reação de interesse (TERRONE, 2017).

Ao serem extraídas de células, as enzimas podem ser empregadas em uma grande variedade de processos comercialmente importantes (LIU; KOKARE, 2017), sendo os microrganismos a fonte primária da produção de enzimas industriais, das quais 50% são produzidas por fungos e leveduras, 35% por bactérias e os 15% remanescentes são de origem vegetal (JAYANI et al., 2005).

A preferência é conferida aos microrganismos por diversas razões, tais como: o rápido crescimento e conseqüente produção enzimática, facilidade no manuseio quando comparado à animais e plantas, menor espaço necessário para a produção o que torna o processo mais rentável, fácil manipulação com auxílio da engenharia genética, mutagênese e evolução direta,

além da produção de enzimas com características especiais, como exemplo alcalofilia e termoestabilidade, podendo ser aplicadas em diversos processos industriais de condições mais extremas (AHMED et al., 2017).

As β -glucosidases são enzimas ubíquas produzidas por todos os domínios da vida, sendo encontradas em eucariotos e procariotos (CAIRNS; ESEN, 2010). Nos eucariotos são encontradas em plantas (WANG et al., 2013), mamíferos (TOMME; WARREN; GILKES, 1995) e nos seres humanos (SINGH; VERMA; KUMAR, 2015) e nos procariotos são observadas em bactérias, fungos e leveduras.

As bactérias são microrganismos que secretam moderadas quantidades de β -glicosidases, porém apresentam características interessantes para a produção dessas enzimas, como elevada taxa de crescimento em um curto período de tempo, capacidade de sobrevivência em ambientes hostis e produção de enzimas com alta resistência a condições extremas de pH e temperatura (SADHU; MAITI, 2013). Dentre elas algumas merecem destaque, como *Pyrococcus furiosus*, uma bactéria hipertermofílica que produz β -glicosidases com atividade ótima a 90–105 °C (KATAOKA; ISHIKAWA, 2014) e *Leuconostoc mesenteroides* com excelente produção de β -glicosidases em pH 2,5 (SON et al., 2018).

Os fungos são grandes produtores de β -glicosidases. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são responsáveis pelo maior número de investigações científicas a respeito das β -glicosidases (ADAV; CHAO; SZE, 2012). Alguns destes organismos apresentam β -glicosidases com características particularmente interessantes, como *Penicillium purpurogenum*, que se sobressai, devido sua alta estabilidade em pH 2,0 (DHAKA; PATIL, 2005) e *Penicillium citrinum*, pela atividade ótima em pH 4,2 (SANTA-ROSA et al., 2018).

As leveduras são, também, microrganismos que de maneira geral secretam moderadas quantidades de β -glicosidases, em alguns casos podendo produzir quantidades superiores a fungos. Algumas β -glicosidases com características de interesse produzidas por estes microrganismos podem ser citadas, como por exemplo *Debaryomyces hansenii* 4025 que apresentou atividade ótima em pH 4-5 e manteve sua atividade na presença de uma alta concentração de etanol e glicose, além da sua capacidade de hidrolisar os glicosídeos terpênicos da uva, possuindo potencial aplicação na produção de sucos e vinhos (ROSI; VINELLA; DOMIZIO, 1994). *A. pullulans* (yeast-like fungi) apresentou atividade ótima a 75 °C, mantendo sua estabilidade constante nessa temperatura ao longo de uma hora, além de se manter estável na faixa de pH de 4,5-10 (LEITE et al., 2007). *Pichia guilliermondii* G 1.2 manteve sua estabilidade em uma ampla faixa de pH semelhante aos resultados obtidos por Leite et al. (2007)

para β -glicosidasas de *A. pullulans* (DA SILVA et al., 2019). *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram alta atividade em 20% de etanol, demonstrando sua potencial aplicação na produção de vinhos (BARBAGALLO et al., 2004).

As α -L-arabinofuranosidasas são produzidas por organismos eucariotos e procariotos. Nos eucariotos são encontradas em diversas plantas (TATEISHI et al., 2005; ICHINOSE et al., 2010) e nos procariotos são observadas em bactérias, fungos e leveduras.

Diversas bactérias produzem α -L-arabinofuranosidasas com características de interesse, como exemplo *Paenibacillus polymyxa*, apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,0-9,0 e uma grande estabilidade, mantendo mais de 80% da sua atividade quando incubada no amplo intervalo de pH 5-11 durante 24 horas (GAO et al., 2018). *Clostridium stercoarium* apresentou excepcional termoestabilidade até 85 °C, além de considerável resistência ao etanol, detergentes neutros e cloreto de sódio aumenta ainda mais a sua aplicabilidade (SCHWARZ et al., 1995). Também merece destaque a arabinofuranosidase produzida por *Bacillus stearothermophilus*, com atividade ótima de 70 °C (GILEAD; SOHAM, 1995).

Dentre os fungos, *Colletotrichum graminicola* apresentou α -L-arabinofuranosidasas com temperatura ótima de 70°C e propriedades atrativas para aplicação em hidrólise de lignocelulose, particularmente sob alta salinidade e / ou na presença de resíduos de etapas de pré-tratamento (DE CARVALHO et al., 2018). *Chaetomium* sp. manteve estabilidade na faixa de pH de 4,0-10,0 além de exibir uma ótima termoestabilidade ao apresentar mais de 75% de atividade após uma hora de incubação a 60 °C (YAN et al., 2012). Uma das α -L-arabinofuranosidasas produzidas por *Penicillium chrysogenum* apresentou atividade ótima em 20 °C, indicando sua característica psicrófila, possuindo a menor temperatura ótima de atividade reportada entre as α -L-arabinofuranosidasas (SHINOZAKI et al., 2015).

Como leveduras produtoras de α -L-arabinofuranosidasas com potencial aplicação industrial podemos citar *Rhodotorula flava*, alta estabilidade em pH ácido, pH ótimo 2,0 e manteve 82% de sua atividade após ser incubada em pH 1,5 por 24 horas à 30° C (UESAKA et al., 1978). *Pichia capsulata* que manteve atividade quando incubada na concentração de etanol do vinho e liberou eficientemente monoterpenóis de um precursor de aroma extraído do suco de uva Moscatel (YANAI; SATO, 2000), mostrando sua grande aplicabilidade na indústria alimentícia. α L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* (*yeast-like fungi*) manteve sua atividade na presença de L-arabinose (1.2 M) e não foi afetada por p- cloromercuribenzoato (0.2 mM), EDTA (10 mM), ou ditiotreitol (10 mM) (SAHA; BOTHAST, 1998).

De maneira geral, as enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico, como as β -glicosidases e α -L-arabinofuranosidases, respectivamente, disponíveis comercialmente e mais comumente utilizadas são geralmente produzidas por fungos, devido à característica de elevada capacidade de secreção de proteínas extracelulares desse grupo microbiano (PHITSUWAN et al., 2013). Por esse fato, é possível observar na literatura muitos estudos sobre a produção enzimática em fungos filamentosos, principalmente no que diz respeito a produção de β -glicosidases.

Assim como os fungos, diferente das bactérias, as leveduras secretam suas enzimas diretamente no meio de cultivo, facilitando, assim, a sua recuperação e aplicação (POLIZELI et al., 2005), porém são escassos trabalhos na literatura sobre a produção enzimática em leveduras, principalmente a respeito de arabinofuranosidases. Isso instiga a necessidade de que mais estudos sejam direcionados à essa área, pois entre os estudos já realizados foi demonstrado a capacidade destas enzimas em apresentar características de interesse, sendo adequadas para uso potencial em aplicações industriais. Como a demanda industrial é crescente, é necessário estudos contínuos para identificação de novos biocatalizadores aprimorados às diferentes necessidades industriais.

2.7 Peptídeos e sua produção por microrganismos

Os peptídeos são biomoléculas que variam em comprimento desde dois até muitos milhares de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas e possuem massas moleculares abaixo de 10.000 Da (NELSON; COX, 2018). Exibem uma versatilidade química superior quando comparados às proteínas, pois podem ser amidados ou esterificados em suas carboxilas terminais, acetilados em seus grupos amino terminais, fosforilados ou sulfatados em um ou mais resíduos (MACHADO et al., 2004).

Os peptídeos podem exercer uma grande variedade de funções, podendo atuar como hormônios ou fatores liberadores destes, toxinas, neurotransmissores, antibióticos e antifúngicos, adoçantes ou substratos de proteases (MACHADO et al., 2004). Os que exercem efeito benéfico para os organismos são conhecidos como peptídeos bioativos e são cadeias de aminoácidos de pequeno tamanho, constituídos entre dois e quinze resíduos, inativos dentro da proteína intacta, mas que podem ser liberados após a hidrólise da proteína exercendo assim seus efeitos (VIOQUE et al., 2006).

Durante a fermentação, além de enzimas, os microrganismos podem secretar peptídeos ou libera-los a partir da hidrólise das proteínas presentes no meio de cultivo (FERREIRA, VILJOEN, 2003; BALAKRISHNAN et al., 2011; RAI, SANJUKTA, JEYARAM, 2017).

Cepas microbianas específicas podem ser utilizadas para a hidrólise de substratos ricos em proteínas, resultando na formação de peptídeos com propriedades funcionais específicas (CHAVES-LÓPEZ et al., 2012; ELFAHRI et al., 2016; SANJUKTA, RAI, 2016).

Peptídeos bioativos produzidos ou liberados durante a fermentação foram relatados por exibirem vários benefícios para a saúde, como propriedades anti-hipertensivas, antioxidantes, antibacterianas, anticancerígenas, imunomoduladoras e hipolipemiantes (RAI, SANJUKTA, JEYARAM, 2017). Esses peptídeos bioativos com benefícios específicos para a saúde podem ser assim utilizados como substitutos à várias drogas sintéticas (SAH et al., 2014).

Na literatura há muitos relatos sobre a aplicação de bactérias para a produção de peptídeos bioativos (BALAKRISHNAN et al., 2011; MOSLEHISHAD et al., 2013; RAI, JEYARAM, 2015; ELFAHRI et al., 2016), entretanto poucos estudos estão disponíveis a respeito da produção desses peptídeos por leveduras (CHAVES-LÓPEZ et al., 2012; RAI, SANJUKTA, JEYARAM, 2017), que podem ser fontes promissoras de produção dos mesmos.

Feitas essas justificativas científicas, serão apresentados a seguir, os objetivos e resultados das etapas executadas do trabalho, divididas em capítulo II, III e IV com suas respectivas metodologias e resultados obtidos.

3. OBJETIVO GERAL

- Avaliar as melhores condições de cultivo para assimilação de xilose e o potencial biotecnológico de enzimas e peptídeos bioativos produzidos por leveduras isoladas do ambiente.

REFERÊNCIAS

- ADAV, S. S.; CHAO, L. T.; SZE, S. K. Quantitative Secretomic Analysis of *Trichoderma reesei* Strains Reveals Enzymatic Composition for Lignocellulosic Biomass Degradation. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 19-30, fev. 2012.
- AGEITEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html>. Acesso em: 11 mai. 2019.
- AHMED, A. et al. Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications. **Journal Of Applied & Environmental Microbiology**, [s/l.], v. 5, n. 1, p. 31-46, nov. 2017.
- ALBAEK, M. O. et al. Evaluation of the energy efficiency of enzyme fermentation by mechanistic modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, [s/l.], v. 109, n. 4, p. 950-961, dez. 2011.
- ÁLVAREZ-CERVANTES, J.; DOMÍNGUEZ-HERNÁNDEZ, E.; MERCADO-FLORES, Y.; O'DONOVAN, A., DIAZ-GODINEZ, G., 2016. MycospHere Essay 10: Properties and characteristics of microbial xylanases. **MycospHere**, v. 7, n. 10, p. 1600-1619, 2016.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AMOAHA, J., OGURA, K., SCHMETZ, Q., KONDO, A., & OGINO, C. Co-fermentation of xylose and glucose from ionic liquid pretreated sugar cane bagasse for bioethanol production using engineered xylose assimilating yeast. **Biomass and bioenergy**, v. 128, p. 105283, 2019.
- APPRICH, S., TIRPANALAN, O., HELL, J., REISINGER, M., BÖHMDORFER, S., SIEBENHANDL-EHN, S., ... & KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 222-231, 2014.
- ARAÚJO, J. N. et al. PHotobiosynthesis of stable and functional silver/silver chloride nanoparticles with hydrolytic activity using hyperthermophilic β -glucosidases with industrial potential. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 102, p. 84-91, set. 2017.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology review**, v.29, p. 719-739, 2005.
- BAJWA, P. K., PHAENARK, C., GRANT, N., ZHANG, X., PAICE, M., MARTIN, V. J; TREVORS, J. T.; LEE, H. Ethanol production from selected lignocellulosic hydrolysates by genome shuffled strains of *Scheffersomyces stipitis*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 21, p. 9965-9969, 2011.
- BALAKRISHNAN, B.; PRASAD, B.; RAI, A. K.; VELAPPAN, S. P.; SUBBANNA, M. N.; NARAYAN, B. In vitro Antioxidant and Antibacterial Properties of Hydrolysed Proteins of Delimed Tannery Fleshings: Comparison of Acid Hydrolysis and Fermentation Methods. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 287-295, 2011.
- BANKOVA, E. et al. Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides and Alkylglycosides in Water-Organic Media Via Transglycosylation of Lactose. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 114-119, jan. 2006.
- BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., PALMERI, R., RESTUCCIA, C., & GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 58-66, 2004

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 15, n. 3-4, p.583-620, jan. 1997.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **Amb Express**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 1-19, nov. 2012.

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.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X. P.; et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88 (2), p. 638-645, 2012.

BÔAS, S. G. V.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n.14, p.38-42, maio/jun 2000.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, v. 255, p. 445-450, 1988.

BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15 (3), p. 550-583, 2013.

BRAT, D.; BOLES, E. Isobutanol production from D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 2, p. 241-244, 2013.

BROWN, M. E.; CHANG, M. C. Exploring bacterial lignin degradation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 1-7, 2014.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; da COSTA, A. C. Improvement of sugarcane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, 187, p.173-181, 2015.

CAIRNS, J. R. ESEN, K, Asim. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389-3405, 2010.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; SILVA, M. B.; Mancilha, I. M. Use of immobilized *Candida* yeast cells for xylitol production sugarcane bagasse hydrolysate: Cell immobilization conditions. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.98, n.100, p.489-496, 2002.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A.; Vitolo, M.; Felipe, M. G. A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**, v.25, p.25-31, 2005.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R; FREIRE, D. M. G. Characterization of babassu, canola, castor seed and sunflower residual cakes for use as raw materials for fermentation processes. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 83, p. 140-148, mai. 2016.

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

CAZY (Carbohydrate-Active enZymes Database). Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 11 mai. 2019.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 295-331, 1998.

CHAVES-LÓPEZ, C.; TOFALO, R.; SERIO, A.; PAPARELLA, A.; SACCHETTI, G.; SUZZI, G. Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. **International journal of food microbiology**, v. 159, n. 1, p. 39-46, 2012.

CHEN, T.; ZHU, N.; XIA, H. Aerobic production of succinate from arabinose by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource technology**, v. 151, p. 411-414, 2014.

COLUSSI, F. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da Celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum* envolvida na hidrólise da biomassa lignocelulósica**. Tese de Doutorado. Instituto de Física da Universidade de São Paulo. São Carlos. 191 p. 2016.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 6 Safra 2018/19. N. 7. Sétimo levantamento, Brasília, p. 26, abril 2019**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&Pagina_objcmsconteudos=1#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 11 mai. 2019.

COUGHLANM, P.; LJUNGDAHLL, G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. **In Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, FEMS Symposium**, n. 43, p. 11-30, 1988.

CUNHA-PEREIRA, F. DA; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218–4225, 2011.

DA SILVA, R. R., DA CONCEIÇÃO, P. J. P., DE MENEZES, C. L. A., DE OLIVEIRA NASCIMENTO, C. E., BERTELLI, M. M., JÚNIOR, A. P., ... & Gomes, E. Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1. 2. **Journal of biotechnology**, v. 294, p. 73-80, 2019.

DAS NEVESL, M. A.; SHIMIZUL, N.; KIMURI, T.; SHIIBA, K. Wheat milling by-products fermentation: potential substrate for bioethanol production. **Baohong Yue, Ling Sun, Xiaoqiang Zhao, Yanli Chen**, v. 3, n. 2, 2006.

DAS, A., PAUL, T., HALDER, S. K., JANA, A., MAITY, C., MOHAPATRA, P. K. D., ... & MONDAL, K. C. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. **Bioresource technology**, v. 128, p. 290-296, 2013.

DASHTBAN, M.; SCHARAFT, H.; WENSHENG, Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 578-595, 2009.

DE CARVALHO, D. R., CARLI, S., MELEIRO, L. P., ROSA, J. C., DE OLIVEIRA, A. H. C., JORGE, J. A., & FURRIEL, R. P. M. A halotolerant bifunctional β -xylosidase/ α -l-arabinofuranosidase from *Colletotrichum graminicola*: Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 741-750, 2018.

DE CASSIA PEREIRA, J., LEITE, R. S. R., DO PRADO, H. F. A., MARTINS, D. A. B., GOMES, E., & DA SILVA, R. Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 723-732, 2015.

DE-OLIVEIRA NETO, A. A.; SANTOS, C. M. R. A Cultura do Trigo. Brasília: Conab, 2017. 218p. Disponível também em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 13 fev. 2018. ISBN: 978-85-62223-09-9.

DHAKE, A. B.; PATIL, M. B. Production of β -Glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 1-12, dez. 2005.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.

DU, J.; LI, S.; ZHAO, H.. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 11, p. 2150-2156, 2010.

ELFAHRI, K. R.; VASILJEVIC, T.; YEAGER, T.; DONKOR, O. N. Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 1, p. 31-40, 2016.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N. D.; et al. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.

FAN, C.; QI, K.; XIA, X.-X.; ZHONG, J.-J. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 309–315, 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Pesquisa de produção global de trigo**, 2017. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 11 mai. 2019.

FARIA, N. T.; SANTOS, M. V.; FERNANDES, P.; FONSECA, L. L.; FONSECA, C.; FERREIRA, F. C. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, from pentoses and D-glucose/D-xylose mixtures by *Pseudozyma* yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1790-1799, 2014.

FERREIRA, A. D.; VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 131-140, 2003.

GAO, D.; ZENG, J.; ZHENG, Y.; YU, X.; CHEN, S. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. **Bioresource technology**, v. 133, p. 315-321, 2013.

GAO, J., ZHAO, Y., ZHANG, G., LI, Y., & LI, Q. Production optimization, purification, expression, and characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus polymyxa*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 36, p. 24-33, 2018.

GÁRDONYI, M., JEPPSSON, M., LIDÉN, G., GORWA-GRAUSLUND, M. F., & HAHN-HÄGERDAL, B. Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 818-824, 2003.

GILEAD, S.; SHOHAM, Y. Purification and characterization of α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 1, p. 170-174, 1995.

GÍRIO, F. M.; AMARO, C.; AZINHEIRA, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource technology**, v. 71, n. 3, p. 245-251, 2000.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–800, 2010.

GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLICKINGER, M. C.; CHIANG, L. C.; TSAO, G. T. Production of Ethanol from d-Xylose by Using d-Xylose Isomerase and Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 430–436, 1981.

GONZÁLEZ-POMBO, P. et al. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 385-389, jan. 2011.

GUAMÁN-BURNEO, M. C., DUSSÁN, K. J., CADETE, R. M., CHEAB, M. A., PORTERO, P., CARVAJAL-BARRIGA, E. J., ... & Rosa, C. A. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* fa, sp. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 4, p. 919-931, 2015.

GUO, C.; JIANG, N. PHysiological and enzymatic comparison between *Pichia stipitis* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on xylose fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 541-547, 2013.

GWIRTZ, J. A.; WILLYARD, M. R.; MCFALL, K. L. W. Wheat: more than just a plant. In: MÜHLENCHÉMIE. **Future of flour: a compendium of flour improvement**. 2014. Disponível em: <<http://muehlenchemie.de/english/know-how/future-of-flour.html>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; MERTENS, J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 84, 2013.

HICKERT, L. R.; CRUZ, M. M.; DILLON, A. J. P.; FONTANA, R. C.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Fermentation kinetics of acid–enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 61–67, 2014.

HU, Y. et al. Valorisation of textile waste by fungal solid state fermentation: An example of circular waste-based biorefinery. **Resources, Conservation and Recycling**, [s.l.], v. 129, p. 27-35, 5 fev. 2018.

ICHINOSE, H., NISHIKUBO, N., DEMURA, T., & KANEKO, S. Characterization of α -L-arabinofuranosidase related to the secondary cell walls formation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 259-266, 2010.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v.6, p. 4497-4559, 2015.

JANG, H.; CHEN, K. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology And Biotechnology**, Hsinchu, Taiwan, v. 19, n. 3, p. 263-268, 23 abr. 2003.

JAROS, A. M.; ROVA, U.; BERGLUND, K. A. Acetate adaptation of *Clostridia tyrobutyricum* for improved fermentation production of butyrate. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 47, 2013.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40 (9), p. 2931 - 2944, 2005.

JEFFRIES, T. W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology letters**, v. 3, n. 5, p. 213-218, 1981.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y.-S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495-509, 2004.

- JEFFRIES, Thomas W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 320-326, 2006.
- JØRGENSEN, H., MØRKEBERG, A., KROGH, K. B., & OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 1, p. 42-48, 2005.
- KAJI, A. α -L-Arabinofuranosidase. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, v. 42, p. 383-94, 1984.
- KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 86, n. 3, p. 207-213, 2003.
- KANG, S. W., PARK, Y. S., LEE, J. S., HONG, S. I., & KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 91, n. 2, p. 153-156, 2004.
- KATAOKA, M.; ISHIKAWA, K. Complete saccharification of β -glucan using hyperthermophilic endocellulase and β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 78, n. 9, p. 1537-1541, 9 jun. 2014.
- KEERTI. et al. Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable β -Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice. **Isrn Biochemistry**, [s.l.], v. 2014, n. 3, p.1-8, 20 fev. 2014.
- KNOX, J. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion In Plant Biology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 308-313, 16 jun. 2008.
- KOLENOVA, K.; VRANSKA, M.; *et al.* Mode of action of endo- β -1,4-xylanases families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 338-345, 2006.
- KRISCH, J. et al. Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. **Applied Microbiology And Microbial Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 7, p. 891-896, nov. 2010.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, [s.l.], v. 2011, p. 1-10, dez. 2011.
- KURTZMAN, C. P. *Pichia* EC Hansen emend. Kurtzman. In: **The Yeasts**. Elsevier, p. 273-352. 1998.
- LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 4, p. 511-525, 2009.
- LEE, W. J., KIM, M. D., RYU, Y. W., BISSON, L., & SEO, J. H. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 186-191, 2002.
- LEITE, R. S. R., BOCCHINI, D. A., MARTINS, E. D. S., SILVA, D., GOMES, E., & DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 1-12, 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**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

- LI, C.; WANG, L.; CHEN, Z.; et al. Ozonolysis pretreatment of maize stover: the interactive effect of sample particle size and moisture on ozonolysis process. **Bioresource Technology**, 183, p. 240-247, 2015.
- LIN, X.; WU, Z.; ZHANG, C.; LIU, S.; NIE, S. Enzymatic pulping of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 16-24, 2018.
- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, [s.l.], v. 3, n. 9, p. 267-298, 2017.
- LUO, Q. et al. Alkali extraction and physicochemical characterization of hemicelluloses from young bamboo (*Phyllostachys Pubescens mazel*). **Bioresources**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 5817-5828, out. 2012.
- MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química nova**, v. 27, p. 781-789, 2004.
- MADADI, M.; TU, Y.; ABBAS, A. Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. **Electronic Journal of Biology**, v. 13, n. April, p. 135-143, 2017.
- MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; ALFENAS, R. F.; et al. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource Technology**, v.192, p. 670-676, 2015.
- MARTINS, G. M. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto. 104 p. 2011.
- MARTINS, G. M., BOCCHINI-MARTINS, D. A., BEZZERRA-BUSSOLI, C., PAGNOCCA, F. C., BOSCOLO, M., MONTEIRO, D. A., ... & GOMES, E. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 162-168, 2018.
- MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J.; GRUNDEN, A. M. Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99 (7), p. 2939-2954, 2015.
- MCMILLAN, J. D. **Xylose Fermentation to Ethanol: A Review**. Springfield: National Renewable Energy Laboratory, 1993.
- MÉNDEZ-LÍTER, J. A. et al. A novel, highly efficient β -glucosidase with a cellulose-binding domain: characterization and properties of native and recombinant proteins. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1-14, nov. 2017.
- MONTEIRO, D. A. **Produção de ácidos orgânicos por cepas de leveduras assimiladoras de xilose**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto. 59 p. 2015.
- MOON, J.; LIU, Z. L.; MA, M.; SLININGER, P. J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 247-254, 2013.
- MORI, T.; TSUBOI, Y.; ISHIDA, N.; et al. Multidimensional high-resolution magic angle spinning and solution-state NMR characterization of ^{13}C -labeled plant metabolites and lignocellulose. **Scientific Reports**. 5, p. 1-12, 2015.

- MOSLEHISHAD, M.; EHSANI, M. R.; SALAMI, M.; MIRDAMADI, S.; EZZATPANAH, H.; NASLAJI, A. N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. **International dairy journal**, v. 29, n. 2, p. 82-87, 2013.
- MURUGAN, S.; ARNOLD, D.; PONGIYA, U. D.; NARAYANAN P. M. Production of Xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 Using Saw Dust As Substrate under Solid State Fermentation, **Enzyme Research**, 2011.
- NANDINI, C. D.; SALIMATH, P. V. Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and bajra with good chapati/roti (Indian flat bread) making quality. **Food Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2001.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 7. edição. **Editora Sarvier: São Paulo**, 2018.
- NIE, S.; ZHANG, C.; ZHANG, Q.; ZHANG, K.; ZHANG, Y.; TAO, P.; WANG, S. Enzymatic and cold alkaline pretreatments of sugarcane bagasse pulp to produce cellulose nanofibrils using a mechanical method. **Industrial crops and products**, v. 124, p. 435-441, 2018.
- NOOH, H. et al. Production of Thermostable T1 Lipase Using Agroindustrial Waste Medium Formulation. **Catalysts**, [s.l.], v. 8, n. 11, p. 485-490, out. 2018.
- NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B. α -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006.
- PARTRIDGE, Gary G.; BEDFORD, Michael Richard (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. CABI Publishing, 2001.
- PÉREZ, R.; EYZAGUIRRE, J. *Aspergillus fumigatus* produces two arabinofuranosidases from glycosyl hydrolase family 62: comparative properties of the recombinant enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n.1, p. 143-154, 2016.
- PERIYASAMY, K. et al. Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to Fermentable Sugars by Immobilized Magnetic Cellulolytic Enzyme Cocktails. **Langmuir**, [s/l], v. 34, n. 22, p. 6546-6555, mai. 2018.
- PHITSUWAN, P.; LAOHAKUNJIT N.; KERDCHOECHUEN, O.; et al. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. **Folia Microbiologica**, v. 58, p. 163-176, 2013.
- POLETTO, M.; ORNAGHI JUNIOR, H. Cellulose – Fundamental aspects and current trends. **InTech**, c. 10, p. 251-273, 2015.
- POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, [s/l], v. 67, p. 577-591, mai. 2005.
- PRÜCKLER, M., SIEBENHANDL-EHN, S., APPRICH, S., HÖLTINGER, S., HAAS, C., SCHMID, E., & KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 211-221, 2014.
- RAI, A. K.; JEYARAM, K. Health benefits of functional proteins in fermented foods. Health benefits of fermented foods and beverages, p. 455-474, 2015.

RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; JEYARAM, K. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2789-2800, 2017.

RASMUSSEM, L.E.; SORENSEN, H.R.; *et al.* mode of action and properties of the α -xylosidase from *Talaromyces emersonni* and *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Bioenergy**, v. 94, p. 869–876, 2006.

REDDY, G. V; RAVINDRA BABU, P.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1457–1462, 2003.

ROBERT, V.; SMITH, M. T. *Zygoascus M. Th. Smith* (1986). In: **The Yeasts**. Elsevier, p. 931-936, 2011.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays Biochemistry**, Preston, Inglaterra, v. 59, n. 3, p. 1-41, 2015.

ROMERO, M. D., AGUADO, J., GONZÁLEZ, L., & LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 244-250, 1999.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 5, p. 519-527, 1994.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase Production by Bacteria: A Review. **British Microbiology Research Journal**, [s/l], v. 3, n. 3, p. 12-24, set. 2013.

SAH, B. N. P.; VASILJEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O. N. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. **Food chemistry**, v. 156, p. 264-270, 2014.

SAHA, B. C. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 403-423, 2000.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Purification and characterization of a novel thermostable α -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 1, p. 216-220, 1998.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–94, 2009.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 1-10, 2016.

SANTA-ROSA, P. S. *et al.* Production of thermostable β -glucosidase and CMCCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. **Electronic Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 5, p. 84-92, jan. 2018.

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, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHNEIDER, H.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K.; MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 3, n. 2, p. 89-92, 1981.

SCHWARZ, W. H., BRONNENMEIER, K., KRAUSE, B., LOTTSPREICH, F., & STAUDENBAUER, W. L. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 856-860, 1995.

SERRANO-RUIZ, J. C.; LUQUE, R.; SEPÚLVEDA-ESCRIBANO, A. Transformations of biomass-derived platform molecules: from high added-value chemicals to fuels via aqueous-phase processing. **Chemical Society Reviews**, [s/l], v. 40, p. 5266–5281, mai. 2011.

SHARMA, A., TEWARI, R., RANA, S. S., SONI, R., & SONI, S. K. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1346-1380, 2016.

SHARMA, N. K., BEHERA, S., ARORA, R., KUMAR, S., & SANI, R. K. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: current status. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 125, n. 3, p. 259-267, 2018.

SHINOZAKI, A., HOSOKAWA, S., NAKAZAWA, M., UEDA, M., & SAKAMOTO, T. Identification and characterization of three *Penicillium chrysogenum* α -L-arabinofuranosidases (PcABF43B, PcABF51C, and AFQ1) with different specificities toward arabino-oligosaccharides. **Enzyme and microbial technology**, v. 73, p. 65-71, 2015.

SINGH, G.; VERMA, A. K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. **3 Biotech**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 7-14, dez. 2015.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J., VAN CAUWENBERGE, J. E.; KURTZMAN, C. P. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 2, p. 371-384, 1982.

SOMERVILLE, C. Cellulose Synthesis in Higher Plants. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 53-78, nov. 2006.

SOMERVILLE, C. et al. Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. **Science**, [s/l], v. 329, p. 790-792, ago. 2010.

SON, S. et al. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on β -glucosidase activity. **Food Science And Biotechnology**, [s/l], v. 27, n. 1, p. 123-129, fev. 2018.

SOREK, N. et al. The Implications of Lignocellulosic Biomass Chemical Composition for the Production of Advanced Biofuels. **Bioscience**, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 192-201, fev. 2014.

SOUZA, O.; SOUZA, M. T. C.; SANTOS, I. E. Tratamento químico de resíduos agrícolas com solução de uréia na alimentação de ruminantes. Revista Capril Virtual, p. 1-5, 2007. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/15933928-Tratamento-quimico-de-residuos-agricolas-com-solucao-de-ureia-na-alimentacao-de-ruminantes.html>>. Acesso: 12 mai 2019.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; et al. Applications of fungal celulasas in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

STELTE, W.; HOLM, J. K.; SANADI, A. R.; et al. A study of bonding and failure mechanisms in fuel pellets from diferente biomass resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 35 (2), p. 910-918, 2011.

- SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. **Catalysts**, v. 2, n. 2, p. 244–263, 2012.
- TAARNING, E. et al. Zeolite-catalyzed biomass conversion to fuels and chemicals. **Energy & Environmental Science**, [s/l], v. 3, n. 3, p. 793-804, nov.2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre:Artemed, 2013. 954p.
- TAMANINI, Carolina; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.
- TANI, S.; KAWAGUCHI, T.; KOBAYASHI, T. Complex regulation of hydrolytic enzyme gene for cellulosic biomass degradation in filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, [s/l], v. 98, p. 4829-4837, 2014.
- TATEISHI, A., MORI, H., WATARI, J., NAGASHIMA, K., YAMAKI, S., & INOUE, H. Isolation, characterization, and cloning of α -L-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of Japanese pear. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1653-1664, 2005.
- TERRONE, C. C. **α -Arabinofuranosidase de *Aspergillus hortai* CRM 1919: produção, purificação, caracterização e aplicação na hidrólise de hemiceluloses de resíduos agroindustriais**. Tese (doutorado em Microbiologia aplicada). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro. 124 p. 2017.
- THORSHEIM, K.; SIEGBAHN, A.; JOHNSON, R. E.; STALBRAND, H.; MANNER, S.; WIDMALM, G.; ELLERVIK, U. Chemistry of xylopyranosides. *Carbohydrate Research*, v. 418, p. 65-88, 2015.
- TOMME, P.; WARREN, R.a.j.; GILKES, N.r. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. **Advances In Microbial Physiology Volume 37**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 1-81, 1995.
- UESAKA, E. I. J. I., SATO, M. A. S. A. Y. U. K. I., RAIJU, M. I. E. K. O., & KAJI, A. K. I. R. A. AlpHa-1-arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1073-1077, 1978.
- US DOE, 2007. Biofuels Primer Placemat: From Biomass to Cellulosic Ethanol and Understanding Biomass: Plant Cell Walls, **US Department of Energy Office of Science**. Disponível em: <<https://public.ornl.gov/site/gallery/gallery.cfm>>. Acesso em: 11/05/2019.
- VIOQUE, J., PEDROCHE, J., YUST, M. M., LQARI, H., MEGÍAS, C., GIRÓN-CALLE, J., ... & MILLÁN, F. Peptídeos bioativos em proteínas vegetais de reserva. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 99-102, 2006.
- VORONOVSKY, A. Y.; ROHULYA, O. V.; ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. **Metabolic Engineering**, v. 11, p. 234–242, 2009.
- VOUTILAINEN, S. P.; BOER, H.; LINDER, M. B.; et al. Heterologous expression of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B, and random mutagenesis to improve its thermostability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 234–243, 2007.
- WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 11, 2017.
- WANG, Y. et al. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 4, p. 10-24, jul. 2013.

WATANABE, Hirofumi; TOKUDA, Gaku. Cellulolytic systems in insects. **Annual review of entomology**, v. 55, 2010.

WEBB, S. R.; LEE, H. Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology advances**, v. 8, n. 4, p. 685-697, 1990.

WEN, X.; SIDHU, S.; HOREMANS, S. K. C.; SOOKSAWAT, N.; HARNER, N. K.; BAJWA, P. K.; YUAN, Z.; LEE, H. Exceptional hexose-fermenting ability of the xylitol-producing yeast *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 631-637, 2016.

WILKOWSKA, A.; POGORZELSKI, E. Aroma enhancement of cherry juice and wine using exogenous glycosidases from mould, yeast and lactic acid bacteria. **Food chemistry**, v. 237, p. 282-289, 2017.

WOHLBACHA, D. J.; KUOC, A.; SATOB T. K.; POTTS K. M.; SALAMOVC, A. A.; LABUTTIC, K. M.; SUNC, H.; CLUMC, A.; PANGILINANC, J. L.; LINDQUISTC, E. A.; LUCASC, S.; LAPIDUSC, A.; JIND, M.; GUNAWAND, C.; BALAND, V.; DALED, B. E.; JEFFRIESB, T. W.; ZINKELB, R.; BARRYC, K. W.; GRIGORIEVC, I. V.; GASCH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.

WOODWARD, J. Synergism in cellulase systems. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 67-75, 1991.

YAN, Q., TANG, L., YANG, S., ZHOU, P., ZHANG, S., & JIANG, Z. Purification and characterization of a novel thermostable α -l-arabinofuranosidase (α -l-AFase) from *Chaetomium* sp. **Process biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 472-478, 2012.

YANAI, T.; SATO, M. Purification and characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1181-1188, 2000.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; et al. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 1-55, 2010.

ZANG, X. et al. The structural and functional contributions of β -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-13, fev. 2018.

ZHAO, J.; XU, L.; WANG, Y.; ZHAO, X.; WANG, J.; GARZA, E.; MANOW, R.; ZHOU, S. Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from xylose by genetically engineered *Escherichia coli* B. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 57, 2013.

ZHOU, C. H., XIA, X., LIN, C. X., TONG, D. S., & BELTRAMINI, J. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 40, p. 5588-5617, mai. 2011.

ZHOU, X.; WENJUN, L.; MABON, R.; BROADBELT, L.J. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, v. 5, p. 52-79, 2017.

ZUO, Q., ZHAO, X. Q., XIONG, L., LIU, H. J., XU, Y. H., HU, S. Y., ... & BAI, F. W. Fine-tuning of xylose metabolism in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* by scattered integration of xylose assimilation genes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 440, n. 2, p. 241-244, 2013.

CAPÍTULO II

Avaliação das melhores condições de assimilação de xilose e investigação de produção de peptídeos antimicrobianos pelas leveduras *Pichia ofunaensis* e *Trichosporon multisporon*

RESUMO

A pentose xilose corresponde ao segundo monossacarídeo mais abundante da natureza, entretanto tem sido subaproveitado na indústria. Para algumas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, a utilização de pentoses é limitada pela carência de transportadores de membrana específicos e enzimas intracelulares para a sua metabolização. Entretanto, outras leveduras são capazes de utilizar xilose como fonte de carbono e bioconverte-la em produtos como etanol ou ácidos orgânicos. Para isso, se faz necessário a presença de um eficiente sistema de transporte e enzimas para a via das pentoses-fosfato. A fermentação de pentoses é uma etapa essencial para melhorar o rendimento na produção de etanol (2G), assim como de outros bioprodutos de interesse biotecnológico e alto valor agregado a partir da biomassa vegetal, como peptídeos bioativos. O objetivo desse estudo foi investigar o perfil de assimilação de xilose pelas leveduras *Pichia ofunaensis* e *Trichosporon multisporon* em meio contendo 2% desse açúcar em diferentes pHs iniciais (4,5, 6,5 e 8,5) e temperaturas de incubação (28, 32 e 36 °C) durante 96 horas, além da investigação da secreção/liberação de peptídeos antimicrobianos nesses meios YEPX com variação de características físico-químicas de incubação. Nossos resultados indicaram, para ambas as leveduras, uma melhor assimilação de xilose a pH inicial 4,5, e menor ou mais lenta assimilação a pH 8,5, sendo indicativo de que o transporte de xilose em pH ácido tenha ocorrido por sistema simporte com prótons (H⁺). *P. ofunaensis* exauriu toda a xilose em 72 horas de cultivo em meios com pH 4,5 e 6,5. *T. multisporon* consumiu 85% da xilose em meio com pH inicial 4,5 em 96 horas de cultivo. Em pH 6,5 e 8,5, esta levedura consumiu menos que 25% de xilose. Quanto a temperatura de cultivo em meio com pH inicial 4,5, observamos mais acelerado consumo de xilose a 32 e 36 ° C para *P. ofunanesis*, exaurindo a pentose em 56 horas de cultivo, enquanto *T. multisporon* não obteve consumo nestas temperaturas, demonstrando crescimento apenas a 28 °C. Para base de comparação, esses microrganismos também foram cultivados em meio YEPD e YEP com pH inicial de 4,5 a 28 °C. *P. ofunaensis* consumiu toda a glicose do meio em apenas 16 horas de cultivo, enquanto *T. multisporon* foi notavelmente mais lenta, exaurindo esse açúcar em 88 horas. O consumo de xilose e glicose nas diferentes condições avaliadas foram proporcionais ao crescimento celular desses microrganismos nas condições correspondentes. Esses resultados permitiram inferir que o pH e a temperatura são fatores que podem afetar o transporte de xilose através da membrana plasmática, fazendo com que este açúcar seja transportado com menor ou maior eficiência para a célula. Por fim, foi avaliado a presença de peptídeos bioativos com atividade antimicrobiana nos meios YEPX em que as leveduras foram cultivadas, por meio de análise por antibiograma de disco-difusão em meio sólido para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A análise do antibiograma indicou que nenhuma das alíquotas de cultivo, das diferentes condições avaliadas, formou halo de inibição, indicando assim não ter sido secretado pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisporon* peptídeos ou outras moléculas que tivessem ação bactericida e/ou bacteriostática.

Palavras-chave: fermentação, pH, temperatura, transportador de xilose, atividade antimicrobiana.

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos eucariotos quimiorganotróficos que utilizam uma grande diversidade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia para seu desenvolvimento. Devido a capacidade de gerar diferentes produtos fermentativos, esses microrganismos são amplamente utilizados em diversos setores industriais, dentre eles a indústria sucroalcooleira (HUANG et al., 2011; YOSHIDA; YOKOYAMA, 2012; AZHAR et al., 2017).

A maior parte da produção do etanol é oriunda da fermentação de glicose por meio da levedura *S. cerevisiae* (AZHAR et al., 2017). Contudo, no avanço de estudos sobre etanol de segunda geração, outros açúcares presentes no material lignocelulósico também tem atraído atenção para aproveitamento em bioenergia. Dentre estes, a xilose se destaca sendo o segundo açúcar mais abundante na biomassa vegetal (MORI et al., 2015). Todavia, essa pentose não é assimilada por *S. cerevisiae*, o que tem atualmente limitado a sua utilização para esse propósito (ZUO et al., 2013).

Apesar de algumas leveduras não conseguirem metabolizar a xilose, várias outras espécies têm sido relatadas como sendo capazes de assimilá-la. Algumas dessas cepas ao metabolizarem essa pentose produzem etanol, porém com menor eficiência quando comparada a produção pela metabolização de glicose por *S. cerevisiae*, em contrapartida outras produzem alta taxa de biomassa e várias outras ainda utilizam a pentose como substrato para obtenção de bioprodutos de alto valor agregado, tais como ácidos orgânicos, xilitol e arabitol (GÍRIO et al., 2000; CHEN, ZHU, XIA, 2014; FARIA et al., 2014).

Além disso, durante a fermentação os microrganismos podem liberar ou produzir, através da hidrólise proteínas presentes no meio de cultivo, peptídeos (FERREIRA, VILJOEN, 2003; BALAKRISHNAN et al., 2011; RAI, SANJUKTA, JEYARAM, 2017). Na literatura há muitos relatos sobre a aplicação de bactérias para a produção de peptídeos bioativos (BALAKRISHNAN et al., 2011; MOSLEHISHAD et al., 2013; RAI, JEYARAM, 2015; ELFAHRI et al., 2016), entretanto poucos estudos estão disponíveis a respeito da produção desses peptídeos por leveduras (CHAVES-LÓPEZ et al., 2012; RAI, SANJUKTA, JEYARAM, 2017), que podem ser fontes promissoras de produção dos mesmos.

Sendo assim o presente capítulo buscou obter mais informações sobre a capacidade de assimilação de xilose pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron* mediante a variação das condições de cultivo como pH inicial do meio e temperatura de crescimento e investigar, nessas diferentes condições, a produção de peptídeos bioativos por essas leveduras.

2. OBJETIVOS

- Avaliar as melhores condições de crescimento e assimilação de xilose em cultivo submerso pelas leveduras *Pichia ofunaensis* e *Trichosporon multisporon* isoladas do ambiente;
- Avaliar a presença de peptídeos bioativos, quanto a sua atividade antimicrobiana, nos meios de cultivo contendo xilose, em cultivo submerso, destas leveduras.

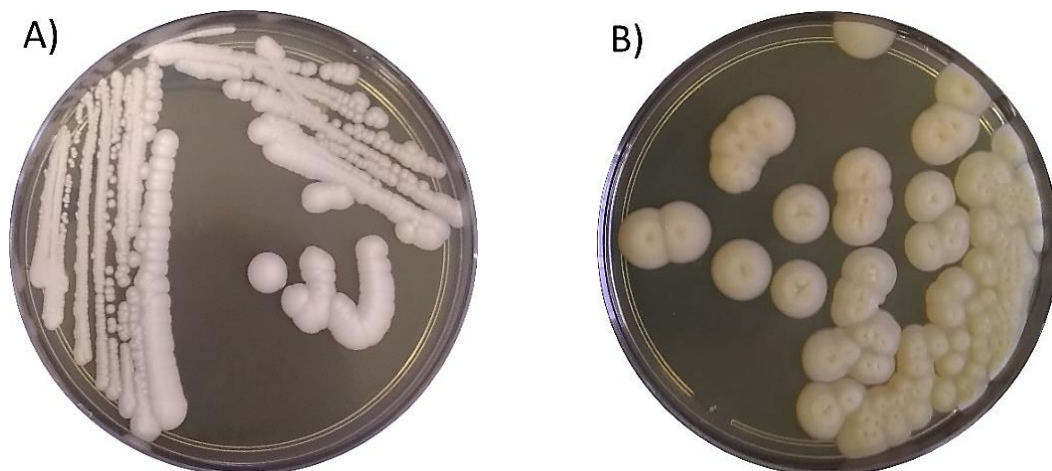
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Os microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas as cepas das leveduras *P. ofunaensis* 1A-14 e *T. multisporon* 1A-10 (Figura 1), isoladas de ninhos de formigas e armazenadas na coleção de trabalho do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE/Unesp de S. J. Rio Preto. A identificação das espécies foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), sob a coordenação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

A conservação das culturas puras foi feita por estocagem a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pérolas de vidro, lavadas com ácido nítrico e esterilizadas, foram adicionadas à suspensão de leveduras, que foram mantidas *overnight* em glicerol (15%) no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, então, transferidas para freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 1. Cultivo em meio YEPD da levedura *P. ofunaensis* (A) e *T. multisporon* (B).



Fonte: autoria própria

3.2 Cultivo dos microrganismos nos meios contendo xilose e glicose

Células de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* foram retiradas de estoque em freezer -80 °C e crescidas em tubo de ensaio inclinado contendo 4 mL de meio YEPD (2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% glicose e 2% ágar), por 48 horas a 28 °C. Posteriormente, as células foram resuspensas através de raspagem suave da superfície da cultura em tubo de cada uma das espécies, em 100 mL de meio YEPD líquido contidos em Erlenmeyer de 250 mL, por 24 horas a 28 °C sob agitação de 200 rpm.

Essa primeira cultura foi considerada o pré-inóculo. Esta foi centrifugada a 10.000 *xg*, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi resuspendido em 200 mL de água destilada estéril e centrifugado sob as mesmas condições mencionadas. Em seguida o sobrenadante foi descartado e a biomassa resuspendida em 20 mL de água destilada estéril. Essa suspensão de células foi utilizada para inocular o meio de cultivo.

Para avaliação da melhor condição de crescimento em xilose, o cultivo submerso das leveduras foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YEPX (2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% xilose) à 28 °C e 150 rpm por 96 horas, com pH ajustado para 4,5, 6,5, utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4) à 5M, e 8,5, nesse caso utilizando carbonato de sódio (Na_2CO_3) à 2 M. Após análise dos resultados obtidos dessas fermentações, novas fermentações foram realizadas à 32 e 36 °C e 150 rpm por 96 horas em meio YEPX com pH ajustado para 4,5, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. Para fins de comparação, também foi avaliado o crescimento dessas leveduras meio contendo glicose (YEPD) e meio base YEP (2% peptona e 1% extrato de levedura). Para a avaliação do crescimento em glicose, foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YEPD com pH ajustado para 4,5 utilizando H_3PO_4 à 5M. Da mesma forma, foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YEP com pH ajustado para 4,5 utilizando H_3PO_4 à 5M. Esses meios YEPD e YEPX foram incubados a 28 °C a 150 rpm por 96 horas. Os meios de cultivos foram inoculados com suspensão de células para iniciar o crescimento com uma densidade óptica de 0,1 a 600 nm. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

3.3 Quantificação do crescimento, avaliação da variação de pH e assimilação de açúcares dos meios de cultivo contendo glicose e xilose

Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 4 horas no período inicial de 8 horas de experimento, seguido de retiradas a cada 8 horas para o meio YEPX. Já para os meios YEPD e

YEP, as alíquotas foram retiradas a cada 4 horas no período inicial de 24 horas de experimento, seguidas de retiradas a cada 8 horas. A escolha dos intervalos de coleta se baseou na informação de que a glicose é o açúcar preferencial para muitos organismos, por este motivo as coletas foram realizadas em intervalo de tempo mais curto para glicose do que para xilose, a fim de acompanhar o consumo destes açúcares (MARTINS, 2011). As amostras foram agitadas em vortex e mensuradas a densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm e os resultados foram expressos em log de base 10. Ao final de cada cultivo, foi feita uma checagem de viabilidade, avaliando em microscópio uma alíquota do cultivo corada com solução de eritrosina em lâmina padrão, uma análise qualitativa, sem ser mensurada a taxa de viabilidade.

Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas de cada um dos meios seguindo o mesmo padrão descrito acima. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e avaliados pH do meio e consumo de açúcares.

A avaliação da assimilação de glicose e xilose pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, nos meios YEPD e YEPX, respectivamente, e análise da concentração de açúcar presente no meio basal YEP, foi realizada através da dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme Miller (1959). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada uma das réplicas de cultivo utilizando 100 µl do sobrenadante do meio centrifugado devidamente diluído em água e 100 µl de DNS, sendo conduzidos por 10 minutos a 95°C, seguido de resfriamento a 4°C durante 2 minutos. Foram preparadas curvas de calibração (11 pontos) tendo como padrão a xilose e glicose na concentração de 0 a 1 mg mL⁻¹.

3.4 Avaliação da atividade antibacteriana por antibiograma de disco-difusão em meio sólido

A presença de peptídeos bioativos foi analisada através da avaliação da atividade antibacteriana por antibiograma de disco-difusão em meio sólido. Os experimentos de atividade antibacteriana com meio de cultivo YEPX foram realizados pelo método de disco-difusão em meio sólido, de acordo com a norma M2-A8 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). As bactérias *E. coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *S. aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva) foram inoculadas em caldo nutriente e incubadas a 37 °C por 24h e uma alíquota do inóculo foi adicionada a tubos de ensaio com NaCl 0,85%, esterilizado até atingir a escala de turbidez de McFarland 0,5, (equivalente a 1,5x10⁸ UFC/mL para

bactérias) e as placas de Petri contendo meio de cultura ágar de Mueller-Hinton previamente esterilizadas foram semeadas com haste *swab*. Tiveram a atividade antibacteriana avaliada as alíquotas de meio YEPX coletadas em 4, 48 e 96 horas de cultivo, em duplicata, das fermentações de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* com pH inicial 4,5; 6,5 e 8,5 a 28 °C e com pH inicial 4,5 a 32 e 36 °C e também o meio sem cultivo. Essas amostras foram previamente filtradas utilizando filtros PTFE 0,22 µm estéreis. Os discos de difusão (CECON-Produtos para Diagnósticos Ltda) permaneceram imersos por 24 h nessas amostras, previamente esterilizados e aplicados nas placas com uma pinça esterilizada em chama. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 h, e após o período de incubação, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição de crescimento em duplicata. Também foram realizados testes comparativos com o antibiótico comercial clorafenicol em concentração de 30 µg mL⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da assimilação, crescimento e variação do pH dos meios contendo xilose e glicose

A Figura 2-A apresenta as curvas de consumo de xilose dos meios de cultura YEPX com pH inicial 4,5, 6,5 e 8,5 das espécies *P. ofunaensis* e *T. multisoron* cultivadas a 28 °C. Ambas as espécies, nos diferentes pH, consumiram xilose. Entre as duas espécies, e os três diferentes pH avaliados, o maior consumo foi de *P. ofunaensis*. Em todos os pHs aqui avaliados, *P. ofunaensis* consumiu toda a xilose presente no meio dentro de 80 horas de cultivo, diferente de *T. multisoron* que dentro das 96 horas de cultivo não obteve consumo total de xilose em nenhum dos mesmos. O melhor consumo de xilose observado em *T. multisoron* ocorreu no meio com pH inicial 4,5, consumindo 85% da xilose presente no meio no período avaliado, enquanto o consumo mais rápido de xilose para *P. ofunaensis* ocorreu nos meios de pH iniciais 4,5 e 6,5, sendo muito similar o consumo entre estes, levando 72 horas para completa exaustão desse açúcar dos meios. Para ambas as espécies, o menor consumo foi observado nos meios com pH inicial 8,5.

Isso é um forte indicativo de que o transporte de xilose através das membranas das células de *P. ofunanesis* e *T. multisoron* ocorra principalmente por sistema simportador ligado a co-transporte de próton (H⁺), já que a melhor assimilação de xilose ocorreu nos pH mais ácidos avaliados. Os sistemas de absorção de açúcar baseados em sistema simporte exigem um gradiente de prótons transmembranar para impulsionar o transporte de açúcar. Como as células tendem a operar com um pH interno levemente básico, o ΔpH transmembranar aumenta quando

o pH externo é reduzido (MCMILLAN, 1993). A maioria dos transportadores específicos de xilose usa esse sistema para o transporte de xilose. Sob condições alcalinas, a força motriz de prótons necessária para o sistema simporte é limitada, o que sugere que a levedura precise usar difusão facilitada, um mecanismo de transporte não dependente de H^+ , para absorver o açúcar. Esse pode ser o caso destas leveduras quando cultivadas em meio com pH inicial 8,5, uma vez que ainda eram capazes de consumir o açúcar, porém com menor eficiência (KILIAN; UDEN, 1988; LEANDO; FONSECA; GONÇALVEZ, 2009; ANJOS, et al., 2013; SHARMA et al., 2018; DA SILVA, et al., 2019).

Ambas as espécies de leveduras aqui estudadas, cultivadas em meio com pH inicial de 6,5, se mostraram melhores assimiladoras de xilose do que as leveduras *Hanseniaspora* sp. G15 (<10%), G17 (10%), *Issatchenkia terricola* G20 (10%) e *Aureobasidium pullulans* (20%) em 96 horas de cultivo em meio contendo xilose com pH inicial de aproximadamente 6,8 sem ajuste. Entretanto *P. ofunaensis* e *T. multisoron* apresentaram menor eficiência quando comparadas com *Candida shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI, que assimilaram toda a xilose do meio em 24 horas de cultivo em pH inicial de aproximadamente 6,8 (MARTINS, 2011).

Os resultados aqui encontrados são similares aos obtidos por Da Silva e colaboradores (2019), que avaliaram o perfil de consumo de xilose das leveduras *P. guilliermondii* e *Aureobasidium leucospermi* também cultivadas em meio YEPX com pH inicial 4,5 e 6,5 e observaram que em ambos os pHs o consumo do açúcar de *P. guilliermondii* foi similar, assim como para *P. ofunaensis*, e em apenas 48 horas de cultivo a levedura consumiu toda a xilose presentes nesses meios, sendo assim mais eficiente no consumo de xilose do que ambas as leveduras estudadas aqui. Já a levedura *A. leucospermi* apresentou maior consumo de xilose no meio com pH inicial 4,5 do que em 6,5, o mesmo foi observado aqui para *T. multisoron*, porém, consumindo toda a xilose do meio em 68 horas de cultivo, enquanto que no pH 6,5 em 72 horas de cultivo, pouco mais de 40% de xilose foi consumida, dessa forma em ambos os pHs, *A. leucospermi* apresentou maior eficiência de consumo dessa pentose do que *T. multisoron*.

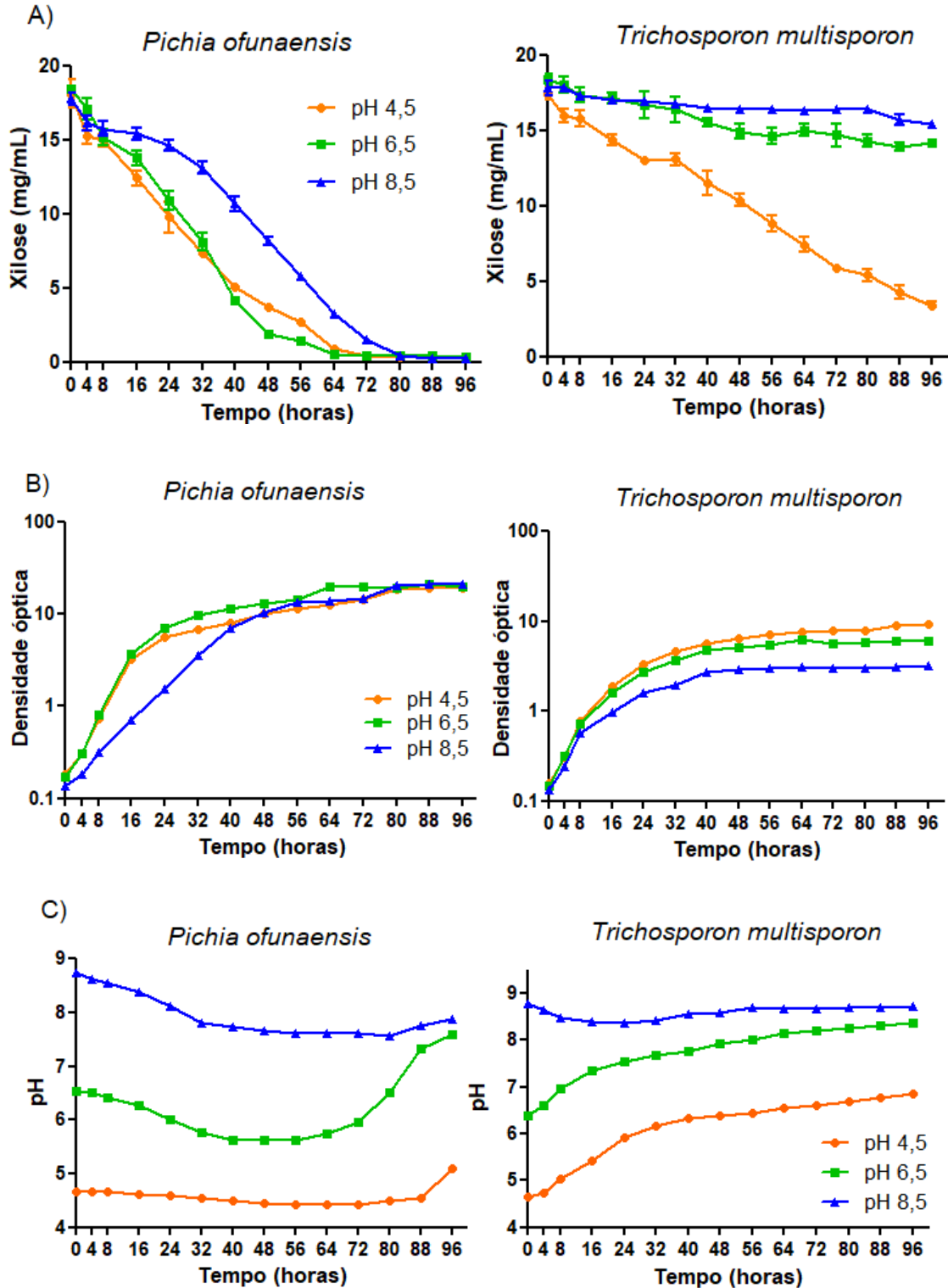
Comparando as curvas de crescimento celular entre as duas espécies (Figura 2-B), é possível observar, nos três diferentes pH avaliados, o maior crescimento de *P. ofunaensis*. Assim, como o observado para o consumo de xilose, *P. ofunaensis* cultivada nos pH iniciais de 4,5 e 6,5 apresentou o crescimento mais rápido, porém ao fim das 96 horas os três pH atingiram uma densidade óptica similar. O mesmo pode ser observado para *T. multisoron*, ao se comparar as curvas de crescimento celular com as de consumo de xilose, observa-se que os pH que obtiveram maior consumo de açúcar apresentaram, respectivamente, maior crescimento

celular, ou seja, foram proporcionais. Foi possível observar o maior crescimento celular no pH 4,5, seguido do pH 6,5 e o menor em 8,5.

A espécie e pH que apresentaram maior assimilação de xilose também apresentaram crescimento celular maior ou mais rápido, portanto crescimento e consumo de xilose sendo proporcionais, o mesmo foi observado por Martins (2011) no seu estudo.

Comparando as variações de pH do meio de cultivo das leveduras (Figura 2-C), é possível observar que, para o meio com pH inicial 4,5, não houve flutuações consideráveis no cultivo de *P. ofunaensis*, variando o pH do meio de 4,5 para 5 apenas no final das 96 horas de cultivo. Já *T. multisoron* apresentou aumento do pH, variando de pH 4,5 para 6,8 ao final das 96 horas. Essa alcalinização pode indicar a secreção de algum metabólito da levedura no meio, como por exemplos peptídeos de caráter básico. Quanto ao meio com pH inicial de 6,5, *P. ofunaensis* ao longo do cultivo apresentou oscilações perceptíveis, havendo primeiro uma acidificação do meio, atingindo pH 5,6, seguida de uma alcalinização, atingindo pH 7,5 ao fim das 96 horas. Leveduras que secretam ácidos orgânicos, por exemplo, tendem a acidificar seu meio ao longo do seu cultivo (MONTEIRO, 2015), assim como isso também pode ser indicativo da presença de peptídeos ácidos no meio. *T. multisoron* em meio com pH 6,5, assim como no meio de pH inicial 4,5, apresentou aumento do pH, atingindo pH 8,6 ao final das 96 horas de cultivo, também podendo indicar a secreção de metabólitos de caráter básico por essa levedura. Por fim, quanto ao meio com pH inicial 8,5, o cultivo de *P. ofunaensis* ocasionou leve acidificação do mesmo, atingindo valor de 7,9, enquanto que *T. multisoron* não apresentou nenhuma variação de pH considerável.

Figura 2. Assimilação de xilose (A), crescimento celular (B) e variação de pH dos meios (C) contendo 2% de xilose (YEPX) com pH inicial 4,5, 6,5 e 8,5 de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* cultivadas a 28 °C, 200 rpm. Os valores são expressos como média (n = 6) ± desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

Após análise dos resultados obtidos nos meios YEPX com diferentes pHs iniciais, foi possível observar que no meio com pH inicial 4,5 ambas as leveduras apresentaram os maiores consumos de xilose, dessa forma, verificamos as mesmas variáveis avaliadas acima alterando a condição de temperatura de incubação das fermentações de ambas as leveduras em meio YEPX com pH ajustado para 4,5. Para esse experimento as leveduras foram cultivadas a 32 e 36 °C. A escolha dessas temperaturas se baseou no fato de que as leveduras são microrganismos majoritariamente mesófilos (MADIGAN, MARTINKO; PARKER et al., 2016), assim como nas características ambientais de onde as leveduras desse trabalho foram isoladas, os quais crescem otimamente em uma faixa de temperatura de 25 a 37 °C (ABDEL-MANAT et al., 2010).

A Figura 3-A apresenta as curvas de consumo de xilose dos meios de cultura YEPX com pH inicial 4,5 das espécies *P. ofunaensis* e *T. multisoron* cultivadas a 28, 32 e 36 °C. Apenas *P. ofunaensis* consumiu xilose do meio quando cultivada nas temperaturas de 32 e 36 °C, além disso, em ambas essas temperaturas, a levedura exauriu a pentose do meio em apenas 56 horas de cultivo, enquanto que quando cultivada a 28 °C a exaustão ocorreu após 72 horas, sendo, portanto, mais rápida nas temperaturas superiores aqui avaliadas. Já *T. multisoron* quando cultivada a 32 e 36 °C não consumiu xilose do meio, enquanto cultivada a 28 °C consumiu 85% desse açúcar.

Martins (2011) também avaliou a influência da temperatura sobre a assimilação de xilose pelas leveduras *C. shehatae* BR6-2AY e *Rhodotorula sp.* G10.2. Quando incubada a 30, 32 e 40 °C, *C. shehatae* apresentou um consumo de 28, 48 e 24% de xilose do meio após 96 horas de cultivo, respectivamente. Já *Rhodotorula sp.* G10.2, teve os resultados expostos de assimilação da pentose apenas nas temperaturas de 30 e 32 °C de incubação, sendo que nestas apresentou 20 e 54%, respectivamente, de assimilação de xilose após 96 horas de cultivo. Assim, como observado para *C. shehatae* e *Rhodotorula sp.*, o aumento de temperatura até 32 °C, resultou em uma maior assimilação de xilose por *P. ofunensis*, nesse caso dentro de um período de 56 horas de cultivo. Entretanto, diferente de *C. shehatae* e *Rhodotorula sp.*, cultivadas durante 120 horas, *P. ofunensis* consumiu toda a xilose disponível do meio, nas três diferentes temperaturas aqui avaliadas, dentro de até 64 horas de cultivo, demonstrando assim seu maior potencial para consumo desse açúcar quando comparada as leveduras estudadas por Martins (2011). Já a levedura *T. multisoron*, diferente de *C. shehatae*, *Rhodotorula sp.* e de *P. ofunaensis*, não assimilou xilose quando incubada 32 °C, apresentando assim uma inibição de assimilação com o aumento de temperatura acima de 28 °C.

Suzuki e colaboradores (2019) avaliaram o efeito da temperatura de incubação de 30 e 40 °C na assimilação de xilose por 4 diferentes cepas recombinantes da levedura *Kluyveromyces marxianus*, DMB4, DMB3-7, DMB5 e DMB13. Apenas a cepa DMB13 apresentou aumento na velocidade de assimilação com o aumento da temperatura de 30 para 40 °C, exaurindo a xilose do meio em apenas 30 horas de cultivo, 25 horas antes do tempo que levou para exaurir esse mesmo açúcar quando incubada a 30 °C. Essa cepa apresentou potencial de assimilação nas diferentes temperaturas avaliadas superior as observadas nesse estudo para *P. ofunensis* e *T. multisoron*. As cepas DMB4 e BMB5 não sofreram influencia significativa do aumento da temperatura, levando apenas a uma assimilação discretamente maior a 40 °C do que a 30 °C. Já a cepa DMB3-7 apresentou redução no potencial de assimilação com o aumento da temperatura de incubação, quando a 30 °C exauriu o açúcar do meio em 55 horas de cultivo, e quando incubada a 40 °C apresentando um consumo de 75% de xilose ao final de 80 horas de cultivo. Esse resultado corrobora os encontrados para *T. multisoron*, onde o aumento de temperatura também afetou negativamente a assimilação da pentose do meio.

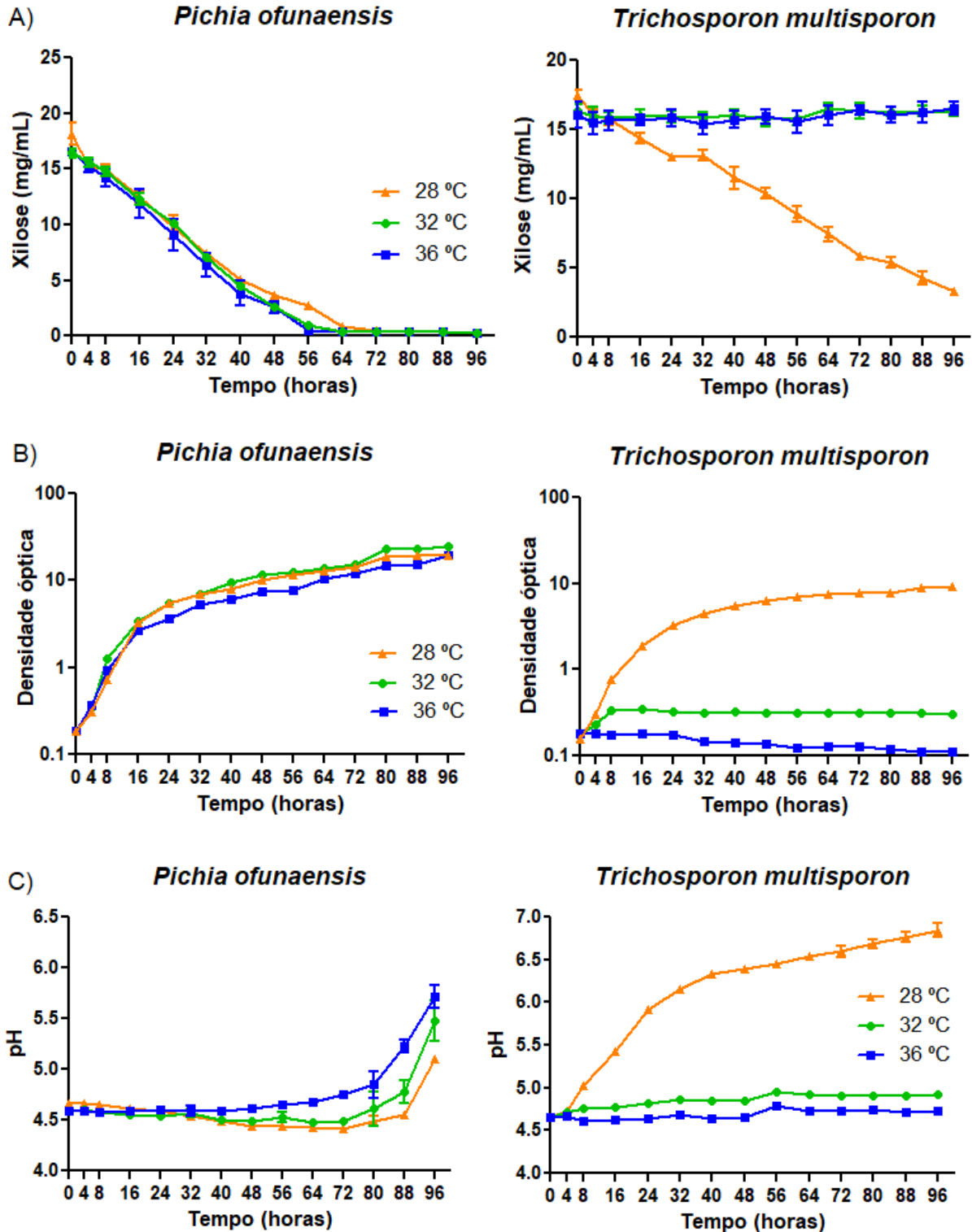
Comparando as curvas de crescimento celular entre as duas espécies e as diferentes temperaturas de incubação avaliadas (Figura 3-B), é possível observar que o crescimento de *P. ofunensis* é similar nas três temperaturas, entretanto, sendo discretamente mais rápido a 32 °C. Além disso, ao fim das 96 horas de cultivo, nas diferentes temperaturas avaliadas, a densidade óptica final é similar entre si. Já *T. multisoron*, apresentou seu maior crescimento celular, entre as temperaturas aqui avaliadas, quando cultivada a 28 °C, apresentando um ínfimo crescimento quando cultivada a 32 °C e nenhum crescimento foi observado a 36 °C, sendo assim é possível observar que o aumento de temperatura para *T. multisoron*, afetou de modo negativo direto o crescimento da levedura, tendo pouco ou nenhum crescimento. Diferente dos demais cultivos avaliados neste estudo, apenas os cultivos de *T. multisoron* em pH 4,5 a 32 e 36 °C alteraram sua viabilidade, apresentando ao final das 96 horas apenas células inviáveis, indicando assim a morte das células, o que justifica a baixa densidade óptica nestas condições. Isso comprova que o transporte de xilose em diferentes leveduras é limitado sob diferentes condições.

Ao se comparar as curvas de consumo de xilose com as curvas de crescimento celular das diferentes espécies cultivadas em diferentes temperaturas, observa-se que, de maneira geral, as temperaturas de incubação em que houveram maior consumo de açúcar apresentaram, respectivamente, maior crescimento celular, ou seja, foram proporcionais.

Comparando as variações de pH dos meios de cultivo das leveduras, com pH inicial de 4,5, incubadas a 28, 32 e 36 °C (Figura 3-C), é possível observar que, nas diferentes temperaturas aqui avaliadas, o perfil de variação do pH do meio de cultivo de *P. ofunensis*

descreve o mesmo padrão, entretanto o aumento da temperatura de incubação leva proporcionalmente ao aumento de alcalinização do meio entre as 16 horas finais de cultivo (80-96 horas de cultivo). Já *T. multisoron* cultivada a 32 e 36 °C, apresentou mínima variação de pH ao longo do período avaliado, tendo um aumento de pH ligeiramente maior em 36 °C. Entretanto, a 28 °C essa levedura apresentou ao longo das 96 horas de cultivo uma crescente alcalinização do meio, atingindo um pH final de 6,9. Esses resultados permitem afirmar que o crescimento desses microrganismos, nessas determinadas condições, ocasiona alteração do pH do meio de cultivo, ou seja, o metabolismo desses microrganismos produz e libera ao meio moléculas que afetam o pH desse, e quando não há crescimento o inverso também se torna verdade, como é o caso de *T. multisoron* quando cultivada em meio com pH inicial 4,5 a 36° C, onde não há crescimento celular, consumo de xilose e conseqüentemente não há variação de pH do meio. Dessa forma, o cultivo de *P. ofunaensis* a 32 e 36 °C pode estar atrelado a liberação de moléculas de carácter básico no meio, como por exemplo peptídeos.

Figura 3. Assimilação de xilose (A), crescimento celular (B) e variação de pH dos meios (C) contendo 2% de xilose (YEPX) com pH inicial 4,5 de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* cultivadas a 28, 32 e 36 °C, 200 rpm. Os valores são expressos como média (n = 6 (A) e n = 2 (B,C)) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

Para fins comparativos, ambas as espécies também foram cultivadas em meio YEPD e meio base YEP com pH inicial 4,5 à 28 °C e avaliadas com relação ao consumo dos açúcares presentes nesses meios. Esses dados estão apresentados na Figura 4-A.

A levedura *P. ofunaensis* consumiu toda a glicose presente no meio em apenas 16 horas de cultivo, enquanto que *T. multisoron* levou 88 horas para completa exaustão desse açúcar no meio, sendo a velocidade de consumo do açúcar notoriamente mais lenta em comparação a *P. ofunaensis*.

Martins (2011) ao avaliar o consumo de glicose de diversas leveduras em meio YEPD pH 4 e 5, a 28°C, no período de 11 horas de cultivo, pôde observar que *Pichia kluyveri* G1.1 e *Hanseniaspora sp.* G4.1, em ambos os pH, consumiram toda a glicose do meio em apenas 9 horas de cultivo, velocidade de consumo desse açúcar sendo superior à aqui observada em pH 4,5 para *P. ofunaensis*. Já as leveduras *Pichia guilliermondii*. G4.2, *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2 e G11.2, consumiram, em ambos os pH, cerca de 60, 40 e 30% de glicose, respectivamente, em 11 horas de cultivo, consumo superior ao observado em 12 horas de cultivo de *T. multisoron*, consumindo apenas 20% da glicose do meio, porém inferior ao observado para *P. ofunaensis*, a qual nesse mesmo período consumiu cerca de 67% do açúcar disponível no meio.

Com relação ao crescimento celular das leveduras em glicose (Figura 4-B), o perfil foi semelhante entre as espécies, atingindo densidade óptica similar em 96 horas de cultivo, com *P. ofunaensis* crescendo discretamente mais rápido que *T. multisoron*. Ao se comparar as curvas de crescimento celular com as de consumo de glicose, pode-se novamente observar a similaridade entre o perfil de consumo de glicose com o crescimento celular nesse açúcar, mostrando assim que quanto mais rápido o crescimento mais rápido foi a exaustão desse açúcar do meio.

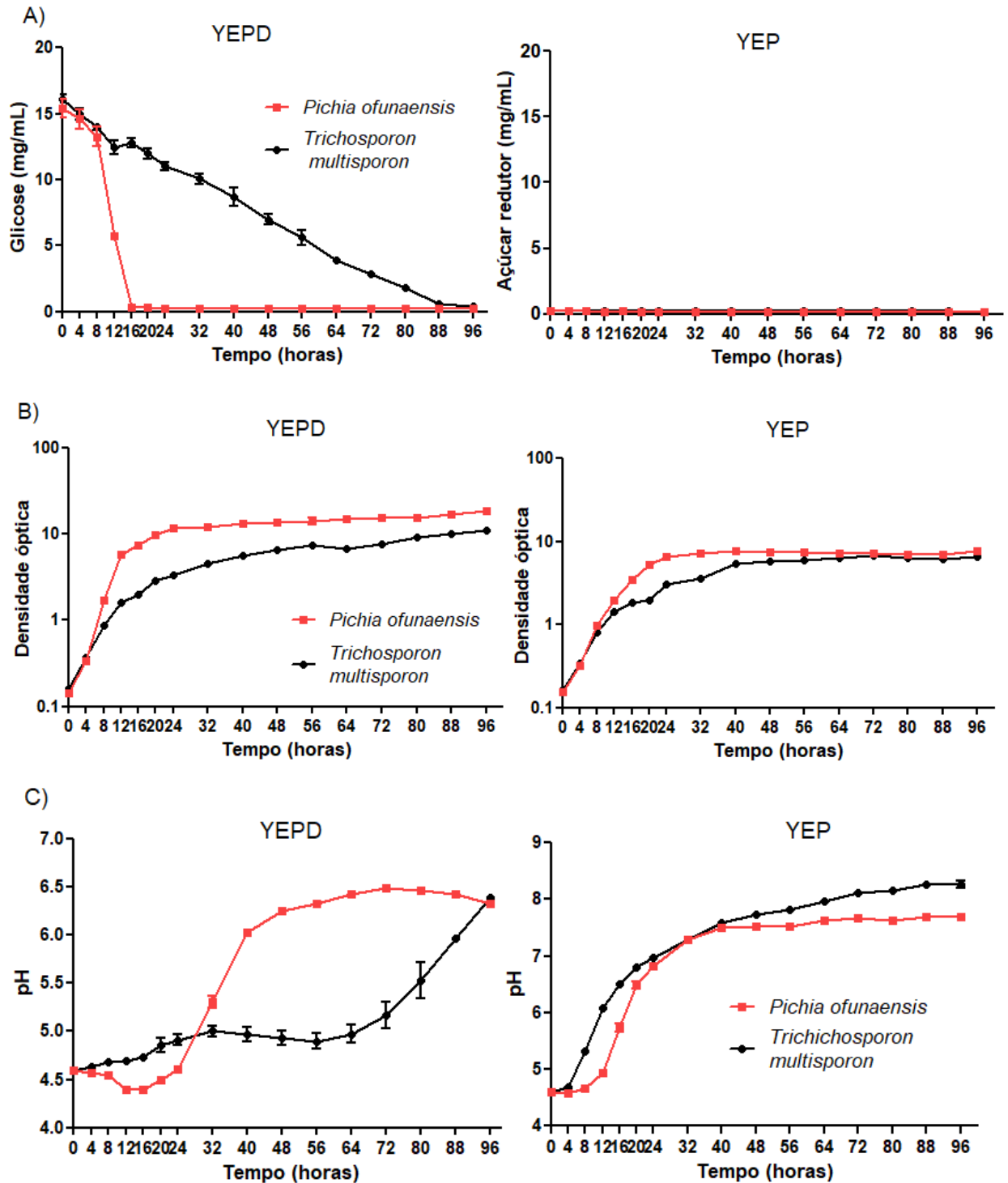
A variação de pH do meio YEPD descreve perfis diferente entre as espécies (Figura 4-C). Nas primeiras 20 horas de cultivo é possível observar uma acidificação do meio YEPD de *P. ofunaensis*, após esse período começa a haver uma alcalinização atingindo pH 6,2 após 48 horas, após isso o pH sofre pequenas oscilações apresentando valor de 6,3 em 96 horas de cultivo. Dentro das primeiras 64 horas de cultivo o pH do meio YEPD de *T. multisoron* sofre leves oscilação de 4,5 a 4,9, após esse período é possível observar uma elevada alcalinização, atingindo, em 96 horas, valor de 6,4, muito similar ao pH final do cultivo de *P. ofunaensis*. Novamente, essas oscilações de pH podem indicar a secreção de metabólitos por essas leveduras nos meios de cultivo.

Na figura 4-A é possível observar que o meio YEP apresenta uma quantidade ínfima de açúcares, apresentando uma concentração inicial de aproximadamente $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e atingindo uma concentração de $0,15$ e $0,18 \text{ mg mL}^{-1}$ para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, respectivamente, ao final das 96 horas de cultivo. A análise da concentração de açúcar redutor presente no meio YEP foi importante para esse trabalho pois permite observar que apenas o extrato de levedura e peptona também presentes nos meios YEPX e YEPD não apresentam quantidade de outros açúcares que interfiram na análise do consumo de xilose e glicose, respectivamente, adicionados a esses meios.

O crescimento celular das leveduras no meio YEP (Figura 4-B) foi menor que o observado para as mesmas leveduras no meio YEPD, porém o perfil foi muito semelhante entre os dois meios, com novamente *P. ofunaensis* crescendo discretamente mais rápido que *T. multisoron*. Esses resultados permitem concluir que mesmo na ausência de adição de uma fonte de carboidrato como a xilose ou a glicose, essas leveduras conseguem crescer com eficiência utilizando apenas os nutrientes provenientes do extrato de levedura e peptona adicionados ao meio, o que prova que a xilose e a glicose não eram as únicas fontes de carbono dos meios.

Já a variação de pH do meio YEP descreve um perfil muito semelhante para ambas as espécies, em 40 horas de cultivo ambas apresentam alcalinização do meio, atingindo pH 7,5. Após esse período, *P. ofunaensis* mantém o pH do meio sem variações, entretanto *T. multisoron* continua a alcalinizar o meio, apresentando no final do período de 96 horas de cultivo, pH 8,3. Novamente essa alcalinização do meio pode indicar a secreção pelas leveduras de compostos de caráter básico.

Figura 4. Assimilação de glicose em YEPD e avaliação da presença de açúcares em YEP (A), crescimento celular (B) e variação de pH do meio (C) contendo 2% de glicose (YEPD) e sem adição de açúcar (YEP) com pH inicial 4,5 de *P. ofunaensis* e *T. multisporon* cultivadas a 28 °C, 200 rpm. Os valores são expressos como média (n = 6 (A) e n = 2 (B,C)) ± desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

4.2 Avaliação da atividade antibacteriana por antibiograma de disco-difusão em meio sólido

As leveduras são microrganismos competentes na produção de diversas biomoléculas, as quais são liberadas no meio de cultivo, como biossurfactantes (FARIA et al., 2014), açúcares como xilitol e arabitol (GÍRIO et al., 2000; TAMANINI; HAULY, 2004; JAROS; ROVA, BERGLUND, 2013) ácidos orgânicos (ZHAO et al., 2013; CHEN; ZHU; XIA, 2014). Outros autores demonstraram, também, a capacidade de produção de antimicrobianos por esses microrganismos.

Comitini e colaboradores (2005) estudando o potencial antimicrobiano da cepa F63 de *S. cerevisiae*, verificaram que esta levedura produziu um efeito inibitório sobre a bactéria-positiva *Oenococcus oeni*. A inibição ocasionada é devida ao (s) fator (es) proteico (s) dessa levedura que exerce(m) efeito bacteriostático ou bactericida dependendo da concentração. A contagem de placas viáveis indica que o fator proteico(s) concentrado (s) a 7.5x da cepa F63 foi capaz de matar toda a população de bactérias maloláticas, exercendo assim uma atividade bactericida prolongada com relação à cepa CHR de *O. oeni*. Krymkiewicz e colaboradores (1971) estudaram a produção de um composto bactericida produzido por uma cepa mutante de *E. coli*. O produto foi caracterizado como metilglioxal, o qual possui atividade letal em bactérias gram-positivas e gram-negativas, inibindo a síntese protéica *in vivo*. Além de sua ação bactericida, o compost também inibiu a síntese proteica *in vitro* e produziu a inativação do bacteriófago T4.

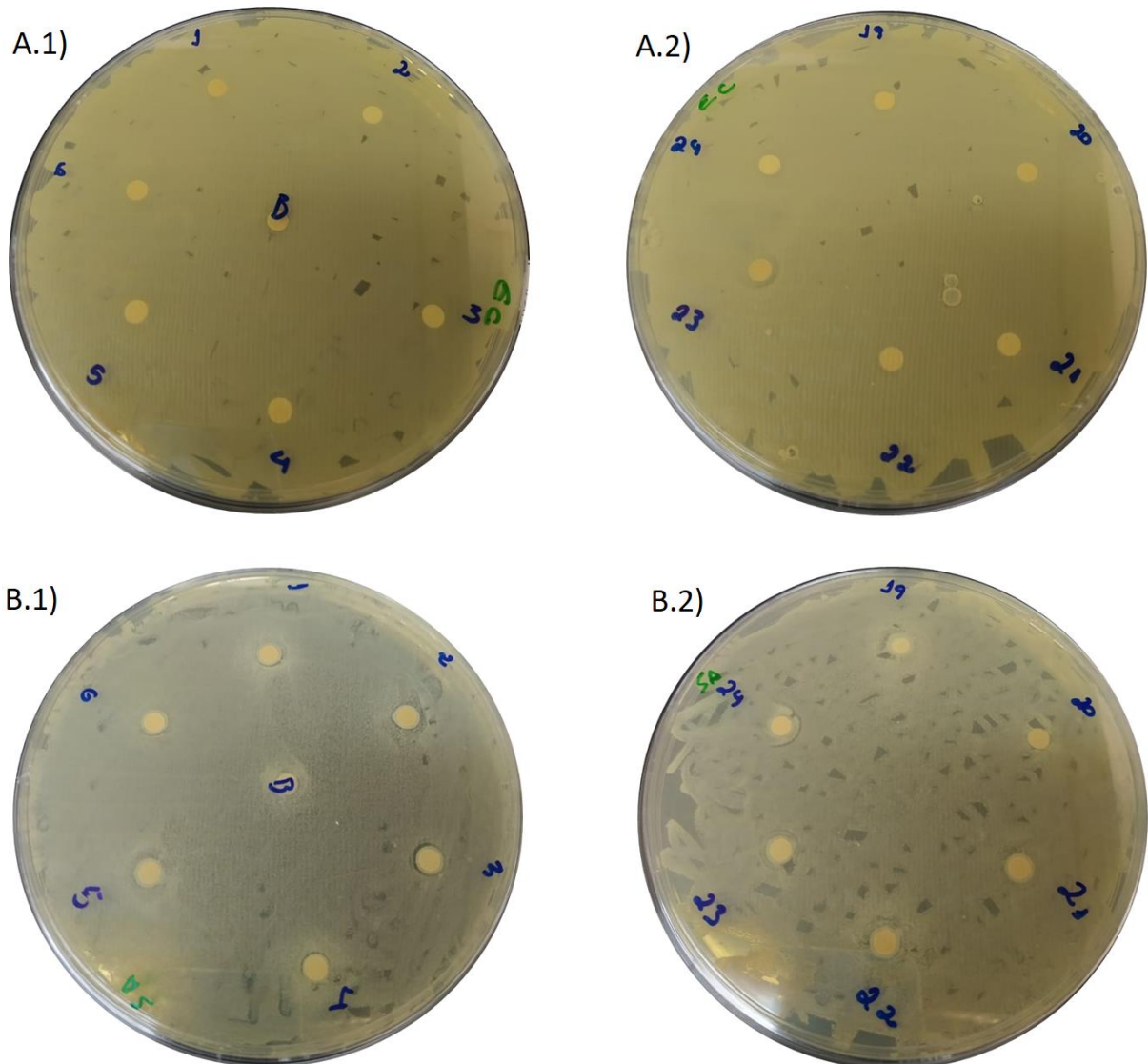
Além disso, o estudo de Comitini e colaboradores (2005) avaliaram o efeito de tratamento térmico sobre a atividade inibitório ocasionada por *S. cerevisiae* F63 sobre a bactéria-positiva *Oenococcus oeni*, indicando o (s) fator (es) proteico (s) serem sensíveis a temperatura, conseqüentemente, o efeito inibitório estando relacionado a temperatura. Outros autores, por exemplo, observaram que a produção de etanol é melhorada em pH mais baixo (JEFFRIES, 1985; ALEXANDER, YANG; JEFFRIES, 1988). du Preez e colaboradores (1986) examinaram o efeito do pH no desempenho da fermentação com *C. shehatae* e *P. stipitis*. O melhor desempenho para *C. shehatae* em termos produtividade de etanol ocorreu na faixa de pH 3,5-4,5. Enquanto a produtividade de etanol de *P. stipitis* apresentaram máximos na faixa de pH 4,5-5,5. Com base nesses dados, é possível afirmar que a temperatura e o pH influenciam a secreção e produtividade de moléculas pelas leveduras.

No entanto há escasses de estudos na literatura relacionando a produtividade, e principalmente a influência das condições de cultivo na produtividade, de substâncias

antibactericidas e antibacteriostáticas por esses microrganismos, em contrapartida, existindo inúmeros estudos relacionados a produtividade dessas substâncias por bactérias (MAGNUSSON; SCHNÜRER et al., 2001; ATANASSOVA et al., 2003; JAFARZADE et al., 2013). Dessa forma é necessário que mais esforços sejam realizados no sentido de investigação do potencial de produção de compostos antimicrobianos pelas leveduras

Com base nisso, foi realizada a avaliação da atividade microbiana por antibiograma das fermentações em YEPX das leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Ao analisar as placas do antibiograma foi possível observar que nenhuma das alíquotas de cultivo, das diferentes condições de pHs iniciais do meio e temperaturas de incubação das fermentações avaliadas, formou halo de inibição, indicando assim não ter sido secretado pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, no meio de cultivo YEPX, moléculas que tivessem atividade bactericida e/ou bacteriostática. O antibiótico comercial avaliado, clorafenicol, formou um halo de inibição de 2.05 cm de diâmetro para *E. coli* e 3.05 cm para *S. aureus*. Abaixo estão expostas fotos de algumas fermentações avaliadas (Figura 5).

Figura 5. Antibiograma de disco-difusão em meio sólido Mueller-Hinton. Placas incubadas após 18 horas a 37 °C com cultivo de *Escherichia coli* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) contendo discos embebidos em filtrado de meio YEPX coletadas em 4, 48 e 96 horas de cultivo, em duplicata, das fermentações de *P. ofunaensis* (1) e *T. multisoron* (2) com pH inicial 4,5 a 28 °C.



Fonte: autoria própria.

5. CONCLUSÕES

As leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron* se mostraram assimiladoras de xiloses em todos os meios YEPX com diferentes pH iniciais avaliados. Ambas apresentaram melhor assimilação da pentose em pH inicial 4,5 e menor assimilação em pH 8,5, o que pode ser

indicativo de que o melhor transporte desse açúcar nessas leveduras seja dependente de um simportador pentose/próton.

Em meio YEPX pH inicial 4,5, *P. ofunanesis* apresentou consumo mais rápido de xilose nas temperaturas de incubação de 32 e 36° C, enquanto *T. multisoro* apresentou, apenas, consumo do açúcar a 28 °C. O aumento de temperatura de incubação resultou no aumento de consumo de xilose para a levedura *P. ofunaensis*, enquanto que para *T. multisoron* o inverso é verdade, tendo o aumento de temperatura resultado na diminuição de consumo de xilose.

As curvas de consumo de xilose e crescimento celular foram diretamente proporcionais, possivelmente todo o consumo desse açúcar tenha sido direcionado para o crescimento, o que sugere que não tenha ocorrido a secreção de nenhum metabólito pelas leveduras nesses meios.

A levedura *P. ofunaensis* consumiu toda a glicose presente no meio em apenas 16 horas de cultivo, sendo mais rápida que *T. multisoron*, qual levou 88 horas para completa exaustão desse açúcar no meio.

O crescimento celular em pH inicial 4,5 e 28 °C, em termos de densidade ótica final, de *P. ofunaensis* em meio YEPX foi similar ao obtido em meio YEPD, entretanto ambos foram superiores ao obtido em meio YEP. Já *T. multisoron* apresentou maior crescimento em meio YEPD, seguido em YEPX e menor crescimento em YEP. Entretanto no geral, *P. ofunaensis* apresentou maior crescimento quando comparado a *T. multisoron* nos diferentes meios.

Esses resultados permitiram, assim, inferir que o pH e a temperatura são fatores que podem afetar a expressão de transportadores de membrana de xilose, permitindo com que essa seja transportada com menor ou maior eficiência. Dessa forma este trabalho obteve resultados que servirão de base para posteriores estudos de proteoma e transcriptoma a cerca dos transportadores de xilose presente nestas leveduras.

A análise do antibiograma indicou que nenhuma das alíquotas de cultivo, das diferentes fermentações em YEPX avaliadas, formou halo de inibição, indicando assim não ter sido secretado pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, no meio de cultivo, moléculas que tivessem ação bactericida e/ou bacteriostática. Conclui-se, assim, não ter ocorrido a produção de peptídeos bioativos de caráter antimicrobiano por estas leveduras.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BANAT, B. M.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-867, 2010.
- ALEXANDER, M. A.; YANG, V. W.; JEFFRIES, T. W. Levels of pentose phosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* grown in continuous culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 29, n. 2-3, p. 282-288, 1988.
- ANJOS, J., DE SOUSA, H. R., ROCA, C., CÁSSIO, F., LUTTIK, M., PRONK, J. T., ... & GONÇALVES, P. Fsy1, the sole hexose-proton transporter characterized in *Saccharomyces* yeasts, exhibits a variable fructose: H⁺ stoichiometry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 201-207, 2013.
- ATANASSOVA, M.; CHOISET, Y.; DALGALARRONDO, M.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X.; IVANOVA, I.; HAERTLÉ, T. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. **International journal of food microbiology**, v. 87, n. 1-2, p. 63-73, 2003.
- AZHAR, S. H. M., ABDULLA, R., JAMBO, S. A., MARBAWI, H., GANSAU, J. A., FAIK, A. A. M., & RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
- BALAKRISHNAN, B.; PRASAD, B.; RAI, A. K.; VELAPPAN, S. P.; SUBBANNA, M. N.; NARAYAN, B. In vitro Antioxidant and Antibacterial Properties of Hydrolysed Proteins of Delimed Tannery Fleshings: Comparison of Acid Hydrolysis and Fermentation Methods. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 287-295, 2011.
- CHAVES-LÓPEZ, C.; TOFALO, R.; SERIO, A.; PAPARELLA, A.; SACCHETTI, G.; SUZZI, G. Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. **International journal of food microbiology**, v. 159, n. 1, p. 39-46, 2012.
- CHEN, T.; ZHU, N.; XIA, H. Aerobic production of succinate from arabinose by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource technology**, v. 151, p. 411-414, 2014.
- COMITINI, F.; FERRETTI, R.; CLEMENTI, F.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound (s) active against *Oenococcus oeni*. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 1, p. 105-111, 2005.
- DA SILVA, R. R., PRISTA, C., DIAS, M. C. L., BOSCOLO, M., DA SILVA, R., & GOMES, E. Prospecting for l-arabinose/d-xylose symporters from *Pichia guilliermondii* and *Aureobasidium leucospermi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-6, 2019.
- DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.
- DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 3-4, p. 228-233, 1986.

ELFAHRI, K. R.; VASILJEVIC, T.; YEAGER, T.; DONKOR, O. N. Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 1, p. 31-40, 2016.

FARIA, N. T.; SANTOS, M. V.; FERNANDES, P.; FONSECA, L. L.; FONSECA, C.; FERREIRA, F. C. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, from pentoses and D-glucose/D-xylose mixtures by *Pseudozyma* yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1790-1799, 2014.

FERREIRA, A. D.; VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International journal of food microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 131-140, 2003.

GÍRIO, F. M.; AMARO, C.; AZINHEIRA, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource technology**, v. 71, n. 3, p. 245-251, 2000.

HUANG, C. F., JIANG, Y. F., GUO, G. L., & HWANG, W. S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3322-3329, 2011.

JAFARZADE, M.; YAHYA, N. A.; SHAYESTEH, F.; USUP, G.; AHMAD, A. Influence of culture conditions and medium composition on the production of antibacterial compounds by marine *Serratia* sp. WPRA3. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 373-379, 2013.

JAROS, A. M.; ROVA, U.; BERGLUND, K. A. Acetate adaptation of *Clostridia tyrobutyricum* for improved fermentation production of butyrate. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 47, 2013.

JEFFRIES, T. W. Emerging technology for fermenting D-xylose. **Trends in biotechnology**, v. 3, n. 8, p. 208-212, 1985.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y.-S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495-509, 2004.

JEFFRIES, Thomas W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 320-326, 2006.

KILIAN, S. G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 545-548, 1988.

KRYMKIEWICZ, N.; DIÉGUEZ, E.; REKARTE, U. D.; ZWAIG, N. Properties and mode of action of a bactericidal compound (= methylglyoxal) produced by a mutant of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 108, n. 3, p. 1338-1347, 1971.

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 4, p. 511-525, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 1, p. 1-5, 2001.

MARTINS, G. M. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto. 104 p. 2011.

- MCMILLAN, J. D. **Xylose Fermentation to Ethanol: A Review**. Springfield: National Renewable Energy Laboratory, 1993.
- MONTEIRO, D. A. **Produção de ácidos orgânicos por cepas de leveduras assimiladoras de xilose**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 59 p. 2015.
- MOSLEHISHAD, M.; EHSANI, M. R.; SALAMI, M.; MIRDAMADI, S.; EZZATPANAH, H.; NASLAJI, A. N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. **International dairy journal**, v. 29, n. 2, p. 82-87, 2013.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- RAI, A. K.; JEYARAM, K. Health benefits of functional proteins in fermented foods. Health benefits of fermented foods and beverages, p. 455-474, 2015.
- RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; JEYARAM, K. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2789-2800, 2017.
- SHARMA, N. K., BEHERA, S., ARORA, R., KUMAR, S., & SANI, R. K. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: current status. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 125, n. 3, p. 259-267, 2018.
- TAMANINI, Carolina; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.
- WAYNE, P. A. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2003. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th ed. Approved Standard: M2-A8**.
- YOSHIDA, S.; YOKOYAMA, A. Identification and characterization of genes related to the production of organic acids in yeast. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 556-561, 2012.
- ZHAO, L., ZHOU, T., LI, X., FAN, S., & YOU, L. Expression and characterization of GH3 β -Glucosidase from *Aspergillus niger* NL-1 with high specific activity, glucose inhibition and solvent tolerance. **Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 356-363, 2013.
- ZUO, Q., ZHAO, X. Q., XIONG, L., LIU, H. J., XU, Y. H., HU, S. Y., ... & BAI, F. W. Fine-tuning of xylose metabolism in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* by scattered integration of xylose assimilation genes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 440, n. 2, p. 241-244, 2013.

CAPÍTULO III

Investigação da produção e caracterização de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelas leveduras *Pichia ofunaensis* e *Trichosporon multisporon* em cultivo em estado sólido contendo farelo de trigo

RESUMO

O processamento de resíduos agrícolas é responsável pela geração de toneladas dos ditos resíduos agroindustriais, matérias-primas lignocelulósicas renováveis mais abundantes na natureza. Muito vem se estudando o uso desses resíduos como substrato para processos de fermentações microbianas com o intuito de obtenção de moléculas de alto valor agregado, como por exemplo, produção de enzimas. O interesse em prospecção de enzimas microbianas de utilização comercial vem crescendo devido a exigência ambiental e governamental de processos industriais mais limpos, sustentáveis e de baixo custo. O objetivo desse trabalho foi, assim, investigar a produção e a consequente caracterização de enzimas desramificantes de celulose e hemicelulose produzida pelas leveduras *Pichia ofunaensis* e *T. multisoron*, utilizando farelo de trigo como substrato em cultivo em estado sólido. As β -glicosidases produzidas por *P. ofunaensis* e *Trichosporon multisoron* apresentaram maior atividade em pH 5,5-6,5 e 5-6 e temperatura de 50-60 e 55°C, respectivamente. Ambas apresentaram estabilidade na ampla faixa de pH de 3,5-9,0 e termoestabilidade na faixa de temperatura de 30-50 °C por uma hora de incubação. Dentre os íons metálicos avaliados, nenhum apresentou capacidade de modular positivamente a atividade das β -glicosidases e modulação negativa foi observado quando na presença de Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Hg^{2+} . Na presença de SDS, EDTA, DTT e β -mercaptoetanol, as β -glicosidases não sofreram modulação positiva, apenas negativa moderada. Ambas as β -glicosidases foram tolerantes ao etanol, metanol, isopropanol e acetona avaliados. Em incubação por 120 horas em 15% de etanol a pH 3,5, a β -glicosidase de *P. ofunaensis* manteve mais de 90% de atividade, apresentando potencial para aplicação na indústria vinícola. Entre os açúcares, ambas as β -glicosidases foram tolerantes a presença de celobiose e, principalmente, xilose no meio. A glicose teve um maior poder de inibição, entretanto na concentração presente em vinhos, a β -glicosidase de *P. ofunaensis* manteve cerca de 40% de atividade. Dos nove compostos fenólicos avaliados apenas o ácido tânico e o ácido gálico mostraram potencial de inibição de atividade das β -glicosidases de ambas as espécies. *P. ofunaensis* e *T. multisoron* apresentaram atividade β -glicosídica de 0,40 e 0,21 U mL⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: caracterização bioquímica, *Pichia ofunaensis*, *Trichosporon multisoron*, β -glicosidase, resíduos agroindustriais.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalizadores que aumentam a velocidade das reações bioquímicas nos seres vivos (ROBINSON, 2015). Quando comparadas à compostos químicos de ação catalítica, as enzimas atuam de maneira mais eficiente, pois agem diretamente e apenas sobre a reação de interesse (TERRONE, 2017). Ao serem extraídas de células, as enzimas podem ser empregadas em uma grande variedade de processos comercialmente importantes (LIU; KOKARE, 2017), sendo os microrganismos a fonte primária da produção de enzimas industriais (JAYANI et al., 2005).

Destacam-se entre as principais enzimas produzidas comercialmente as desramificantes de hemicelulose e celulose. As hemicelulases são um complexo de enzimas responsáveis por degradarem todas as frações da hemicelulose da matéria lignocelulósica à pentoses e hexoses, são divididas em um conjunto de enzimas que degradam a cadeia principal de xilano, as xilanases e β -xilosidase, e outras acessórias, responsáveis por clivarem as cadeias laterais da hemicelulose como as endomananases, β -manosidasases e α -L-arabinofuranosidasases (MADADI et al., 2017). Já as celulases são enzimas que atuam de forma sinérgica no processo de conversão da celulose em glicose e incluem as endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidasases (SRIVASTAVA et al., 2018). As β -glicosidasases, ainda, se destacam pela ampla gama de aplicações industriais como no processamento de alimentos, realce do aroma de vinhos (GONZÁLEZ-POMBO et al., 2011), melhoramento do sabor de chá e suco de frutas (KEERTI et al., 2014), produção de biocombustíveis (MÉNDEZ-LÍTER et al., 2017), liberação de compostos aromáticos (ZANG et al., 2018), entre outros.

Além disso, o Brasil é um país que possui grande da sua economia centrada no setor agrícola, onde o processamento desses produtos é responsável por originar, todos os anos, milhares de toneladas de resíduos agroindústrias (SOUZA; SOUZA; SANTOS, 2007). Esses resíduos apresentam uma rica composição nutricional, podendo servir como uma fonte alternativa de substrato em fermentações microbianas, resultando em uma alta produtividade de variadas moléculas de interesse industrial, como por exemplo enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (BHATIA et al., 2002; SADH, DUHAN, DUHAN, 2018). Resíduos como palha e farelo de trigo, estão correlacionados ao aumento de produtividade de celulases quando utilizados como substratos em fermentações microbianas (KALOGERIS et al., 2003; LEITE, et al., 2007; DA SILVA, et al., 2019).

Levando em consideração o contexto acima, esse trabalho buscou investigar a produção e caracterização bioquímica de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron* utilizando como substrato o farelo de trigo em cultivo em estado sólido.

2. OBJETIVO

- Investigar a produção e caracterização das enzimas β -glicosidase, arabinofuranosidase, xilana esterase, β -xilosidase, xilanase, amilase e peptidase pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron* em cultivo em estado sólido contendo farelo de trigo.

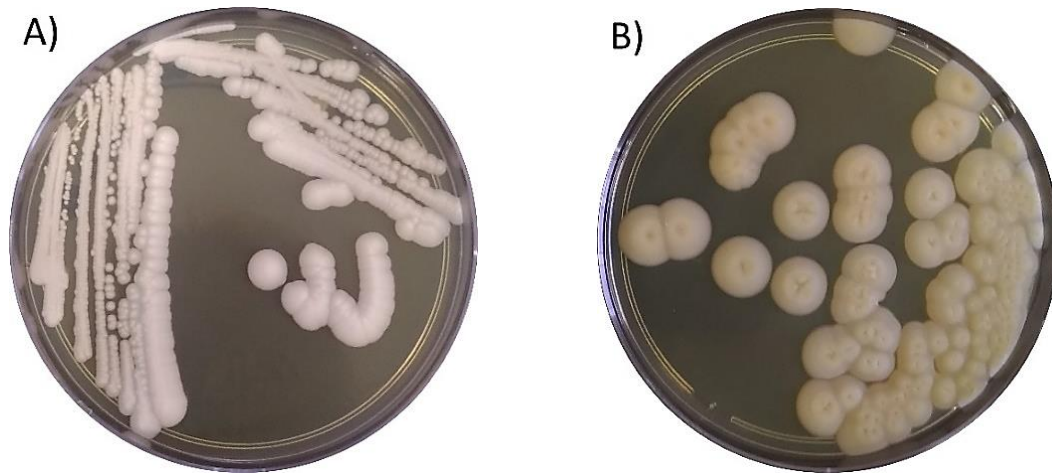
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Os microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas as cepas das leveduras *P. ofunaensis* 1A-14 e *T. multisoron* 1A-10 (Figura 1), isoladas de ninhos de formigas e armazenadas na coleção de trabalho do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE/Unesp de S. J. Rio Preto. A identificação das espécies foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), sob a coordenação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

A conservação das culturas puras foi feita por estocagem a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pérolas de vidro, lavadas com ácido nítrico e esterilizadas, foram adicionadas à suspensão de leveduras, que foram mantidas *overnight* em glicerol (15%) no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, então, transferidas para freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 1. Cultivo em meio YEPD da levedura *P. ofunaensis* (A) e *T. multisoron* (B).



Fonte: autoria própria

3.2 Cultivo em estado sólido e obtenção de solução enzimática

Células de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* foram retiradas de estoque em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e crescidas em tubo de ensaio inclinado contendo 4 mL de meio YEPD (2% peptona, 1% extrato de levedura, 2% glicose e 2% ágar), por 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as células foram resuspendidas através de raspagem suave da superfície da cultura em tubo de cada uma das espécies, em 100 mL de meio YEPD líquido contidos em Erlenmeyer de 250 mL, por 24 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 200 rpm.

Diversas diluições do cultivo foram realizadas e as absorvâncias determinadas a 600 nm. Paralelamente, as mesmas suspensões foram centrifugadas a $10000 \times g$, por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado, as células suspensas em água destilada e centrifugadas novamente. O precipitado de células foi, então, levado à estufa a 80°C , em ependorf de peso conhecido, até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, plotando-se em gráfico 5 valores de absorvância, representando a densidade celular e de peso seco correspondentes, obtendo-se uma equação de regressão linear. Esta equação foi utilizada para estimar a massa celular a ser utilizada como inóculo para cada uma das espécies.

A primeira cultura, descrita no primeiro parágrafo desse ponto, foi considerada o pré-inóculo. Esta foi centrifugada a $10.000 \times g$, por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida o sobrenadante foi descartado e a biomassa utilizada para suspensão celular, foi resuspendida em 30 mL de solução salina estéril composta por K_2HPO_4 (0,1%), KH_2PO_4 (0,1%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02%) constituindo assim o inóculo.

Para o cultivo em estado sólido, foram utilizados 5 gramas de farelo de trigo como substrato, em embalagens de polipropileno (15x25 cm) (Figura 2), hidratados com 10 mL de solução salina estéril. A esse substrato foi adicionado 1,0 mg e 1,3 mg de inóculo para *P. ofunaensis* e para *T. multisoron*, respectivamente. Anteriormente, o farelo de trigo foi submetido a lavagens com água destilada e seco em estufa com circulação de ar a 60°C.

Figura 2. Saco de cultivo contendo farelo de trigo e solução salina.



Fonte: autoria própria

As embalagens foram incubadas a 28 °C durante 288 horas (12 dias), sendo removida uma delas a cada 24 horas. A cada embalagem removida contendo o material fermentado, foram adicionados 50 mL de água destilada, realizada homogeneização em agitador por 1 hora, a 160 rpm, em temperatura de 25 ± 2 °C, filtrado em tecido musseline e centrifugado a 10.000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática, verificando-se a atividade de hidrólise dos seguintes substratos: α -L- arabinofuranosídeo, β -xilopiranosídeo, β -glicopiranosídeo, 4-Nitrofenil acetato, caseína, amido e carboximetilcelulose.

Definindo-se um período adequado de cultivo com base no dia de produção máxima da enzima, novo cultivo foi realizada. Foram utilizadas 20 embalagens para o cultivo de cada uma das leveduras (*P. ofunaensis* e *T. multisoron*) por 9 dias, sob as mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante obtido foi concentrado 4,8x para *P. ofunaensis* e 6,5x

para *T. multisoron* utilizando bomba peristáltica QuixStand (Watson-Marlow®) (Figura 3) com membrana filtrante de corte de 10 kDa a 180 rpm. As soluções enzimáticas concentradas foram utilizadas para a caracterização bioquímica funcional das β -glicosidases.

Figura 3. Sistema de bancada QSM-03SP QuixStand com bomba peristáltica e cartucho de fibra oca tamanho Xampler 4M.



Fonte: GE Healthcare Life Sciences, 2019.

3.3 Determinação das atividades enzimáticas

Em um primeiro momento foi realizado um screening das atividades enzimáticas de β -glicosidase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, acetil xilana esterase, peptidase, amílase e carboximetilcelulase a partir das soluções enzimáticas obtidas ao longo de 12 dias de cultivo de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* e havendo hidrólise do substrato, identificar o dia de cultivo com máxima produção da enzima responsável.

As atividades das enzimas β -glicosidase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase e acetil xilana esterase foram determinadas utilizando os substratos 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, 4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, 4-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo e 4-Nitrofenil acetato, respectivamente, à 4 mM diluído em tampão acetato pH 5,0 0,1 M. As reações foram realizadas utilizando 25 μ L de solução enzimática de cada um dos 12 dias de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, 125 μ L de tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 125 μ L do substrato correspondente nas

condições descritas acima, diluídos nesse mesmo tampão. Foram conduzidas a 40 °C por 15 minutos e paralisadas pela adição de 1 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2M. O ensaio foi realizado em triplicata. A quantificação das atividades destas enzimas foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 410 nm. A solução do dia com maior atividade enzimática foi considerada como 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

As atividades proteolíticas das soluções enzimáticas foram investigadas utilizando como substrato caseína 1% preparada em tampão MES pH 6,5 à 0,1 M. A reação foi realizada utilizando 50 μL das soluções enzimáticas de cada um dos 12 dias de cultivo de cada levedura e 500 μL do preparado de caseína. As reações foram conduzidas a 40°C por 2 horas em triplicata e foram paralisadas pela adição de 300 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, seguido de centrifugação por 10 minutos a 10.000 xg e leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 280 nm.

As atividades enzimáticas de amilases e carboximetilcelulases foram determinadas utilizando os substratos amido e carboximetilcelulose, respectivamente, a 1%, em tampão acetato pH 5,0 a 0,1 M. As reações foram realizadas utilizando 25 μL das soluções enzimáticas de cada um dos 12 dias de cultivo de cada levedura e 225 μL do preparado de amido e carboximetilcelulose. As reações foram conduzidas a 40 °C por 30 minutos em triplicata e paralisadas pela adição de 250 μL de reagente DNS para a quantificação dos açúcares redutores liberados (MILLER, 1959), a partir de uma curva padrão de glicose. Após a reação do DNS foram adicionados 2,5 mL de água. A leitura das reações foi realizada com utilização de espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

3.4 Caracterização bioquímica funcional das enzimas

3.4.1. Influência do pH e temperatura na atividade e estabilidade das β -glicosidases

O efeito de pH na atividade e estabilidade enzimática das β -glicosidases foi avaliado usando os reagentes de tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M com a abrangência de pH de 3,0 a 10,0, com variações de 0,5 unidades. Para ensaio de pH ótimo foram utilizados 50 μL das soluções enzimáticas, de cada levedura, devidamente diluídos em água, 200 μL de cada tampão pH 3 a 10, individualmente, e 50 μL de substrato pNPG 4 mM diluído em água. A reação foi conduzida a 40 °C por 10 minutos para *P. ofunaensis* e 15 minutos para *T. multisoron*. O tempo de reação ótimo para a determinação da atividade enzimática foi estabelecido através da avaliação de relação linear entre a quantidade de produto liberada e o tempo de reação dentro das condições deste ensaio. Foram avaliados seis tempos para cada espécie (10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos). A reação foi paralisada pela adição de 500 μL de

carbonato de sódio 2 M e a leitura foi realizada em espectrofotometro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O pH no qual foi obtido maior atividade enzimática, foi considerado como 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

O efeito da temperatura na atividade das β -glicosidases foi avaliado com abrangência de 30 a 70 °C, com variações de 5 °C. O ensaio foi realizado conforme descrito acima para ambas as leveduras, porém o tampão utilizado no preparo da diluição da solução enzimática, na reação e diluição de pNPG foi MES 0,1 M pH 5,5, conforme análise de resultado obtido do ensaio de pH ótimo. A leitura foi realizada em espectrofotometro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. A temperatura na qual foi obtida maior atividade enzimática foi considerada 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

A estabilidade frente ao pH das β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* foi avaliada com abrangência de pH de 3,0 a 10,0, com variações de 0,5 unidades. Para isso foram incubados juntamente 25 μ L das soluções enzimáticas, de cada levedura, adequadamente diluídos em tampão MES 0,1 M pH 5,5 e 75 μ L de cada tampão. O ensaio foi realizado em dois diferentes lotes para cada espécie, um incubado por 24 horas a 4 °C e outro incubado por 24 horas a 25 °C. Para reação foi adicionado 200 μ L do tampão MES 0,1 M pH 5,5 e 50 μ L de pNPG 4 mM dissolvido nesse mesmo tampão, como os volumes dessa reação foram diferentes da anterior, o ensaio foi conduzido por 25 minutos para *P. ofunaensis* e 40 minutos para *T. multisoron* a 50 °C. A reação foi paralisada pela adição de 500 μ L de carbonato de sódio 2M e a leitura foi realizada em espectrofotometro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

Os ensaios de termoestabilidade foram realizados com abrangência de temperatura de 30 a 70 °C, com intervalo de 5 °C. O ensaio consistiu da incubação de 50 μ L das soluções enzimáticas, de cada levedura, adequadamente diluído em tampão MES 0,1 M pH 5,5 nessas diferentes temperaturas por 15, 30 e 60 minutos. A reação foi realizada da mesma maneira descrita acima para o pH ótimo, porém a reação foi conduzida a 50°C, conforme análise de resultado obtido do ensaio de temperatura ótima, e foi paralisada pela adição de 500 μ L de carbonato de sódio 2 M. A leitura foi realizada em espectrofotometro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

O pH e temperatura ótimos foram, também, determinadas para as β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* utilizando celobiose como substrato de hidrólise. Para determinação de pH ótimo foi utilizado D-celobiose a 1% diluída nos tampões *Good Buffer*

(BEYNON; EASTERBY, 1996) pH 3 a 8, com variações de 0,5 unidades, a 0,1 M. A reação foi conduzida utilizando 50 μL das soluções enzimáticas e 250 μL das soluções de celobiose, individualmente, por 3 horas a 50 °C, seguido de incubação em banho maria de ebulição por 10 minutos para paralisação da reação. O tempo de reação ótimo para a determinação da atividade enzimática foi estabelecido através da avaliação de relação linear entre a quantidade de produto liberada e o tempo de reação dentro das condições deste ensaio, sendo avaliados três tempos para cada espécie (1, 2 e 3 horas). Após, foi adicionado a reação 1 mL do reagente do kit glicose (Katal®) seguido de incubação a 37 °C por 10 minutos e realizada a leitura em espectrofotometro a 505nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O pH no qual foi obtido maior atividade enzimática, foi considerado como 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

O efeito da temperatura na atividade das β -glicosidases foi avaliado com abrangência de 30 a 70 °C, com variações de 5 °C. A reação foi realizada da mesma maneira do ensaio acima, porém o substrato utilizado foi celobiose 1% diluída em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 para ambas as leveduras, conforme resultados do ensaio de pH ótimo com celobiose como substrato. O ensaio foi realizado em triplicata. A temperatura na qual foi obtida maior atividade enzimática foi considerada 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

3.4.2. Efeito de íons metálicos e outras substâncias sobre a atividade das β -glicosidases

Foram avaliados o efeito de íons derivados de sais cloreto Li^+ , Na^+ e K^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{+2} , Hg^{+2} e Zn^{2+} , Fe^{3+} e Al^{+3} nas concentrações de 5 e 10 mM e de β -mercaptoetanol, SDS, EDTA e DTT, nas concentrações 5, 10, 20 e 50 mM, sobre as atividades β -glicosídicas de *P. ofunaesis* e *T. multisoron*.

Ambos, íons e substâncias, foram avaliados por meio da incubação das soluções enzimáticas devidamente diluídas em tampão MES 0,1 M pH 5,5 na presença dos referidos íons e substâncias de modo a atingir as concentrações finais descritas acima e mantidos por 5 minutos em temperatura ambiente. As reações enzimáticas foram conduzidas na sequência e as misturas reacionais consistiram de 15 μL da solução enzimática submetida ao suposto inibidor, 15 μL de tampão MES 0,1 M pH 5,5 e 70 μL de pNPG 4 mM diluído neste mesmo tampão e incubadas a 50 °C por 10 minutos para ambas as espécies. O tempo de reação ótimo para a determinação da atividade enzimática foi estabelecido através da avaliação de relação linear entre a quantidade de produto liberada e o tempo de reação dentro das condições deste ensaio, sendo avaliados três tempos para cada uma das espécies (10, 20 e 30 minutos). As reações foram interrompidas pela adição de 80 μL de carbonato 2 M e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos

foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

Os ensaios com íons foram realizados utilizando as soluções enzimáticas dialisadas e não dialisadas. A diálise ocorreu durante 12 horas em tampão MES 20 mM pH 5,5 a 4°C sob agitação. Os resultados encontrados para ambos os ensaios foram muito similares, indicando que os íons presentes na solução enzimática, derivados da solução salina usada no cultivo, não atingiram níveis de concentração suficientes para interferirem nos resultados.

3.4.3. Efeito de solventes orgânicos sobre a atividade das β -glicosidases

A influência dos solventes etanol, metanol, isopropanol e acetona, foram avaliados nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% (v/v), sobre as atividades das β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Os ensaios foram realizados e conduzidos como descritos no item anterior. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

A influência do etanol sobre a atividade enzimática de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* ao longo do tempo foi avaliado. Nesse ensaio foram incubadas quatro preparados enzimáticos diferentes para cada espécie, por 120 horas a 25 °C: um preparado de solução enzimática devidamente diluída em tampão glicina 0,1 M pH 3,5 contendo 15% de etanol, um preparado de solução enzimática devidamente diluída em tampão glicina 0,1 M pH 3,5 sem etanol, um preparado de solução enzimática devidamente diluída em tampão MES 0,1 M pH 5,5 contendo 15% de etanol e um preparado de solução enzimática devidamente diluída em tampão MES 0,1 M pH 5,5 sem etanol. Trinta μ L de cada um destes preparados foram retirados após 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação para serem reagidos. As reações ocorreram utilizando-se esses 30 μ L de cada um destes preparados e 70 μ L de pNPG 4 mM nas mesmas condições de cada um dos preparados, ou seja, o substrato diluído em tampão glicina 0,1 M pH 3,5 com ou sem 15% de etanol e diluído em tampão MES 0,1 M pH 5,5 com ou sem 15% de etanol. As reações foram conduzidas a 50 °C por 30 e 45 minutos para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, respectivamente. As reações foram interrompidas pela adição de 80 μ L de carbonato de sódio 2 M e lidas em espectrofotômetro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

3.4.4. Efeito de açúcares sobre a atividade das β -glicosidases

A influência dos açúcares glicose, celobiose e xilose sobre a atividade enzimática das β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* foi avaliada. Glicose e xilose foram avaliadas nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810, 945, 1080,

1350 e 1615 mM e celobiose nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675 e 810 mM. Os ensaios foram realizados e conduzidos como descritos no item 3.4.2. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

3.4.5. Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade das β -glicosidases

A influencia de compostos fenólicos sobre a atividade β -glicosídica de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* foi avaliada sobre a concentração de 10 mM. Os compostos utilizados foram o ácido siríngico, vanilina, ácido 4-hidróxibenzoico, ácido vanílico, ácido ferúlico, siringaldeído, ácido P-comárico, ácido gálico e ácido tânico. O ensaio foi realizado em triplicata e conduzido como descrito no item 3.4.2.

3.4.6. Atividade enzimática sobre diferentes substratos

Foi verificada a atividade de hidrólise das soluções enzimáticas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* dos seguintes substratos: carboximetilcelulose, avicel, xilana *beechwood*, amido, β -1,3-Glucana, 4-Nitrofenil α -L- arabinofuranosídeo, 4-Nitrofenil acetato, 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, caseína, D-(+)-Celobiose, maltose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose e D-(+)-Celotriose. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em U mL⁻¹.

Os ensaios realizados com os substratos avicel, carboximetilcelulose, celobiose, xilana *beechwood* e amido, foram realizados conforme descritos acima no item 3.3 para o substrato amido e carboximetilcelulose, entretanto as soluções enzimáticas e os substratos a 1% foram diluídos em tampão MES 0,1 M pH 5,5 e as reações foram conduzidas a 50 °C por 2 horas. A leitura das reações foi realizada com utilização de espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A quantificação da atividade enzimática foi feita confrontando-se a leitura com curva de calibração (6 pontos) tendo como padrão a glicose na concentração de 0 a 1,24 μ M e xilose na concentração de 0 a 1,49 μ M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

Os ensaios realizados com os substratos 4-Nitrofenil- β -D- xilopiranosídeo, 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, 4-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo e 4-Nitrofenil acetato foram determinadas como descrito no item 3.3 para β -glicosidase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase e acetil xilana esterase, entretanto o tampão utilizado nas reações foi MES 0,1 M pH 5,5. Diferente dos ensaios utilizando os substratos substratos 4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, 4-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo e 4-Nitrofenil acetato, as soluções

enzimáticas foram previamente diluídas de maneira adequada em MES pH 5,5 a 0,1 M para o ensaio utilizando o substrato 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. As reações foram conduzidas por 15 minutos a 50 °C. A leitura das reações foi realizada com utilização de espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm. A quantificação da atividade enzimática foi feita confrontando-se a leitura com curva de calibração (7 pontos) tendo como padrão o 4-nitrofenol na concentração de 0 a 0,08 μ M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de 4-nitrofenol por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

Os ensaios utilizando caseína como substrato foram realizados como descrito no item 3.3 para o ensaio com caseína, entretanto a solução enzimática utilizada foi devidamente diluída em tampão MES 0,1 M, pH 5,5 e a reação foi conduzida por 2 horas a 50° C. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para promover um aumento de 0,01 na absorbância a 280 nm (KOCABIYIK; ÖZDEMIR, 2006).

Para determinação da atividade enzimática sobre os seguintes substratos D-(+)-Celobiose, maltose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose e D-(+)-Celotriose, foram utilizados 50 μ L de solução enzimática e 250 μ L de cada substrato a 1% diluído em tampão MES pH 5,5 0,1,M durante 4 horas a 50 °C, seguido de incubação em banho maria de ebulição por 10 minutos para paralisação da reação. Após, foi adicionado 1 mL do reagente do kit glicose (Katal®) e as reações foram incubadas por 10 minutos a 37 °C. A leitura das reações foi realizada com utilização de espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm. A quantificação da atividade enzimática foi feita confrontando-se a leitura com curva de calibração (9 pontos) preparada utilizando o kit glicose tendo como padrão a glicose nas concentrações de 0 a 0,18 μ M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de glicose por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção das enzimas

P. ofunensis e *T. multisoron* tiveram suas soluções enzimáticas obtidas ao longo dos 12 dias de cultivo analisadas para a presença das enzimas β -glicosidase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, acetil xilana esterase, peptidases, amílases e carboximetilcelulase. Ambas as espécies apresentaram apenas atividade de β -glicosidase (Tabela 1).

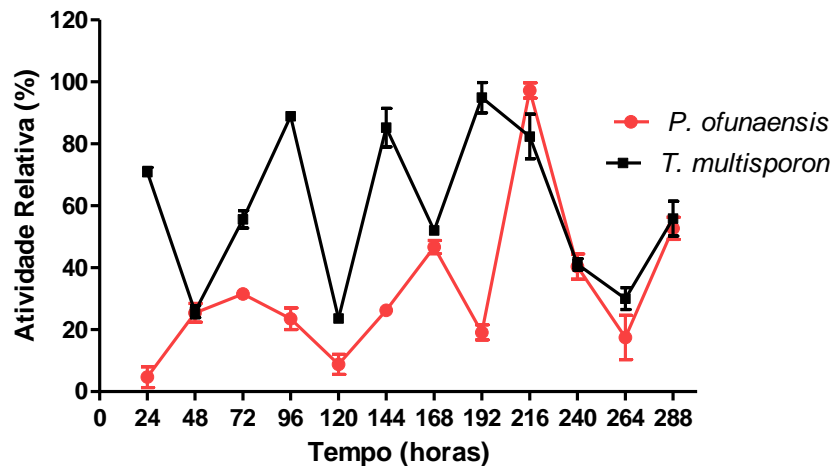
Os perfis de atividades de β -glicosidase das duas espécies ao longos dos 12 dias de cultivo estão apresentados na Figura 4. Note-se que a maior produção de β -glicosidases ocorreu no 9º dia para *P. ofunaensis* (216 horas) e entre o 8º e 9º dia para *T.multisporon* (192-216 horas). Dessa forma, para a continuidade dos experimentos, as fermentações foram fixadas em 9 dias de cultivo.

Tabela 1. Avaliação de atividade hidrolítica das soluções enzimáticas de *P. ofunaensis* e *T. multisporon* obtidas dos 12 dias de cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato sobre os substratos 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosideo, 4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosideo, 4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosideo, 4-Nitrofenil acetato (4 mM diluído em tampão acetato pH 5,0 0,1 M); caseína (caseína 1% em tampão MES pH 6,5 à 0,1 M); amido e carboximetilcelulose (amido e carboximetilcelulose, repectivamente, a 1%, em tampão acetato pH 5,0 a 0,1 M). Presença de atividade sendo representada como (+) e ausência como (-).

Substratos	Atividade hidrolítica	
	<i>Pichia ofunaensis</i>	<i>Trichosporon multisporon</i>
4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosideo	+	+
4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosideo	-	-
4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosideo	-	-
4-Nitrofenil acetato	-	-
Caseína	-	-
Amido	-	-
Carboximetilcelulose	-	-

Fonte: autoria própria.

Figura 4. Gráfico indicando a relação entre atividade enzimática relativa (%) e tempo (horas) para produção das enzimas β -glicosidase em cultivo em estado sólido por *P. ofunaensis* e *T. multisoron* durante 288 horas, utilizando pNPG 4 mM diluído em tampão acetato pH 5,0 0,1 M. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

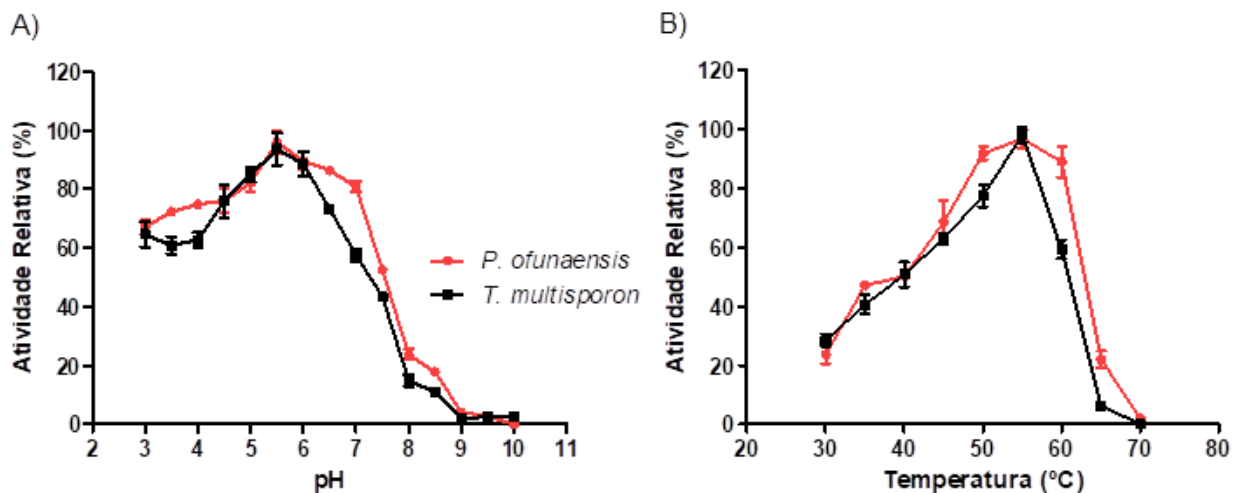
4.2 Caracterização físico-química

4.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das β -glicosidases

A Figura 5 mostra o efeito do pH e temperatura sobre as atividades β -glicosídicas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. As enzimas de *P. ofunaensis* e de *T. multisoron* apresentaram maiores atividades em pH 5,5-6,5 e 5-6, respectivamente, não havendo variação considerável de atividade entre estas faixas. Com relação ao efeito da temperatura, a primeira teve maior atividade na faixa de 50-60 °C, enquanto a segunda a 55 °C. A enzima de *T. multisoron* mostrou diminuição abrupta de atividade após 55 °C, mantendo cerca de 60% de atividade a 60 °C, diferente daquela de *P. ofunaensis* que apresentou diminuição progressiva de atividade apenas acima de 60 °C, mantendo 20% de atividade a 65 °C, enquanto a enzima de *T. multisoron* manteve apenas cerca de 6% de atividade nessa mesma temperatura. Ambas as β -glicosidases não apresentaram atividade a 70 °C. A temperatura ótima observada aqui foi diferente da observada para algumas β -glicosidases fúngicas, como BglJ β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, em que a atividade máxima foi a 40 °C (Kudo et al., 2015). Leite e colaboradores (2007) obtiveram máxima atividade da β -glicosidase produzida pela levedura *A.*

pullulans em pH mais ácido, 4,0-4,5 e temperatura de 80 °C e para o fungo *Thermoascus aurantiacus* máxima atividade β -glicosídica no pH 4,5 e na temperatura de 75 °C. Da Silva e colaboradores (2019) obtiveram máxima atividade da β -glicosidase produzida pela levedura *P. guilliermondii* na faixa de pH 3,5-5,5 e temperatura de 50-55 °C, resultados similares aos reportados aqui para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*.

Figura 5. Efeito do pH (A) e temperatura (B) sobre as atividades de β -glicosidasas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, utilizando como substrato pNPG 4 mM diluído em tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M, para ensaio de pH, e em tampão MÊS 0,1 M pH 5,5, para temperatura. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.



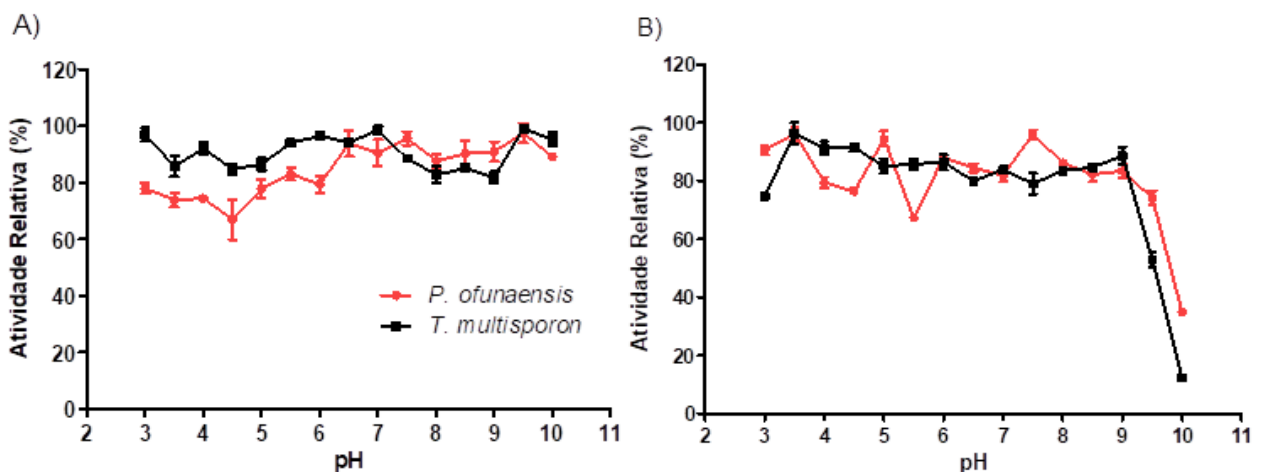
Fonte: autoria própria.

A estabilidade das enzimas incubadas em diferentes valores de pH foi investigada após serem mantidas por 24 horas nas temperaturas de 4 e 25 °C (Figura 6). A enzima de *P. ofunaensis* manteve mais de 60% de sua atividade inicial na faixa de pH 3-10 a 4°C, enquanto a enzima de *T. multisoron* manteve 80% da atividade nestas mesmas condições. Esta última apresentando ser bastante estável à essa ampla faixa de pH avaliado. Quando as soluções enzimáticas foram incubados a 25 °C, a β -glicosidase de *P. ofunaensis* teve mais de 60% de sua atividade preservada na faixa de pH 3-9,5 enquanto a enzima de *T. multisoron* manteve mais de 80% de atividade na faixa entre pH 3,5-9,0. Dessa maneira, a β -glicosidase de *T. multisoron* apresentando uma maior estabilidade nessa ampla faixa de pH nas duas condições avaliadas.

Entretanto, baixas atividades foram recuperadas quando em pH 10,0, nessa temperatura (34 e 12% para as enzimas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, respectivamente).

Os resultados obtidos para enzima de *T. multisoron* em incubação a 25 °C foram similares aos obtidos por Leite e colaboradores (2007) para β -glicosidase de *A. pullulans* incubada por 24 horas em temperatura ambiente, que manteve uma alta estabilidade na ampla faixa de pH 4,5-9,5. Os mesmos autores também avaliaram a estabilidade frente ao pH da β -glicosidase de *Thermoascus arantiacus* nestas mesmas condições, que apresentou estabilidade em uma faixa menor de pH de 4,5-6,5. Além disso, as enzimas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* mantiveram maior estabilidade nas faixas de pH 3-4 e 7,5-8,5 à 25 °C, mantendo mais de 80% da atividade inicial, enquanto *T. aurantiacus* manteve menos de 20 e 70%, respectivamente, nessa mesma temperatura. Da Silva e colaboradores (2019) obtiveram em torno de 80% de atividade β -glicosídica de *P. guilliermondii* em ampla faixa de pH 3-10 a 4 °C, resultado que corrobora os observados para *T. multisoron*, nas mesmas condições de incubação, neste trabalho.

Figura 6. Efeito do pH sobre estabilidade das β -glicosidasas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* após incubação a 4 °C (A) e 25 °C (B) por 24 horas, em ausência de substrato. A reação foi feita utilizando pNPG a 4 mM. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.

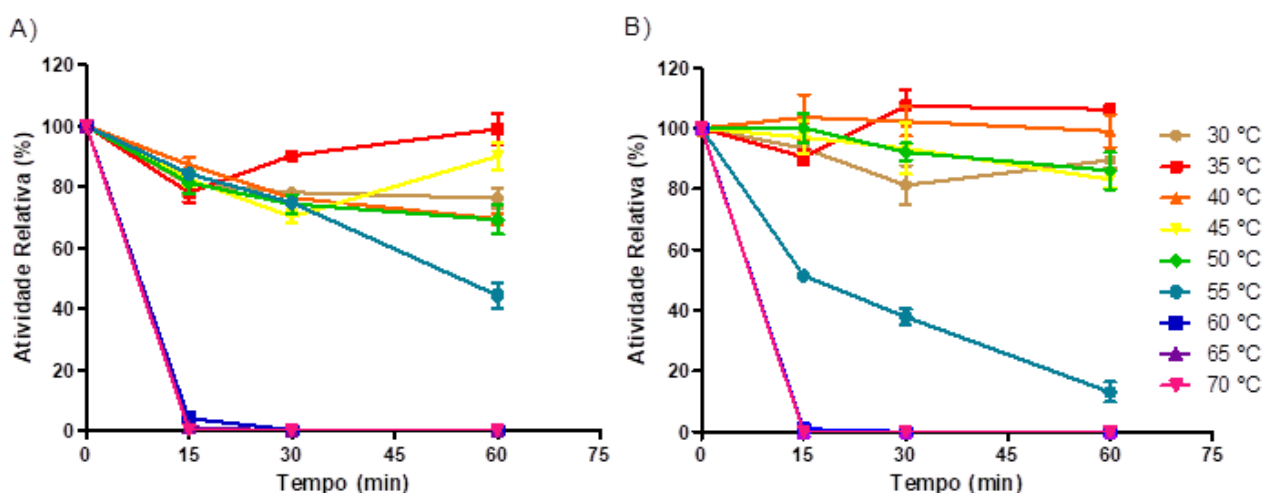


Fonte: autoria própria.

As β -glicosidasas obtidas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* foram incubadas na faixa de temperatura de 30 a 70 °C por 15, 30 e 60 minutos (Figura 7). As enzimas de ambas as espécies foram estáveis na faixa de temperaturas de 30-50 °C, por 1 hora, mantendo mais de

70% de atividade. A enzima de *P. ofunaensis* manteve 44% de atividade ao ser incubada por uma hora a 55 °C e 4% em 15 minutos a 60 °C, enquanto a enzima de *T. multisoron* manteve apenas 13% de atividade por uma hora a 55 °C e perdeu toda sua atividade em 15 minutos a 60 °C, demonstrando ser menos termoestável em comparação com a β -glicosidase de *P. ofunaensis*. Ambas as enzimas foram inativadas a 65 e 70 °C. A termoestabilidade observada para as β -glicosidases deste trabalho foi superior a observada para algumas β -glicosidases fúngicas, como a β -glicosidase BglI de *Aspergillus oryzae*, a qual perdeu toda sua atividade ao ser incubada por 30 minutos a 45 °C (KUDO et al., 2015) e superior a observada para a levedura *P. guilliermondii* que apresentou perda total de atividade quando incubada por 30 minutos a 50 °C (SO et al., 2010). Já outra β -glicosidase produzida por *P. guilliermondii* manteve 70 e 60% de atividade ao ser incubada a 55 e 60 °C, respectivamente, por 80 minutos (DA SILVA, 2019). Já a enzima de *A. pullulans* também demonstrou ter maior termoestabilidade que a de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, mantendo sua atividade acima de 90% a 75 graus durante 1 hora de incubação (LEITE; GOMES; DA SILVA, 2007).

Figura 7. Efeito da temperatura sobre as atividades das β -glicosidases de *P. ofunaensis* (A) e *T. multisoron* (B), quando incubadas por 15, 30 e 60 minutos nas temperaturas de 30-70 °C, com intervalo de 5 °C, em ausência de substrato. A reação foi feita utilizando pNPG a 4 mM diluído em tampão MÊS 0,1 M pH 5,5. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.



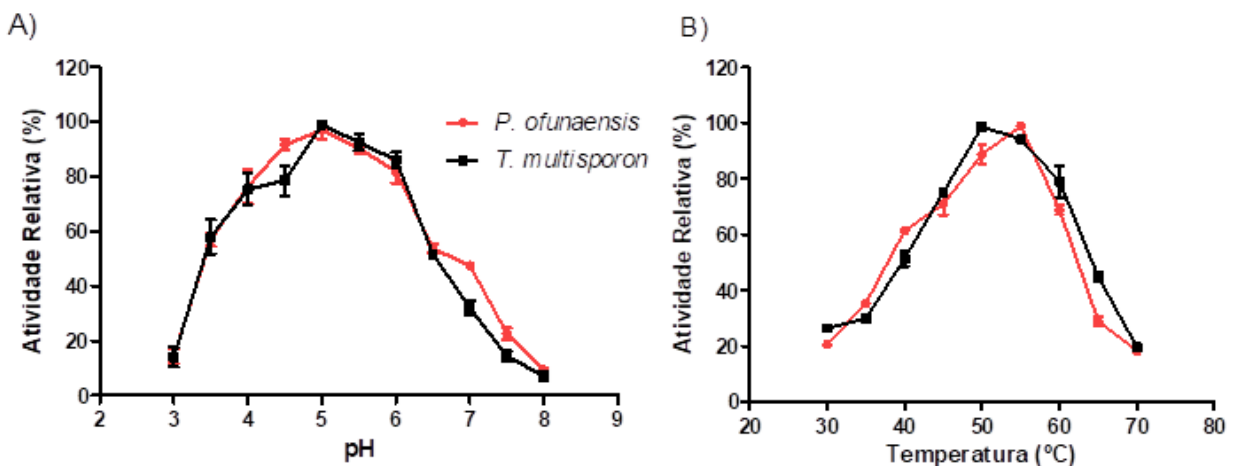
Fonte: autoria própria.

A Figura 8 mostra o efeito do pH e temperatura nas atividades β -glicosídicas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* utilizando celobiose como substrato, ao invés de 4-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG), substrato sintético utilizado para todos os outros ensaios enzimáticos de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*.

A atividade da β -glicosidase de *P. ofunaensis* sobre celobiose foi maior em pH 4,5-5,5 e na temperatura de 55 °C e a de *T. multisoron*, em pH 5 e 50 °C, resultados semelhantes encontrados quando utilizado pNPG como substrato (Figura 4) (a enzima de *P. ofunaensis* apresentou maior atividade em pH 5,5-6,5 e 50-60 °C e a de *T. multisoron* pH 5-6 e temperatura de 55 °C). O mesmo pode ser observado por Bonfá e colaboradores (2018) no seu trabalho, a caracterização da β -glicosidase de *Myceliophthora thermophila* apresentou atividade ótima a 60 °C e pH 5,0 quando o pNPG foi utilizado como substrato, enquanto utilizando celobiose, a maior atividade foi observada a 50 °C e pH 4,5, ou seja, não havendo grandes diferenças de pH e temperatura ótima para as β -glicosidasas entre os 2 diferentes substratos avaliados.

É possível observar que ambas as espécies aqui estudadas apresentam um perfil de pH e temperatura ótimos muito semelhantes utilizando celobiose como substrato de hidrólise, tendo uma abrupta diminuição de atividade em pH inferior a 4,5 e superiores a 6,5, assim como em temperaturas inferiores a 45 °C e superiores a 55 °C.

Figura 8. Efeito do pH (A) e temperatura (B) sobre as atividades de β -glicosidasas de *P. ofunaensis* e de *T. multisoron* utilizando como substrato D-celobiose 1% diluída em tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M, para ensaio de pH, e diluído em tampão MÊS 0,1 M pH 5,5, para ensaio de temperatura. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

4.2.2 Efeito de íons metálicos e outras substâncias sobre a atividade das β -glicosidases

Íons metálicos exercem efeitos sobre a atividade enzimática, uma vez que estabelecem uma forte interação através da sua ligação no sítio catalítico, podendo, assim, inibir, ativar ou mesmo estabilizar essas moléculas (QADER et al., 2017). A forma de interação com a enzima depende, ainda, das características do íon metálico, como sua família de origem (SHRIVER; ATKINS, 2017). Essas substâncias podem estar presentes em processos industriais afetando, assim, a atividade dessas enzimas. Dessa forma, com objetivo de verificar uma possível modulação positiva ou negativa da enzima, foi avaliada a influência da presença de diferentes cátions na forma de sais de cloreto nas concentrações de 5 e 10 mM nas atividades das β -glicosidases, sendo os resultados expostos na Tabela 2.

Dentre os íons metálicos avaliados, nenhum deles apresentou capacidade de modular positivamente as atividades enzimáticas em ambas concentrações avaliadas, enquanto que efeitos negativos consideráveis foram observados para os íons Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Hg^{2+} , sendo o efeito do Cu^{2+} o mais acentuado. Na concentração de 10 mM desse íon, a enzima de *P. ofunaensis* perdeu cerca de 50% de sua atividade, e a de *T. multisoron*, perdeu 43% nessa mesma concentração.

Metais de transição, como Cu^{2+} , exibem afinidade por grupos tiol e resíduos de aminoácidos que contenham oxigênio e nitrogênio (SHRIVER; ATKINS, 2017). Geralmente, esses íons metálicos oxidam os grupos funcionais dos resíduos de cisteína e podem inibir a atividade enzimática de certas proteínas (HAYASHI et al., 1999). O efeito redox do cobre pode atuar oxidando as extremidades hemiacetais e levando à inibição, como apontado para as celulases (TEJIRIAN; XU, 2010). No entanto, além de poder atuar afetando a atividade enzimática por reação redox, o cobre também pode realizar ligação química com os grupos tióis da proteína, sendo essa ligação química também podendo ser responsável pela modulação na atividade enzimática. As β -glicosidases produzidas pelas leveduras deste estudo apresentaram uma maior tolerância a esse íon do que a β -glicosidases de *Penicillium simplicissimum* estudada por Bai e colaboradores (2013), a qual manteve apenas 29,08% da atividade inicial, em decorrência deste íon na concentração de 10 mM. Em um trabalho similar, Kaur e colaboradores (2007) ao estudar a atividade β -glicosídica de *Melanocarpus* sp. também reportara uma redução da atividade de mais de 30% causada pela adição de 10 mM do íon Cu^{2+} . A β -glicosidase de *Aspergillus niger* foi ainda mais sensível ao cobre do que as enzimas avaliadas neste trabalho, mantendo apenas 34% de sua atividade enzimática inicial na presença de 1 mM do íon (TANG et al., 2014).

O íon de Fe^{3+} apresentou modulação negativa para as enzimas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* na concentração de 10 mM, as quais perderam 38 % e 21% de suas atividades enzimática. Isso pode indicar que grupos tióis estão envolvidos no sítio catalítico ativo, talvez sendo essenciais para a manutenção da estrutura 3D da proteína ativa (TANG et al., 2014). Assim como o íon de Cu^{2+} , o íons de Fe^{3+} também é um metal de transição e, portanto, pode estar envolvido em reação redox ou ligação química com os grupos tióis das β -glicosidases de ambas as leveduras (TEJIRIAN; XU, 2010). O efeito de supressão do Fe^{3+} sobre a atividade da β -glicosidase de *A. oryzae* também foi reportada por Tang e colaboradores (2014), 1 mM desse íon reduziu 45% da atividade inicial da enzima, assim como observado por Da Silva e colaboradores (2019), onde essa enzima em *P. guilliermondii* manteve cerca de 60% de atividade na concentração de 5 mM de Fe^{3+} , corroborando os dados encontrados para *P. ofunaensis* neste trabalho. A β -glicosidase de *Dekkera bruxellensis* manteve 78% de atividade na presença de 10 mM desse íon, resultado muito semelhante ao obtido para *T. multisoron* (KURO et al., 2018).

O íon Zn^{2+} , assim como o Cu^{2+} , a 10 mM, inibiu parcialmente a atividade β -glicosídica de ambas as espécies, mantendo cerca de 64% de atividade, corroborando com os resultados dos outros íons de metais de transição, sugerindo que grupos tióis estão envolvidos no sítio catalítico ativo dessas enzimas (Riou et al., 1998). Essa supressão foi muito similar a encontrada por Bonfá e colaboradores (2018) para a β -glicosidase de *Myceliophthora thermophila*, que manteve 63% de atividade na presença de 2,5 mM desse íon. Entretanto as β -glicosidases de ambas as espécies aqui estudadas se mostraram mais tolerantes a presença desse íon do que a enzima de *A. oryzae* estudada por Riou e colaboradores (1998) que manteve apenas 17% da sua atividade inicial em 5 mM de Zn^{2+} .

O íon Al^{3+} afetou negativamente a atividade enzimática de *P. ofunaensis* em ambas as concentrações, porém apenas em 10 mM afetou a atividade de *T. multisoron*, inibindo 23% da atividade enzimática, enquanto *P. ofunaensis* nessa mesma concentração sofreu inibição de 35% da sua atividade. Por ser um semimetal, o efeito sobre a atividade enzimática ocasionado na presença desse íon está atrelada apenas a formação de ligação química com não metais como enxofre, oxigênio e nitrogênio (SHRIVER; ATKINS, 2017). O que novamente reforça a possível presença de grupos tióis envolvidos no, ou próximo ao, sítio ativo destas enzimas. Da Silva e colaboradores (2019) também observaram inibição da atividade enzimática da β -glicosidase de *P. guilliermondii* na presença de Al^{3+} , 5 mM desse íon reduziu a atividade enzimática em torno de 40%. Bonfá e colaboradores mantiveram 83,5% da atividade enzimática de *M. thermophila* na presença de 2,5 mM do íon.

O íon Hg^{2+} exerceu efeito negativo, em ambas as concentrações, sobre a β -glicosidase de *P. ofunaensis*, a qual manteve cerca de 76% de atividade. Por ser um metal de transição, sua ação sobre a enzima também está atrelada a sua capacidade de reação redox ou formação de ligação química com resíduos de aminoácido que contenham enxofre, oxigênio ou nitrogênio (SHRIVER; ATKINS, 2017). Olajuyigbe e colaboradores (2016) obtiveram cerca de 80 e 60% de atividade residual da enzima de *Fusarium oxysporum* nas concentrações de 5 e 10 mM desse íon, respectivamente, enquanto Almeida e colaboradores (2015) obtiveram cerca de 60% de inibição da atividade β -glicosídica de *Penicillium verruculosum* na presença de 10 mM de Hg^{2+} . Ainda, o resultado obtido neste trabalho difere dos encontrados por Riou e colaboradores (1998) que observaram uma completa inibição da β -glicosidase de *A. oryzae* na presença de 5 mM desse íon.

Os íons de metais alcalinos não afetaram a atividade enzimática das β -glicosidases de nenhuma das leveduras, o que pode estar relacionado à pequena capacidade dos elementos dessa família de fazer ligação química com nitrogênio, oxigênio e enxofre, e pode também justificar a pequena queda por formação de par iônico, já que assim como os metais alcalinos terrosos, os metais alcalinos podem formar par iônico com a proteína, afetando assim a atividade desta

Tabela 2. Influência de cátions nas concentrações de 5 e 10 mM sobre as atividades β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Os íons foram derivados sais de cloro. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.

Família	Íons	Atividade relativa (%)			
		<i>Pichia ofunaensis</i>		<i>Trichosporon multisoron</i>	
		5 mM	10 mM	5 mM	10 Mm
Metais de transição	CoCl ₂	85,90 \pm 0,17	85,12 \pm 2,31	90,43 \pm 2,31	84,82 \pm 2,21
	CuCl ₂	65,67 \pm 1,45	49,58 \pm 0,78	61,42 \pm 1,64	57,23 \pm 0,50
	NiCl ₂	89,71 \pm 0,60	83,55 \pm 1,11	87,90 \pm 0,59	89,29 \pm 1,71
	FeCl ₃	80,95 \pm 0,85	62,22 \pm 0,17	87,73 \pm 1,71	79,57 \pm 1,20
	ZnCl ₂	75,63 \pm 0,79	64,72 \pm 1,69	74,54 \pm 2,51	64,82 \pm 0,80
	HgCl ₂	77,02 \pm 1,79	76,72 \pm 0,85	89,43 \pm 0,90	84,54 \pm 0,40
	MnCl ₂	87,80 \pm 0,57	82,60 \pm 1,24	94,42 \pm 0,56	89,99 \pm 0,64
Metais alcalinos	KCl	83,85 \pm 1,03	82,64 \pm 1,37	88,70 \pm 2,47	85,04 \pm 0,90
	LiCl	89,59 \pm 1,62	85,24 \pm 0,43	91,02 \pm 1,77	86,45 \pm 1,10
Metais alcalinos terrosos	MgCl ₂	87,96 \pm 0,51	84,21 \pm 0,68	90,40 \pm 1,29	84,33 \pm 1,50
	CaCl ₂	84,98 \pm 0,25	83,37 \pm 1,71	89,79 \pm 1,72	80,64 \pm 2,11
	BaCl ₂	82,28 \pm 0,24	80,35 \pm 1,20	90,57 \pm 1,50	81,77 \pm 0,10
Semimetal	AlCl ₃	72,73 \pm 0,85	65,97 \pm 0,53	95,25 \pm 2,71	77,38 \pm 1,10

Fonte: autoria própria.

Foi avaliado o efeito da presença de outras substâncias nas atividades enzimática nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 mM, sendo os resultados apresentados na Tabela 3. As β -glicosidases avaliadas apresentaram perda da atividade na presença das substâncias nas diferentes concentrações avaliadas.

Na presença do agente redutor β -mercaptoetanol, a atividade enzimática de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* sofreu uma ligeira redução, mantendo cerca de 90% a 83% e 89% a 79% da atividade enzimática, nas concentrações de 5 a 50 mM, respectivamente. Entre as substâncias avaliadas, foi a segunda com maior efeito de redução de atividade enzimática para *T. multisoron*. Xia e colaboradores (2016) investigaram a atividade β -glicosídica de *Humicola insolens*, a qual também se mostrou sensível à adição de β -mercaptoetanol, entretanto na presença de 5 mM a atividade foi reduzida a 70%, sendo mais sensível que as β -glicosidases deste trabalho. Diferindo dos resultados encontrados no presente trabalho, as β -glicosidases produzidas por *D. bruxellensis* não tiveram atividade afetada pela presença de β -mercaptoetanol na concentração de 10 mM (KUO et al., 2018) e nem mesmo foram ativadas nessa concentração, como aconteceu com a enzima de *Melanocarpus* sp., a qual apresentou um aumento de 30% de atividade inicial na presença de 10 mM desse íon (KAUR et al., 2007).

A adição do detergente SDS exerceu o maior efeito inibitório sobre a atividade enzimática, de ambas as leveduras, dentre as substâncias avaliadas nesse trabalho, indicando assim que as interações hidrofóbicas possuem ação importante na manutenção da estrutura terciária da enzima e conseqüentemente do sítio catalítico desta. A atividade enzimática de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* sofreu redução moderada, mantendo cerca de 81% a 65% e 78% a 63% da atividade enzimática, nas concentrações de 5 a 50 mM, respectivamente. Esses resultados corroboram os encontrados por Xia e colaboradores (2016) que ao investigaram a atividade β -glicosídica de *H. insolens* verificaram que 5 mM de SDS resultou em 78.5% de atividade enzimática. A β -glicosidase de *D. bruxellensis* foi mais sensível ao SDS do que as estudadas aqui, em 10 mM a atividade foi reduzida para 34% (KUO et al., 2018). Em contrapartida, a β -glicosidase de *M. thermophilus* foi mais tolerante que as aqui estudadas, mantendo 91% de atividade em 10 mM dessa substância (KARNAOURI et al., 2013).

Quando adicionado o agente quelante EDTA, houve uma ligeira redução da atividade β -glicosídica de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* de cerca de 14% a 26% e 10% a 19% nas concentrações de 5 a 50 mM, respectivamente, o que sugere que a enzima testada não é dependente de cátion divalente, já que o EDTA “sequestra” preferencialmente esses íons metálicos (PEREIRA et al., 2015). Os resultados aqui obtidos foram semelhantes aos de Xia e colaboradores (2016) onde em 5 mM dessa substância a β -glicosidase de *H. insolens* manteve

83% de atividade. As enzimas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* mostraram-se, ainda, mais tolerantes ao EDTA do que a de *Monascus sanguineus*, em 5 mM manteve menos de 70% de atividade (DIKSHIT; TALLAPRAGADA, 2015) e de *A. oryzae*, em 1 mM manteve apenas 73% (TANG et al., 2014). Entretanto, várias β -glicosidases de diferentes fungos e leveduras mantiveram mais de 90% de atividade na concentração de 10 mM dessa substancia (KARNAOURI et al., 2013; ZHAO et al., 2013; DE OVALLE et al., 2018; KUO et al., 2018), assim como a β -glicosidase de *P. guilliermondii* que não sofreu qualquer tipo de inibição na presença de 5mM de EDTA (DA SILVA et al., 2019).

Quando adicionado o agente redutor DTT, houve uma ligeira redução da atividade β -glicosídica de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* de cerca de 11% a 22% e 11% a 17% nas concentrações de 5 a 50 mM, respectivamente. As ligações dissulfeto desempenham um papel importante na estabilização da conformação nativa de uma proteína e podem ser quimicamente reduzidas por agentes redutores, como DTT e β -mercaptoetanol. Essas mudanças na conformação da proteína podem influenciar as atividades da proteína (HOGG, 2003; CAO et al., 2015). O DTT, assim como o β -mercaptoetanol, inibiu apenas ligeiramente as atividades das β -glicosidases em nosso estudo, o que indica que grupos sulfidríla podem não estar envolvidos no sítio catalítico da proteína ativa, mas podem ser cruciais para a manutenção da estrutura tridimensional da enzima (MALLEK-FAKHFAKH; BELGHITH, 2015). Cao e colaboradores (2015) também relataram uma ligeira inibição da atividade β -glicosídica de *A. fumigatus* nas concentrações de 1 a 5 mM de DTT, assim como a β -glicosidase de *Talaromyces thermophilus*, que nos ensaios de 5 e 10 mM não mostrou uma inibição significativa, tendo também uma baixa susceptibilidade a essa substância. (MALLEK-FAKHFAKH; BELGHITH, 2015). Essa mesma enzima em *M. thermophila* manteve 82,5% de atividade na presença de 2,5 mM de DTT (BONFÁ et al., 2018). Entretanto, a atividade da β -glicosidase de *Melanocarpus* sp. sofreu um aumento de mais de 20% na presença de 10 mM de DTT (KAUR et al., 2007).

De maneira geral, pode-se observar que as β -glicosidases de ambas as espécies desse trabalho, apresentaram tolerância às substâncias avaliadas. Mesmo na maior concentração de 50 mM, nenhuma das enzimas manteve menos de 60% de atividade, indicando assim seu caráter de tolerância, sendo aptas a serem aplicadas em processos indústrias que envolvam a presença dessas substancias até essa concentração.

Tabela 3. Efeito dos reagentes β -Mercaptoetanol, SDS, EDTA e DDT e nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 mM na atividade de β -glicosidase de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.

Substâncias	Atividade relativa (%)							
	<i>Pichia ofunaensis</i>				<i>Trichosporon multisoron</i>			
	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM	5 mM	10 mM	20mM	50 mM
β-mercaptoetanol	89,98 \pm 0,28	86,46 \pm 0,66	83,28 \pm 3,10	82,99 \pm 2,08	89,24 \pm 1,32	83,29 \pm 2,11	87,64 \pm \pm 1,03	78,89 \pm 2,38
SDS	81,49 \pm 1,50	75,58 \pm 1,03	72,20 \pm 3,38	65,87 \pm 2,36	78,22 \pm 2,5	74,81 \pm 2,41	69,27 \pm \pm 2,33	63,63 \pm 0,81
EDTA	86,99 \pm 2,35	80,85 \pm 0,75	77,90 \pm 3,19	74,59 \pm 0,19	90,95 \pm 2,29	84,53 \pm 2,88	83,89 \pm \pm 2,96	81,40 \pm 4,06
DTT	89,52 \pm 1,03	81,53 \pm 0,19	80,42 \pm 3,38	78,61 \pm 1,43	89,08 \pm 1,76	87,14 \pm 0,77	86,06 \pm \pm 0,11	83,73 \pm 0,77

SDS: dodecil sulfato de sódio, EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético, DTT: ditiotreitól.

Fonte: autoria própria.

4.2.3 Efeito de solventes orgânicos sobre a atividade das β -glicosidases

Algumas metodologias em tecnologia enzimática empregam o uso de solventes orgânicos em processos de concentração de enzimas, através de precipitação das mesmas, e algumas aplicações utilizando enzimas ocorrem na presença de solventes orgânicos, como enzimas aplicadas à enologia, além de processos de sacarificação e fermentação conjunta. Por esta razão, os efeitos do etanol, metanol, isopropanol e acetona sobre a atividade destas β -glicosidases foram avaliados. Nos últimos anos, a indústria de alimentos tem demonstrado crescente interesse em enzimas, em particular, o setor enológico e produtor de sucos tem focado sua atenção nas β -glicosidases (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). Estas promovem a liberação do aroma de sucos, mostos e vinhos através de um mecanismo de hidrólise dos precursores glicosídicos do aroma, especialmente glicosídeos terpênicos, que são responsáveis pelo caráter varietal de muitas uvas (WINTERHALTER; SKOUROUMOUNIS, 1997).

Os glicosídeos não voláteis inodoros podem ser hidrolisados por hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise rápida de ácido pode causar rearranjos na estrutura da aglicona juntamente com a formação de odores indesejáveis (HERNANDEZ-ORTE et al., 2009). No entanto, a hidrólise enzimática cliva apenas a ligação glicosídica sem alterar a aglicona, o que

torna esse procedimento mais eficiente (MCMAHON et al., 1999). Quando os mecanismos enzimáticos são desencadeados, a hidrólise dos glicósidos envolve sequencialmente, primeiro a ação de ramnosidases (EC 3.2.1.40) e α -L-arabinofuranosidases, seguida da β -glucosidases que são enzimas capazes de liberar aglicona, por sua vez diretamente responsável pelo aumento do aroma do vinho (GUNATA et al., 1988; DIGNUM; KERLER; VERPOORTE, 2001). Neste caso, a β -glucosidase ideal deve ser estável em pH baixo (pH entre 2,5 a 3,8), manter a atividade numa concentração de glicose de 10 a 20% e reter atividade na presença de 10 a 15% de etanol (RIOU et al., 1998). Dessa maneira é de grande interesse avaliar o efeito de etanol assim como de glicose sobre as β -glucosidases aqui estudadas.

O efeito da presença de quatro solventes orgânicos foi avaliado nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% (v/v), de acordo com o exposto na Figura 9.

Ao avaliar a curva do efeito do etanol nas soluções enzimáticas (Figura 9-A), é possível observar que este solvente foi o que afetou de maneira mais distintas as duas espécies, descrevendo curvas diferentes ao longo das concentrações avaliadas, enquanto que os outros solventes ocasionaram um perfil de inibição muito similar entre as β -glucosidases das duas espécies.

Entre as enzimas das duas leveduras, a de *P. ofunaensis* sofreu menor inibição na presença de etanol. A atividade enzimática dessa levedura, na presença de 2 e 10% de etanol sofre um pequeno aumento de 2 e 6%, respectivamente. Nas concentrações de etanol do vinho (10-20%), a enzima de *P. ofunaensis* apresenta mais de 100% de atividade, enquanto a de *T. multisoron* manteve cerca de 70%. Porém acima de 20% de etanol a ativação de *P. ofuanensis* diminuiu, provavelmente devido ao efeito de desnaturação pelo etanol, uma vez que muitas proteínas se degradam em resposta à exposição a álcoois. Nenhuma das β -glucosidases tiveram sua atividade totalmente inibida, mesmo na maior concentração avaliada de 50%, as atividades se mantiveram acima de 60%.

O aumento de atividade de β -glucosidase microbiana produzida pelo etanol já foi observado por outros autores (LEITE et al., 2008; NARASIMHA et al., 2016). Barbagallo e colaboradores (2014), por exemplo, reportaram um aumento de mais de 50% de atividade enzimática de β -glucosidases de *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae* na presença de 10-20% de etanol. Da silva e colaboradores (2019) também reportaram um aumento de 10-15% na atividade de β -glucosidase de *P. guilliermondii* na concentração de 10-30% de etanol. Zhao e colaboradores (2013) também tiveram um aumento de 7% da atividade da β -glucosidase de *A. niger* na presença de 10% de etanol, o que corrobora com os resultados de *P. ofunaensis* obtidos nesse trabalho. Na concentração de 30% de etanol, *A. niger* manteve 67% de atividade, nessa

mesma concentração *P. ofunaensis* e *T. multisoron* mantiveram 89% e 59% de atividade, respectivamente.

Esse aumento da atividade enzimática induzido pelo etanol pode ser atribuído à atividade glicosil-transferase da β -glicosidase. O etanol aumenta as taxas de reação atuando como um acceptor de um intermediário glicosil-chave (BARBAGALLO et al., 2014). Foi relatado que a mudança na polaridade do meio induzida por álcoois pode facilitar o acesso ao substrato e assim como estabilizar a conformação da enzima (PEMBERTON; BROWN; EMERT, 1980; MATEO; DI STEFANO, 1997).

A β -glicosidase de *T. multisoron* apresentou maior atividade na concentração de 2% de etanol. Barbagallo e colaboradores (2014) observaram máxima atividade para a β -glicosidase de *Hanseniaspora uvarum* CBS 314 na concentração de 4-6% de etanol, entretanto essa atividade foi menor que 50%, enquanto a enzima de *T. multisoron* manteve acima de 80% nas concentrações de etanol de 2 e 10%. A β -glicosidase de *A. niger* manteve menos de 30% de atividade em 20% de etanol, enquanto ambas as espécies desse trabalho apresentaram mais de 70% nessa mesma concentração (BARBAGALLO et al., 2004). Kudo e colaboradores (2015) também observaram a ação repressiva do etanol em β -glicosidase de *A. oryzae*, onde na presença de 20% de etanol apenas 40% da atividade inicial de BglA foi mantida e BglJ foi totalmente inibida, apresentando assim menor tolerância ao etanol do que as β -glicosidades descritas nesse trabalho. Além disso, na concentração de 50% o etanol causou menos de 32% e 44% de inibição em *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, respectivamente, já a β -glicosidase de *P. guilliermondi* teve aproximadamente 50% de sua atividade inibida nessa mesma concentração (DA SILVA, et al., 2019).

O efeito de metanol (Figura 9-B) sobre a atividade das soluções enzimáticas das duas leveduras foi muito sutil nas concentrações de 2-30%, a atividade nestas foi mantida acima de 95%. Já na maior concentração avaliada de 50% de metanol, a β -glicosidase de *P. ofunaensis* manteve cerca de 57% de atividade enquanto *T. multisoron* manteve cerca de 62%, sendo ligeiramente mais tolerante ao metanol.

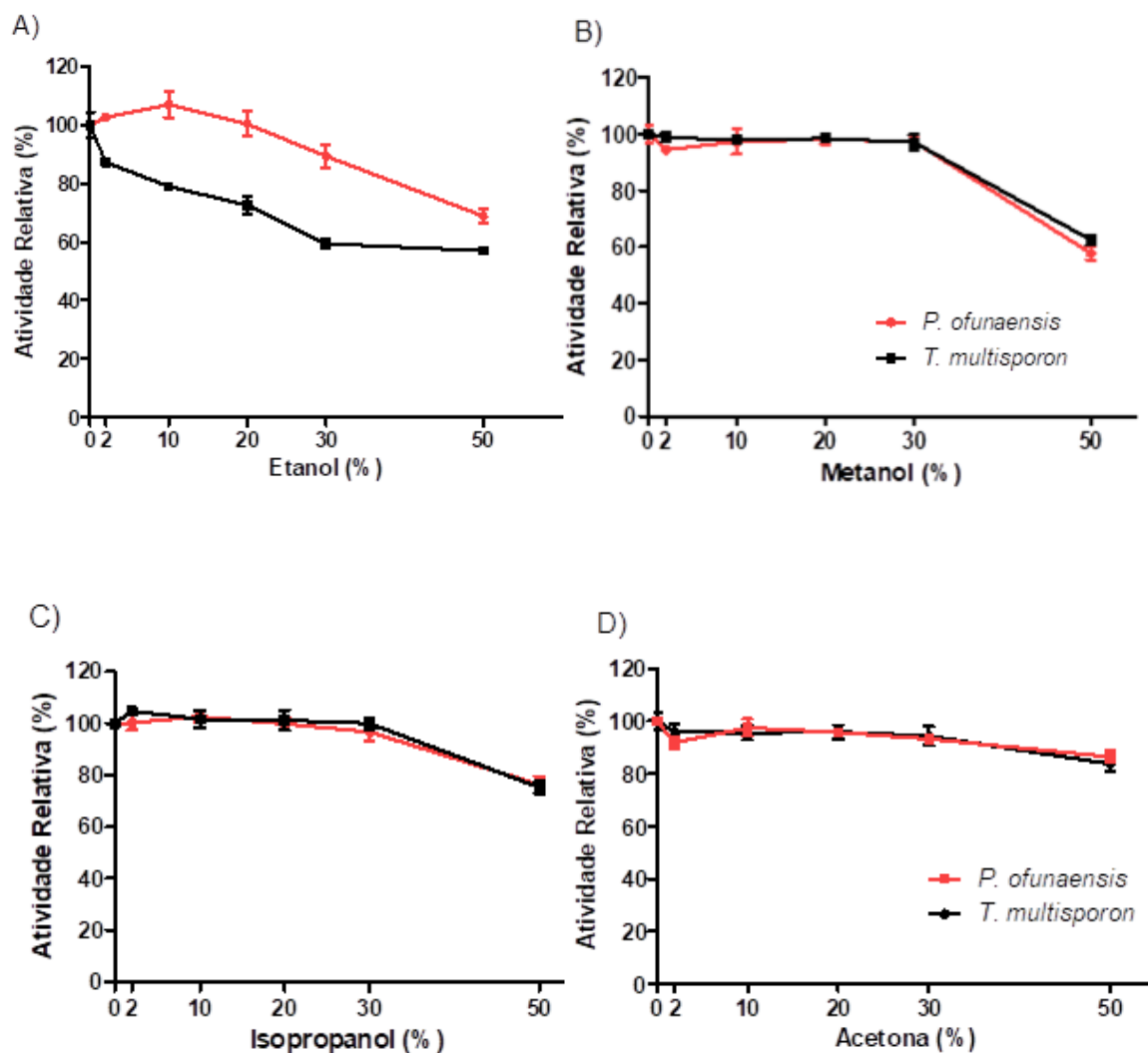
O efeito do isopropanol (Figura 9-C) sobre a atividade das soluções enzimáticas das duas leveduras foi muito sutil nas concentrações de 2-30%, a atividade nestas concentrações foi mantida acima de 95%. Em 50% de isopropanol, ambas as espécies mantiveram mais de 70% de atividade, tendo um perfil de inibição muito parecido entre si.

A acetona (Figura 9-D) foi o solvente orgânico com menor efeito de inibição entre todos os avaliados neste trabalho. Ao longo de todas as concentrações avaliadas, as atividades de ambas β -glicosidades se mantiveram acima de 80%.

A β -glicosidase de *P. guilliermondii* estudada por Da Silva e colaboradores (2019) foi tolerante a metanol, isopropanol e acetona até a concentração de 30% destes reagentes, corroborando os resultados obtidos nesse trabalho. Na concentração de 50%, o isopropanol não afetou atividade de *P. guilliermondii*, diferente do observado para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, onde a concentração de 50% de isopropanol ocasionou uma redução de 30% de atividade. Os resultados obtidos para *P. guilliermondii* na presença de 50% de metanol foi similar aos obtidos aqui, causando cerca de 40% de inibição da atividade enzimática. A acetona foi o solvente com maior diferença de ação inibitória, na concentração de 50% a β -glicosidase de *P. guilliermondii* manteve apenas 9% de atividade residual, enquanto que *P. ofunaensis* e *T. multisoron* mantiveram acima de 80% de atividade, sendo este o solvente aqui avaliado que menos afetou a atividade enzimática β -glicosídica na concentração de 50%. A perda de atividade das β -glicosidases na presença destes solventes indica que a exposição resulta em desnaturação da enzima, afetando assim sua atividade catalítica.

Diferente das β -glicosidases deste trabalho, Zhao e colaboradores (2013) relataram que nas concentrações de 10-30%, o metanol ocasionou um aumento de atividade da β -glicosidase de *A. niger*, de 51-32% e apenas em 40% houve um pequeno efeito de inibição. Já a acetona causou um efeito de inibição muito maior sobre *A. niger* do que os observados para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, em 40% de acetona, *A. niger* manteve 39% de atividade, enquanto as leveduras aqui estudadas mantiveram mais de 80% nas concentrações de 30 e 50%. No estudo da β -glicosidase de *Myceliophthora thermophila*, Karnouri e colaboradores (2013) observaram que o etanol, o metanol e o isopropanol elevaram a atividade enzimática, estes resultados indicam que a presença de álcoois de cadeia curta pode levar a um efeito de inibição, como visto nesse trabalho, mas também exercer uma influência positiva na atividade hidrolítica de β -glicosidases.

Figura 9. Efeito de solventes orgânicos etanol (A), metanol (B), isopropanol (C) e acetona (D) nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% na atividade de β -glicosidase de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.



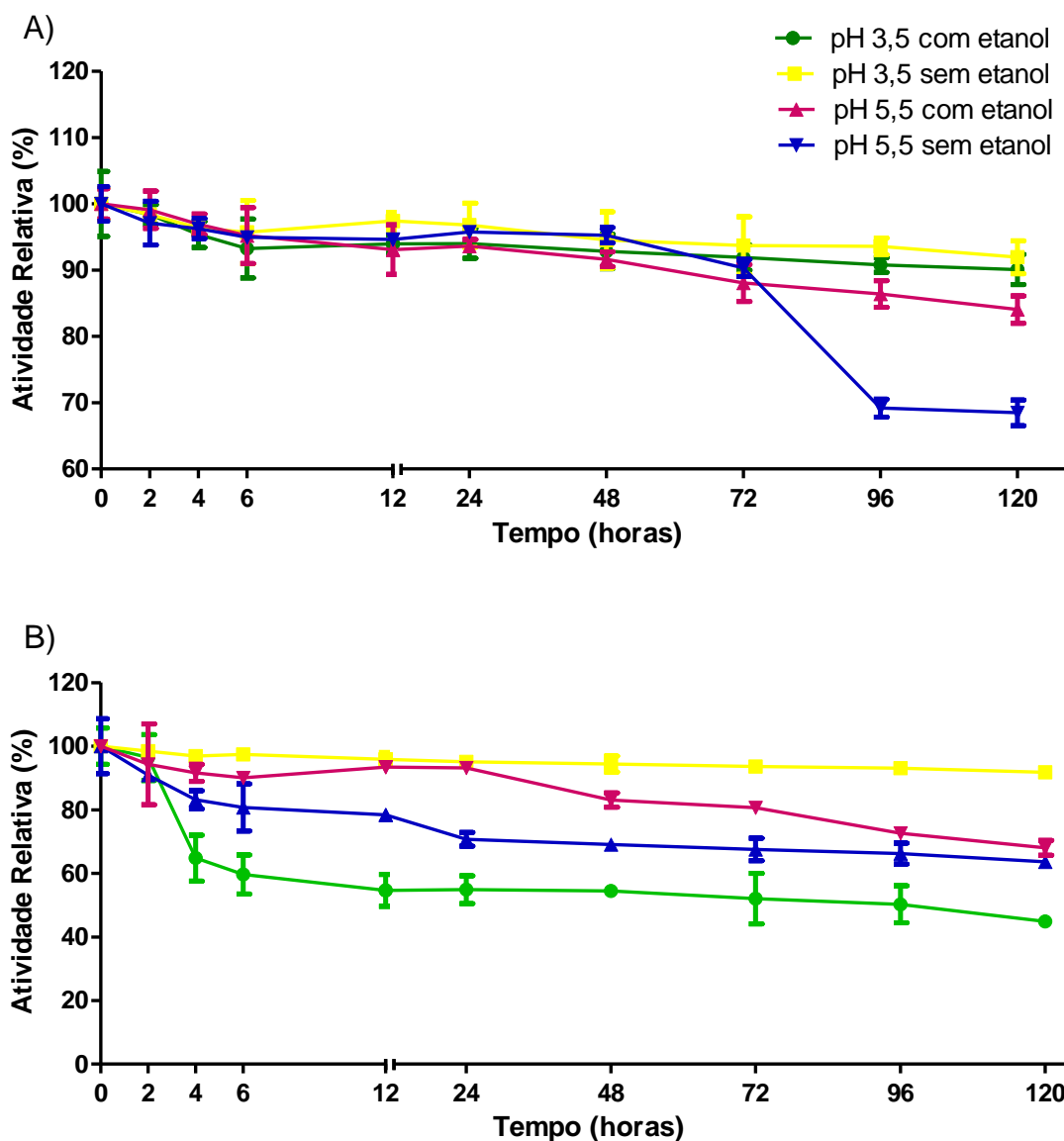
Fonte: autoria própria.

Após análise dos resultados obtidos desse teste rápido de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente em pH ótimo 5,5, foi realizado outro ensaio incubando-se as enzimas por 120 horas em 4 condições diferentes, ausência e presença de 15% de etanol, ambos em pH 5,5 e 3,5, o último correspondendo ao pH encontrado em vinhos (Figura 10). Esse experimento permitiu avaliar a longo prazo a eficiência hidrolítica da enzima sob condições de pH e etanol

semelhantes às dos vinhos e assim obter mais informações sobre sua possível aplicação na indústria vinícola.

Em 120 horas de incubação a 25°C em presença de tampão glicina pH 3,5 0,1 M e etanol, foi possível observar que a β -glicosidase de *P. ofunaensis* manteve mais de 85% de atividade enzimática, tendo atividade residual muito semelhante comparado a sua incubação nessas mesmas condições sem adição de etanol. Já a enzima de *T. multisoron*, entre todas as condições avaliadas, a de pH 3,5 e presença de etanol foi a mais afetada em sua atividade, mantendo pouco mais de 40% de atividade ao final das 120 horas de incubação, sendo que nestas mesmas condições sem adição de etanol manteve mais de 90% de atividade. Isso demonstra que a β -glicosidase de *P. ofunaensis* apresenta características de interesse para uma possível aplicação em indústria vinícola. Da Silva (2019) e colaboradores realizaram um ensaio semelhante ao desse trabalho e também obtiveram mais de 80% de atividade quando incubado a enzima de *P. guilliermondii* na presença de 10% de etanol a 25°C em pH 3,5 por 72 horas.

Figura 10. Efeito do etanol na concentração de 15% e tampão MES pH 3,5 e 5,5 ao longo de 120 horas nas atividades de β -glicosidasases de *P. ofunaensis* (A) e *T. multisoron* (B). Foi utilizado como substrato pNPG 4 mM diluído em tampão 0,1 M correspondente das condições de incubação. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

4.2.4 Efeito de açúcares sobre a atividade das β -glicosidasases

A avaliação do efeito de açúcares sobre a atividade enzimática é importante já que as enzimas podem ser inibidas na presença de acúmulo de seu substrato em um fenômeno conhecido como inibição por retroalimentação (NELSON; COX, 2018). Além disso, as

enzimas podem ser aplicadas em processo de sacarificação e fermentação conjunta, onde diferentes açúcares serão encontrados no meio reacional, podendo assim interagir e modular a atividade enzimática. Dessa forma, foi avaliado o efeito da presença de três açúcares, em diferentes concentrações, na atividade enzimática, sendo os resultados apresentados na Figura 11.

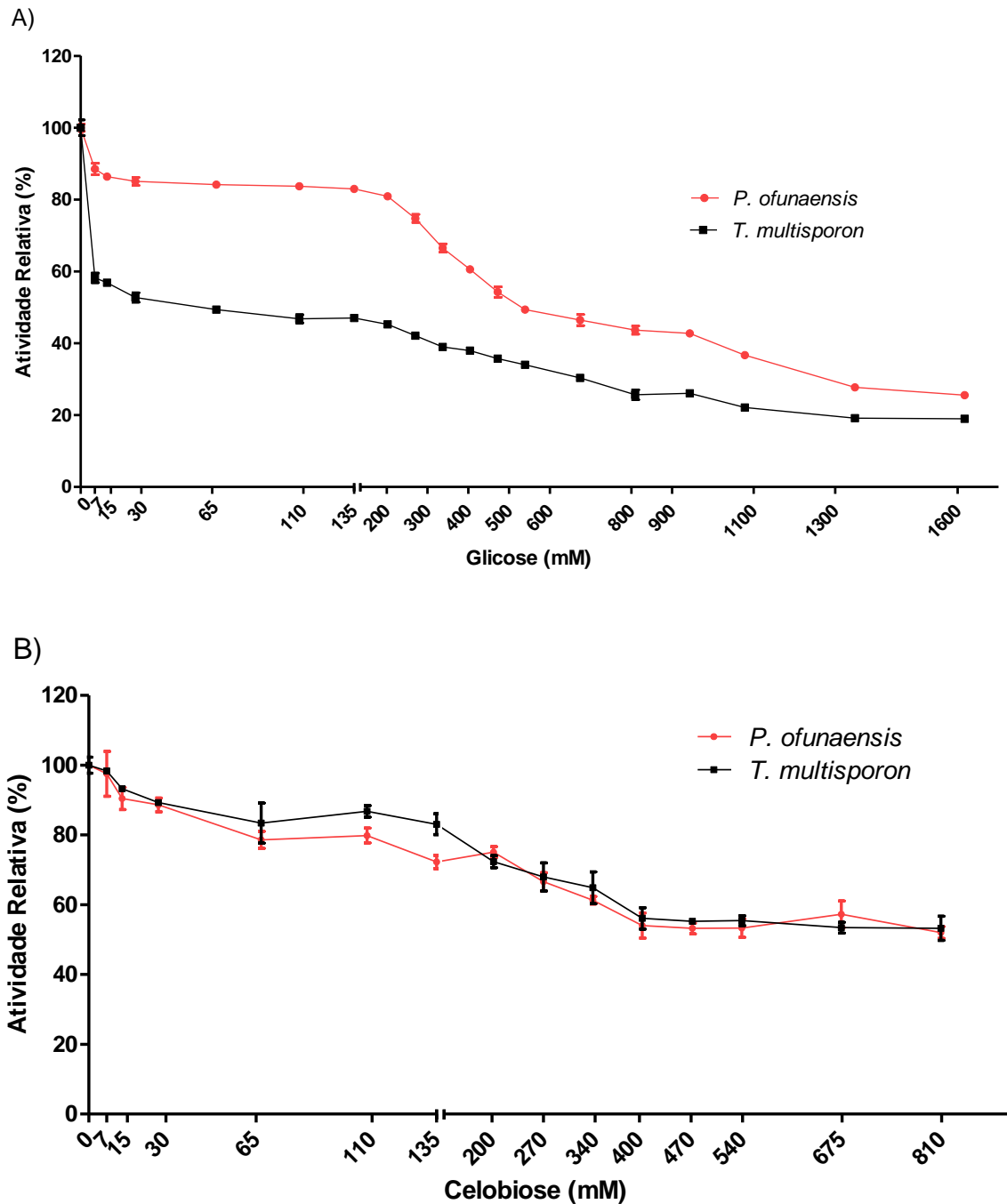
Comparando as enzimas das duas leveduras, a β -glicosidase produzida por *P. ofunaensis* perdeu apenas 12% de sua atividade inicial na primeira concentração avaliada (7 mM), enquanto a de *T. multisoron* foi a mais afetada pela presença de glicose, logo nessa mesma primeira concentração avaliada, sofreu uma inibição de atividade de cerca de 43%. Na maior concentração avaliada (1615 mM) ambas as espécies ainda mantiveram atividade, menos de 25% e 20% para β -glicosidases de *P. ofunaensis* e de *T. multisoron*, respectivamente. Entre os açúcares avaliados nesse trabalho a glicose foi o que teve maior impacto sobre a atividade β -glicosídica. Na concentração de açúcar presente em vinhos (10-20%, aqui representada pelas concentrações de 675-1080 mM), a enzima de *P. ofunaensis* manteve 46-37% de atividade e a de *T. multisoron*, 30-22% de atividade, dessa forma *P. ofunaensis* apresenta as características desejáveis de uma β -glicosidase para aplicação em indústria vinícola.

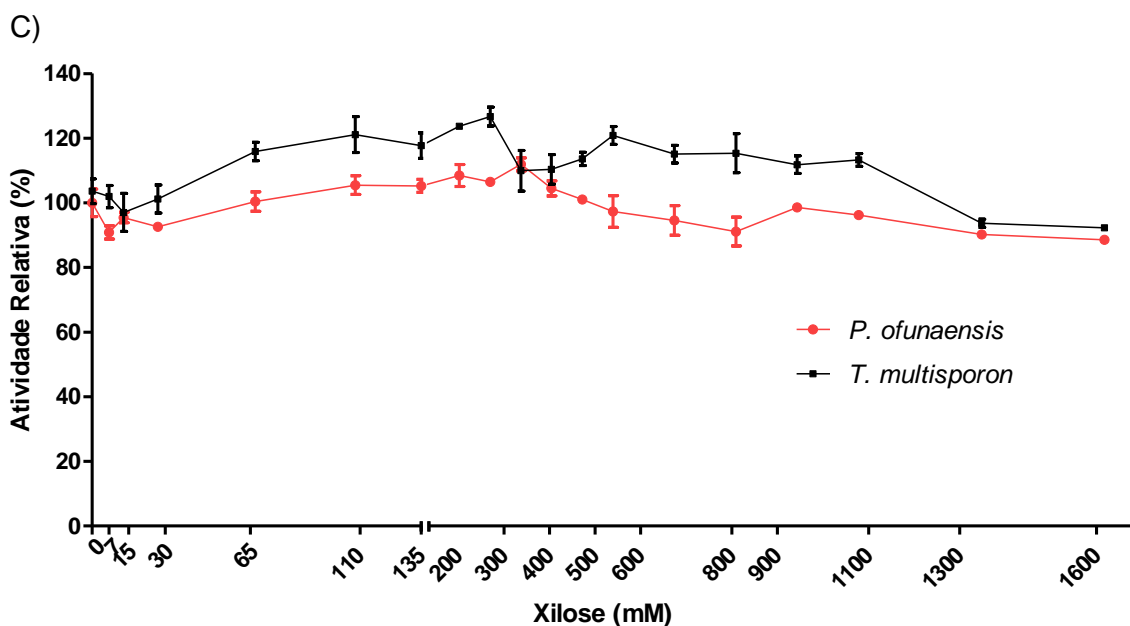
Diferente desse trabalho, Da Silva e colaboradores (2019) observaram um aumento de 13% da atividade β -glicosídica de *P. guilliermondii* na presença de 25-100 mM de glicose e em concentrações acima de 100 mM observaram uma diminuição na atividade da β -glucosidase, assim como observado para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Na concentração de 1000 mM de glicose, *P. guilliermondii* manteve 40% de atividade inicial, enquanto em 945 mM (concentração mais próxima a 1000mM avaliada nesse estudo) manteve-se 42% e 25% de atividade para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, respectivamente, ficando evidente a característica de tolerância a esse açúcar da enzima produzida por *P. ofunaensis*. Narasimha e colaboradores (2016) obtiveram inibição completa da β -glicosidase de *A. niger* em 5% de glicose (aproximadamente 280 mM), na concentração de 270 mM *P. ofuanensis* manteve 74% e *T. mustisoron* 41% de atividade. A β -glicosidase BGI de *A. oryzae* manteve menos de 10% de atividade na concentração de 1660 mM, enquanto as leveduras aqui estudadas apresentaram mais de 20% de atividade a 1615mM de glicose (RIOU et al., 1998). Entretanto existem na literatura trabalhos reportando a característica de grande tolerância a glicose de β -glicosidases, como por exemplo os resultados obtidos por Riou e colaboradores (1998), onde a β -glicosidase HGT-BG de *A. oryzae* manteve mais de 60% de atividade na presença de 1660 mM de glicose. Esses dados enfatizam a grande variedade de características que as diferentes β -glicosidases produzidas pelos microrganismos apresentam.

O perfil de inibição da atividade enzimática ocasionada pelo aumento progressivo da concentração de celobiose foi muito semelhante entre ambas as β -glicosidases. Até a maior concentração avaliada, de 810 mM, a atividade de ambas as espécies se manteve acima de 50%. O aumento da concentração de celobiose a partir de 400 até 810 mM não resultou em aumento significativo de inibição para ambas as espécies, o que demonstra a grande tolerância dessas enzimas a grandes concentrações desse açúcar. Zanoelo e colaboradores (2014) obtiveram apenas 24% de atividade da β -glicosidase de *Scytalidium thermophilum* na concentração de 50 mM de celobiose, evidenciando a grande tolerância das β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* a celobiose.

A xilose foi o açúcar que teve o menor efeito de inibição das atividades enzimáticas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Ao longo das concentrações testadas a atividade se manteve acima de 85%. Além disso, esse açúcar apresentou um efeito estimulante sobre a atividade enzimática das leveduras, principalmente para a β -glicosidase de *T. multisoron*, nas concentrações de 200 e 270mM, ocasionando um aumento de mais de 20% de atividade. Zanoelo e colaboradores (2014) também verificaram um aumento de atividade da β -glicosidase de *S. thermophilum* na presença de xilose, em 50 mM a atividade enzimática sofreu um aumento de 91%. Riou e colaboradores (1998) reportaram que a β -glicosidase HGT-BG de *A. oryzae* não sofreu inibição na presença de 15% de xilose (aproximadamente 1000 mM), o mesmo pode ser observado para as ambas as espécies deste trabalho, onde na concentração de 945 mM (14%) a atividade enzimática foi de cerca de 99% e 111% para *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, respectivamente. Karnaouri e colaboradores (2013) verificaram que a β -glicosidase de *M. thermophila* apresentou tolerância a elevadas concentrações de xilose, assim como as β -glicosidases deste trabalho.

Figura 11. Efeito dos açúcares glicose (A), celobiose (B) e xilose (C) sobre a atividade das β -glicosidasas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron*. Glicose e xilose foram avaliadas nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810, 945, 1080, 1350 e 1615 mM. E celobiose nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675 e 810 mM. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.





Fonte: autoria própria.

4.2.5 Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade das β -glicosidases

Os pré-tratamentos térmicos e químicos da biomassa lignocelulósica liberam uma série de compostos que podem atuar como potenciais inibidores da hidrólise enzimática e da subsequente fermentação. Os tipos de compostos tóxicos e suas concentrações nos hidrolisados lignocelulósicos dependem da matéria-prima e das condições operacionais do pré-tratamento. Uma das classes desses compostos liberados, que são potenciais inibidores de fermentação, são os compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Dessa forma, a influência de compostos fenólicos representativos daqueles que podem ser liberados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica foi avaliada pela medição da atividade β -glicosídica na presença de ácido sirínico, vanilina, ácido 4-hidróxibenzoico, ácido vanílico, ácido ferúlico, siringaldeído, ácido *p*-comárico, ácido gálico e ácido tânico, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.

Os resultados do presente estudo mostram uma ampla resistência das β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* a vários compostos fenólicos, mostrando que a enzima tem potencial aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos que liberam esses derivados fenólicos. O aumento médio ou decréscimo da atividade observado na presença dos compostos fenólicos não foi significativa, sendo as únicas exceções o ácido gálico e, principalmente, o

ácido tânico para ambas as espécies, sendo ainda a β -glicosidase de *P. ofunaensis* mais sensível para esse último.

O mesmo pode ser observado no trabalho de Ximenes e colaboradores (2011), onde os efeitos dos compostos fenólicos sobre as β -glicosidasas comerciais de *Trichoderma reesei* (Spezyme CP®) e *Aspergillus niger* (Novozyme 188®) mostraram uma inibição significativa pelo ácido tânico e ácido gálico em curto e longo tempo de incubação das enzimas e compostos fenólicos, enquanto outros fenólicos induziram diferentes graus de inibição, exercendo maior inibição quando as enzimas foram expostas por períodos mais longos. Bonfá e colaboradores (2018) realizaram um ensaio muito semelhante ao desse trabalho e os resultados obtidos para a β -glicosidase de *M. thermophila* corroboram os obtidos aqui. Entre os mesmos 9 compostos fenólicos avaliados, os que ocasionaram maior inibição da atividade enzimática foram o ácido tânico e ácido *p*-comárico, respectivamente, entretanto o ácido tânico em concentração menor que 1 M levou a total inibição da atividade de *M. thermophila*, sendo as enzimas desse trabalho mais tolerante a presença desse composto.

Tabela 4. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mM na atividade enzimática de β -glicosidase de *P. ofunaensis* e *T. multisporon*. Foi utilizado pNPG 4 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 5,5 como substrato. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.

Compostos fenólicos (10 mM)	Atividade relativa (%)	
	<i>Pichia ofunaensis</i>	<i>Trichosporon multisporon</i>
Ácido siríngico	96,6 \pm 1,9	104,0 \pm 1,6
Vanilina	96,1 \pm 2,9	99,8 \pm 1,8
Ácido 4- hidróxibenzóico	94,7 \pm 4,2	98,2 \pm 3,1
Ácido vanílico	89,0 \pm 2,0	97,2 \pm 2,2
Ácido ferúlico	92,9 \pm 2,5	98,6 \pm 1,4
Siringaldéido	90,9 \pm 2,3	90,4 \pm 2,7
Ácido P-comárico	92,7 \pm 2,6	88,1 \pm 1,4
Ácido gálico	77,7 \pm 1,0	77,4 \pm 1,7
Ácido tânico	48,2 \pm 0,8	63,1 \pm 2,5

Fonte: autoria própria.

4.3 Avaliação da hidrólise enzimática de diferentes substratos

Diferentes substratos foram avaliados quanto à suscetibilidade à hidrólise enzimática (Tabela 5). A solução enzimática de *P. ofunaensis* apresentou, baixa, atividade sobre os substratos β -1,3-Glucana, 4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo, D-(+)-Celobiose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose, D-(+)-Celotriose e celopentaose. Já a solução de *T. multisoron* mostrou pouca afinidade pelos substratos carboximetilcelulose, amido, β -1,3-Glucana, 4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo, D-(+)-Celobiose, maltose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose, D-(+)-Celotriose e celopentaose. A maior atividade hidrolítica da solução enzimática de ambas as espécies é observado sobre o substrato 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. Os substratos representados na Tabela 5 pelo número 0 não foram hidrolisados.

As soluções enzimáticas de 216 horas de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* obtidas do cultivo em estado sólido, utilizando como substrato o farelo de trigo, reagidas em temperatura e pH ótimos (pH 5,5 a 50 °C) produziram 0,40 U mL⁻¹ e 0,21 U mL⁻¹, respectivamente, de atividade β -glicosídica (Tabela 5). Essas produções foram superiores a obtida por Beitel e Knob (2013) que ao usarem farelo de trigo como fonte de carbono para o cultivo submerso de *Penicillium miczynskii* a produção foi de 0,02 U mL⁻¹ após 240 horas, ou seja, as leveduras deste trabalho tendo uma produtividade β -glicosídica superior à de fungos filamentosos. Gottschalk e colaboradores (2013) relacionaram uma produção de β -glicosidase de 0,0104 U / mL⁻¹ no cultivo de *Aspergillus awamori* em cultivo submerso por 7 dias usando farelo de trigo como fonte de carbono, entretanto ao utilizarem casca de abacaxi foram produzidos 0,97 U mL⁻¹. Porém a produção enzimática neste trabalho foi menor que a obtida por Leite e colaboradores (2007), também utilizaram farelo de trigo como substrato do cultivo em estado sólido e reportaram a obtenção de 1,3 U mL⁻¹ de atividade β -glicosídica de *A. pullulans* em 120 horas de cultivo, assim como Iembo e colaboradores (2002), que relataram uma produção máxima de 0,5 U mL⁻¹ por *Aureobasidium* sp. em 168 horas de cultivo em que o farelo de trigo foi usado como substrato em cultivo em estado sólido.

O farelo de trigo é um substrato hemicelulósico complexo, rico em proteínas (11%), lipídios (5%) e carboidratos (61%) (GWIRTZ; WILLYARD; MCFALL, 2014). Dentre os carboidratos, as arabinoxilanas representam o componente majoritário, constituindo até 26% desse substrato, sendo seguido do amido, correspondendo a até 24,9%, e da celulose, representando cerca de 11% (APPRICH et al, 2014).

O trigo sofre o processo de moagem para originar a farinha. Durante o processo de moagem do grão são obtidos a casca, o endosperma e o gérmen, considerados matérias-primas para a indústria (DE-OLIVEIRA NETO; SANTOS, 2017). No caso da farinha de trigo refinada, as cascas e o gérmen são retirados e adquirem outro fim. A casca, por fim, constitui o subproduto da moagem denominado farelo (AGEITEC, 2018). Provavelmente, esse processo de moagem promove uma quebra das fibras de celulose, de modo a criar extremidades redutoras e não redutoras, quais podem ser atacadas pelas enzimas beta-glicosidase de ambas as leveduras (PARTRIDGE; BEDFORD, 2001).

Tabela 5. Avaliação da atividade hidrolítica da solução enzimática obtida de cultivo em estado sólido das leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisporon* sobre os substratos avicel, carboximetilcelulose, celobiose, xilana *beechwood* e amido (substratos a 1% foram diluídos em tampão MES 0,1 M pH 5,5); 4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, 4-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo e 4-Nitrofenil acetato (substratos a 4 mM foram diluídos em tampão MES 0,1 M pH 5,5); caseína (caseína 1% em tampão MES pH 6,5 à 0,1 M); D-(+)-Celobiose, maltose, maltotriose, maltopentaose, maltohexaose e D-(+)-Celotriose (substrato a 1% diluído em tampão MES pH 5,5 0,1 M). Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.

Substratos	Unidade de enzima (U mL ⁻¹)	
	<i>Pichia ofunaensis</i>	<i>Trichosporon multisporon</i>
Carboximetilcelulose	0	0,29 \pm 0,0
Avicel	0	0
Xilana <i>beechwood</i>	0	0
Amido	0	0,34 \pm 0,03
β -1,3-Glucana	0,010 \pm 0,001	0,004 \pm 0,00
4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo	0,010 \pm 0,001	0,004 \pm 0,001
4-Nitrofenil acetato	0	0
4-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo	0	0
4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo	0,40 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01
D-(+)-Celobiose	0,009 \pm 0,001	0,003 \pm 0,001
Caseína	0	0
Maltose	0,002 \pm 0,0005	0,020 \pm 0,001
Maltotriose	0,006 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001
Maltopentaose	0,004 \pm 0,001	0,018 \pm 0,001
Maltohexaose	0,004 \pm 0,001	0,016 \pm 0,001
D-(+)-Celotriose	0,004 \pm 0,001	0,015 \pm 0,001
Celopentaose	0,013 \pm 0,001	0,015 \pm 0,001

Fonte: autoria própria.

Ainda, diferente de *P. ofuanensis*, *T. multisoron* apresentou atividades enzimáticas em outros substratos, tais como, carboximetilcelulose e amido. O extrato dessa levedura teve uma produtividade de 0,29 U mL⁻¹ na presença de carboximetilcelulose e de 0,34 U mL⁻¹ em amido. No caso da carboximetilcelulose, isso parece demonstrar que esse microrganismo pode secretar enzimas que atuam em polissacarídeos maiores oriundos das moléculas de celulose. Como já mencionado anteriormente, dentre os carboidratos que compõem o farelo do trigo, o amido representa o 2º principal componente.

O amido sintetizado pelas células vegetais é constituído por duas macromoléculas formadas por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas α -1,4: amilopectina e amilose. A amilose está associada à região amorfa dos grânulos de amido, essa macromolécula é constituída por longas cadeias de unidades de glicose com limitados pontos de ramificações nas posições α -1,6. e. Por outro lado, a amilopectina compreende a região cristalina dos grânulos de amido, conhecida por ser altamente ramificada nas posições α -1,6 e possuir cadeias curtas de unidades glicose. Sendo assim os grânulos de amido se apresentam como estruturas complexas de caráter semicristalino (CHEETHAM; TAO, 1998).

Quando aquecido na presença de água, o amido passa por uma fase de transição conhecida como gelatinização. A gelatinização ocorre quando a água se difunde para o grânulo, o qual sofre um inchaço considerável devido à hidratação da fase amorfa, causando perda de cristalinidade e desordem molecular, fazendo a transição do amido de uma forma semicristalina (relativamente indigestível) para uma forma amorfa que é facilmente digerível (JENKINS; CAMERON; DONALD, 1993; TESTER; DEBON, 2000; JIMÉNEZ et al., 2012). A interação molecular produzida após gelatinização e resfriamento é conhecida como retrogradação (HOOVER, 2000). Após a retrogradação, o amido apresenta menor entalpia em comparação ao amido nativo, porque sua estrutura cristalina foi enfraquecida (SASAKI et al., 2000).

Com base nisso, é possível que, ao ser autoclavado o farelo de trigo umedecido com a solução salina neste estudo, a fração mais superficial do amido deste subproduto tenha gelatinizado e depois retrogradado, de forma a se apresentar mais susceptível ao ataque enzimático, o que pode ter induzido a secreção de enzimas, tais como, amilase por *T. multisoron*. No entanto, ambas as leveduras cresceram sobre o mesmo substrato, o que sugere que provavelmente estas utilizem rotas metabólicas diferentes durante o crescimento.

Neste trabalho nós podemos ir ainda mais longe e sugerir que a levedura *T. multisoron* tem preferências por polímeros maiores, uma vez que, embora essa levedura apresentou atividade de amilase, o extrato enzimático desse microrganismo não apresentou atividade em sacarídeos de peso moleculares menores, tais como, maltose, maltotriose, maltopentaose e maltohexaose. O mesmo foi observado para o substrato carboximetilcelulose. Por outro lado, a levedura *P. ofunaensis*, parece ter preferência por substratos menores, tais como, 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, apesar deste ser um substrato sintético.

5. CONCLUSÕES

A β -glicosidase de *P. ofunaensis* apresentou pH ótimo em 5,5-6,5 e temperatura ótima de 50-60°C enquanto *T. multisoron* pH 5-6 e 55 °C. Ambas as enzimas apresentaram estabilidade numa faixa ampla de pH de 3,5-9,0, com a enzima de *P. ofunaensis* mantendo mais de 60% de atividade enzimática enquanto a de *T. multisoron* manteve mais de 80%. Ambas as enzimas apresentaram boa termoestabilidade quando incubadas por uma hora na faixa de temperatura de 30-50 °C, com a enzima de *P. ofunaensis* mantendo mais de 60% de atividade enzimática, enquanto a de *T. multisoron* manteve mais de 80% de atividade.

Dentre os íons metálicos avaliados, nenhum apresentou capacidade de modular positivamente a atividade das β -glicosidases de *P. ofunaensis* e de *T. multisoron*. Modulação negativa foi observado quando na presença de Fe^{3+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Hg^{2+} e principalmente Cu^{2+} , entretanto as atividades enzimáticas se mantiveram acima de 50% para ambas as espécies. O mesmo foi observado para as substâncias SDS, EDTA, DTT e β -mercaptoetanol, na presença destas as β -glicosidases das leveduras mantiveram atividade acima de 60%. Ambas as β -glicosidases foram tolerantes aos solventes orgânicos avaliados e a enzima de *P. ofunaensis* apresentou ainda aumento de atividade em baixas concentrações de etanol. Em incubação por 120 horas em 15% de etanol a pH 3,5, a β -glicosidase de *P. ofunaensis* manteve mais de 90% de atividade, apresentando potencial para aplicação na indústria vinícola.

Entre os açúcares avaliados, ambas as β -glicosidases foram tolerantes a presença de celobiose e, principalmente, xilose no meio, açúcar qual ocasionou aumento de atividade da enzima de *P. ofunaensis* em determinadas concentrações em que foi avaliado. A glicose teve maior poder de inibição, principalmente sobre β -glicosidase de *T. multisoron*. Dos nove compostos fenólicos avaliados apenas o ácido tânico e o ácido gálico mostraram potencial de inibição de atividade das β -glicosidases de ambas as espécies. Dentre os diferentes substratos

avaliados quanto à suscetibilidade à hidrólise enzimática, apenas a hidrólise de 4-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo foi considerável em *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, produzindo uma atividade β -glicosídica de 0,40 e 0,21 U mL⁻¹, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html>. Acesso em: 11 mai. 2019.
- ALMEIDA, J. M., LIMA, V. A., GILONI-LIMA, P. C., & KNOB, A. Passion fruit peel as novel substrate for enhanced β -glucosidases production by *Penicillium verrucosum*: Potential of the crude extract for biomass hydrolysis. **biomass and bioenergy**, v. 72, p. 216-226, 2015.
- APPRICH, S., TIRPANALAN, O., HELL, J., REISINGER, M., BÖHMDORFER, S., SIEBENHANDL-EHN, S., ... & KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 222-231, 2014.
- BAI, H. et al. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. **Excli Journal**, [s/l], v. 12, n. 8, p. 528-540, jun. 2013.
- BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., PALMERI, R., RESTUCCIA, C., & GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 58-66, 2004.
- BEITEL, S. M.; KNOB, A. *Penicillium miczynskii* β -glucosidase: a glucose-tolerant enzyme produced using pineapple peel as substrate. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 293-300, 2013.
- BEYNON, R. J.; EASTERBY, J. S. Buffer solutions. New York: New York: Oxford University, 1996.
- 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.
- BONFÁ, E. C., DE SOUZA MORETTI, M. M., GOMES, E., & BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M. 7.7. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 13, p. 311-318, 2018.
- CAO, P., WANG, L., WANG, Y., ZHOU, N., & CHEN, Y. Alkali-tolerant β -glucosidase produced by newly isolated *Aspergillus fumigatus* WL002 from rotten wood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 276-282, 2015.
- CHEETHAM, N W.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate polymers**, v. 36, n. 4, p. 277-284, 1998.
- DA SILVA, R. R., DA CONCEIÇÃO, P. J. P., DE MENEZES, C. L. A., DE OLIVEIRA NASCIMENTO, C. E., BERTELLI, M. M., JÚNIOR, A. P., ... & Gomes, E. Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1. 2. **Journal of biotechnology**, v. 294, p. 73-80, 2019.
- DE OVALLE, S., CAVELLO, I., BRENA, B. M., CAVALITTO, S., & GONZÁLEZ-POMBO, P. Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. **LWT**, v. 87, p. 515-522, 2018.
- DE-OLIVEIRA NETO, A. A.; SANTOS, C. M. R. A Cultura do Trigo. Brasília: Conab, 2017. 218p. Disponível também em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 13 fev. 2018. ISBN: 978-85-62223-09-9.

DIGNUM, M. J. W.; KERLER, J.; VERPOORTE, R. β -Glucosidase and peroxidase stability in crude enzyme extracts from green beans of *Vanilla planifolia* Andrews. **PHYTOCHEMICAL ANALYSIS**, v. 12, n. 3, p. 174-179, 2001.

DIKSHIT, R.; TALLAPRAGADA, P. Partial Purification and Characterization of β -glucosidase from *Monascus sanguineus*. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 58, n. 2, p. 185-191, abr. 2015.

GE Healthcare Life Sciences. **Pesquisa de Sistema de bancada QSM-03SP QuixStand**. Disponível em: <<https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/18116807.pdf>> Acesso em: 11 mai. 2019.

GONZÁLEZ-POMBO, P. et al. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 385-389, jan. 2011.

GOTTSCHALK, L. M. F., PAREDES, R. D. S., TEIXEIRA, R. S. S., SILVA, A. S. A. D., & BON, E. P. D. S. Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B. 361 U2/1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 569-576, 2013.

GUNATA, Z., BITTEUR, S., BRILLOUET, J. M., BAYONOVE, C., & CORDONNIER, R. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 139-149, 1988.

GWIRTZ, J. A.; WILLYARD, M. R.; MCFALL, K. L. W. Wheat: more than just a plant. In: MÜHLENCEMIE. **Future of flour: a compendium of flour improvement**. 2014. Disponível em: <<http://muehlenchemie.de/english/know-how/future-of-flour.html>>. Acesso em: 13 fev. 2018

HAYASHI, S., SAKO, S., YOKOI, H., TAKASAKI, Y., & IMADA, K. Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium* sp ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 160-163, 1999.

HERNANDEZ-ORTE, P., CERSOSIMO, M., LOSCOS, N., CACHO, J., GARCIA-MORUNO, E., & FERREIRA, V. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 773-781, 2009.

HOGG, PHILIP J. Disulfide bonds as switches for protein function. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 4, p. 210-214, 2003.

HOOVER, R. Acid-treated starches. **Food reviews international**, v. 16, n. 3, p. 369-392, 2000.

IEMBO, T., DA SILVA, R., PAGNOCCA, F. C., & GOMES, E. Production, Characterization, and Properties of β -Glucosidase and β -Xylosidase from a Strain of *Aureobasidium* sp. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 549-552, 2002.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40 (9), p. 2931 - 2944, 2005.

JENKINS, P. J.; CAMERON, R. E.; DONALD, A. M. A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. **Starch-Stärke**, v. 45, n. 12, p. 417-420, 1993.

JIMÉNEZ, A., FABRA, M. J., TALENS, P., & CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2058-2076, 2012.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 86, n. 3, p. 207-213, 2003.

KARNAOURI, A., TOPAKAS, E., PASCHOS, T., TAOUKI, I., & CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **PeerJ**, v. 1, p. e46, 2013.

KAUR, J. et al. Purification and characterization of β -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Electronic Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 1-12, 15 abr. 2007.

KEERTI. et al. Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable β -Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice. **Isrn Biochemistry**, [s.l.], v. 2014, n. 3, p.1-8, 20 fev. 2014.

KOCABIYIK, S.; ÖZDEMİR, I. Purification and characterization of an intracellular chymotrypsin-like serine protease from *Thermoplasma volcanium*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 126-134, 2006.

KUDO, K., WATANABE, A., UJIIE, S., SHINTANI, T., & GOMI, K. Purification and enzymatic characterization of secretory glycoside hydrolase family 3 (GH3) aryl β -glucosidases screened from *Aspergillus oryzae* genome. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 120, n. 6, p. 614-623, 2015.

KUO, H. P., WANG, R., HUANG, C. Y., LAI, J. T., LO, Y. C., & HUANG, S. T. Characterization of an extracellular β -glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production. **journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 1, p. 163-171, 2018.

LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma-a review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97-129, 2000.

LEITE, R. S. R., BOCCHINI, D. A., MARTINS, E. D. S., SILVA, D., GOMES, E., & DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 1-12, 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**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

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

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, [s.l.], v. 3, n. 9, p. 267-298, 2017.

MADADI, M.; TU, Y.; ABBAS, A. Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. **Electronic Journal of Biology**, v. 13, n. April, p. 135-143, 2017.

MALLEK-FAKHFAKH, H.; BELGHITH, H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. **Carbohydrate research**, v. 419, p. 41-50, 2016.

MATEO, J. J.; DI STEFANO, R. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. **Food Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 583-591, 1997.

MCCMAHON, H., ZOECKLEIN, B. W., FUGELSANG, K., & JASINSKI, Y. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 198-203, 1999.

MÉNDEZ-LÍTER, J. A. et al. A novel, highly efficient β -glucosidase with a cellulose-binding domain: characterization and properties of native and recombinant proteins. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 1-14, nov. 2017.

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

NARASIMHA, G., SRIDEVI, A., RAMANJANEYULU, G., & RAJASEKHAR REDDY, B. Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*. **International journal of food properties**, v. 19, n. 3, p. 652-661, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 7. edição. **Editora Sarvier: São Paulo**, 2018.

OLAJUYIGBE, F. M.; NLEKEREM, C. M.; OGUNYEW, O. A. Production and characterization of highly thermostable β -glucosidase during the biodegradation of methyl cellulose by *Fusarium oxysporum*. **Biochemistry research international**, v. 2016, 2016.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PARTRIDGE, Gary G.; BEDFORD, Michael Richard (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. CABI Publishing, 2001.

PEMBERTON, M. S.; BROWN, R. D.; EMERT, G. H. The role of β -glucosidase in the bioconversion of cellulose to ethanol. **Can. J. Chem. Eng.**, v. 58, n. 8, p. 723-729, 1980.

PEREIRA, J. C. et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 118, n. 4, p. 928-939, fev. 2015.

QADER, S. et al. Effect of Metal Ions, Solvents and Surfactants on the Activity of Protease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. **Journal Of Basic & Applied Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 491-495, set. 2017.

RIOU, C., SALMON, J. M., VALLIER, M. J., GÜNATA, Z., & BARRE, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 10, p. 3607-3614, 1998.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays Biochemistry**, Preston, Inglaterra, v. 59, n. 3, p. 1-41, 2015.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

SASAKI, M., FANG, Z., FUKUSHIMA, Y., ADSCHIRI, T., & ARAI, K. Dissolution and hydrolysis of cellulose in subcritical and supercritical water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 8, p. 2883-2890, 2000.

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W. **Química Inorgânica**. 6ª Edição. Porto Alegre: Editora Bookman, 2017. 900p.

SO, J.H., KIM, W.C., SHIN, J.H., YU, C.B., RHEE, I.K. Purification and Characterization of a β -Glucosidase Capable of Hydrolyzing Soybean Isoflavone Glycosides from *Pichia guilliermondii* K123-1. **Food Sci. Biotechnol.** 19, 1373-1379, 2010.

SOUZA, O.; SOUZA, M. T. C.; SANTOS, I. E. Tratamento químico de resíduos agrícolas com solução de uréia na alimentação de ruminantes. Revista Capril Virtual, p. 1-5, 2007. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/15933928-Tratamento-quimico-de-residuos-agricolas-com-solucao-de-ureia-na-alimentacao-de-ruminantes.html>>. Acesso: 12 mai 2019.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

TANG, Z., LIU, S., JING, H., SUN, R., LIU, M., CHEN, H., ... & HAN, X. Cloning and expression of *A. oryzae* β -glucosidase in *Pichia pastoris*. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 11, p. 7567-7573, 2014.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 23, p. 7673-7682, 2010.

TERRONE, C. C. **α -Arabinofuranosidase de *Aspergillus hortai* CRM 1919: produção, purificação, caracterização e aplicação na hidrólise de hemiceluloses de resíduos agroindustriais.** Tese (doutorado em Microbiologia aplicada). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro. 124 p. 2017.

TESTER, R. F.; DEBON, S. J. J. Annealing of starch—a review. **International journal of biological macromolecules**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2000.

WINTERHALTER, P.; SKOUROUMOUNIS, G. K. Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. In: **Biotechnology of aroma compounds**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 73-105. 1997.

XIA, W., XU, X., QIAN, L., SHI, P., BAI, Y., LUO, H., ... & YAO, B. Engineering a highly active thermophilic β -glucosidase to enhance its pH stability and saccharification performance. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 147, 2016.

XIMENES, E., KIM, Y., MOSIER, N., DIEN, B., & LADISCH, M. Deactivation of cellulases by pHenols. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 54-60, 2011.

ZANG, X. et al. The structural and functional contributions of β -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-13, fev. 2018.

ZANOELO, F. F., POLIZELI, M. D. L. T. D. M., TERENCEZI, H. F., & JORGE, J. A. β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 137-143, 2004.

ZHAO, L., ZHOU, T., LI, X., FAN, S., & YOU, L. Expression and characterization of GH3 β -Glucosidase from *Aspergillus niger* NL-1 with high specific activity, glucose inhibition and solvent tolerance. **Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 356-363, 2013.

CAPÍTULO IV

Investigação da produção e caracterização de arabinofuranosidases produzidas por *Aureobasidium pullulans* e *A. leucospermi* em cultivo em estado sólido contendo farelo de trigo

RESUMO

As α -L-arabinofuranosidases são enzimas acessórias do complexo hemicelulolítico, especificamente do xilanolítico, e atuam na hidrólise das ramificações arabinosil de moléculas de xilana, sobre as ligações α -1,2-, α -1,3-, e α -1,5-. Essas enzimas são aplicadas em diversos ramos industriais, como na produção de fármacos, alimentos, ração animal, têxteis, biocombustíveis, detergentes, entre outros. Os microrganismos são, hoje, a fonte primária da produção de enzimas industriais. A preferência é conferida aos microrganismos por diversas razões, como o rápido crescimento, facilidade no manuseio quando comparado à animais e plantas, fácil manipulação com auxílio da engenharia genética, etc. Além disso, diversas celulases e hemicelulases usadas na indústria são produzidas eficientemente a partir de fermentações microbianas utilizando como fonte de carbono resíduos agroindústrias, matéria prima rica em nutrientes, renovável e de baixo-custo, que além de baratear o processo faz com que seu acúmulo no ambiente se diminua. O objetivo desse trabalho foi, assim, investigar a produção e a consequente caracterização de α -L-arabinofuranosidases produzida pelas leveduras *Aureobasidium pullulans* e *A. leucospermi*, utilizando farelo de trigo como substrato em cultivo em estado sólido. As α -L-arabinofuranosidases produzidas por *A. pullulans* e *A. leucospermi* apresentaram pH ótimo na faixa de 5-6,5 e 5,0-7,5 e temperatura ótima de 60 °C, respectivamente. A atividade da enzima de *A. pullulans* e *A. leucospermi* foi de 0,11 U mL⁻¹ e 0,12 U mL⁻¹, respectivamente. Ambas as espécies apresentaram estabilidade numa ampla faixa de pH de 5-10 e termoestabilidade quando incubadas na faixa de temperatura de 30-60°C. *A. pullulans* mostrou grande tolerância ao etanol na presença de 50% desse solvente, diferente de *A. leucospermi*. Essas leveduras apresentaram alta tolerância a glicose e arabinose.

Palavras-chave: caracterização bioquímica, *Aureobasidium pullulans*, *Aureobasidium leucospermi*, α -L-arabinofuranosidase, resíduo agroindustrial.

1. INTRODUÇÃO

O trigo é um dos cereais mais consumidos no mundo, sendo o Brasil um dos seus grandes produtores (DE-OLIVEIRA NETO; SANTOS, 2017; FAO, 2019). Como consequência do seu processamento para originar produtos alimentares, como a farinha de trigo, grandes quantidades de resíduos agroindustriais são produzidas. A casca originada desse processamento é responsável pela maior parte dos derivados de trigo gerada, sendo conhecido como o farelo de trigo (DE-OLIVEIRA NETO; SANTOS, 2017; AGEITEC, 2018).

O farelo de trigo é um substrato hemicelulósico complexo, sendo rico em nutrientes e açúcares, o que favorece o crescimento de microrganismos e a consequente produção de enzimas por estes, quando é utilizado como fonte alternativa de carbono no processo fermentativo (GWIRTZ; WILLYARD; MCFALL, 2014; LEITE et al., 2008). A utilização desse recurso permite com que o processo de produção de enzimas seja barateado e também colabora com a redução de problemas ambientais ocasionado pelo acúmulo desses resíduos no ambiente (TERRONE, 2017; LIN et al., 2018; PERIYASAMY et al., 2018).

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas nos seres vivos e que ao serem extraídas das células, podem ser utilizadas em uma ampla variedade de processos comercialmente importantes (ROBINSON, 2015; LIU; KOKARE, 2017). Apresentam ainda a vantagem de atuarem direta e exclusivamente sobre o seu substrato, diferentes de reagentes químicos, não sendo consumidas ao longo da reação (NELSON; COX, 2018). Isso justifica o investimento crescente para descoberta e produção de novas enzimas microbianas com aplicações industriais.

As α -L-arabinofuranosidases são enzimas do complexo desramificante de hemicelulose, fazendo parte do conjunto de enzimas acessórias destas (PÉREZ; EYZAGUIRRE, 2016; TERRONE, 2017). As arabinofuranosidases atuam catalisando a hidrólise das ramificações arabinosil de moléculas de xilana, o principal tipo de hemicelulose existente na natureza, mais especificamente sobre as ligações α -1,2-, α -1,3-, e α -1,5- (KAJI, 1984; SAHA, 2000; CAZY, 2019).

Essas enzimas são aplicadas em diversos ramos industriais, tanto para aumentar a qualidade dos produtos gerados, quanto para aumentar a eficiência da produção, como na produção de fármacos, alimentos, ração animal, têxteis, biocombustíveis, detergentes, entre outros (SAHA, 2000; NUMAN; BHOSLE, 2006; TERRONE, 2017).

Levando em consideração o contexto acima, esse trabalho buscou investigar a produção e caracterização bioquímica de α -L-arabinofuranosidases produzidas pelas leveduras *A. pullulans* e *A. leucospermi* utilizando como substrato o farelo de trigo em cultivo em estado sólido.

2. OBJETIVO

- Investigar a produção e caracterização de α -L-arabinofuranosidases produzidas pelas leveduras *Aureobasidium pullulans* e *A. leucospermi* em cultivo em estado sólido contendo farelo de trigo.

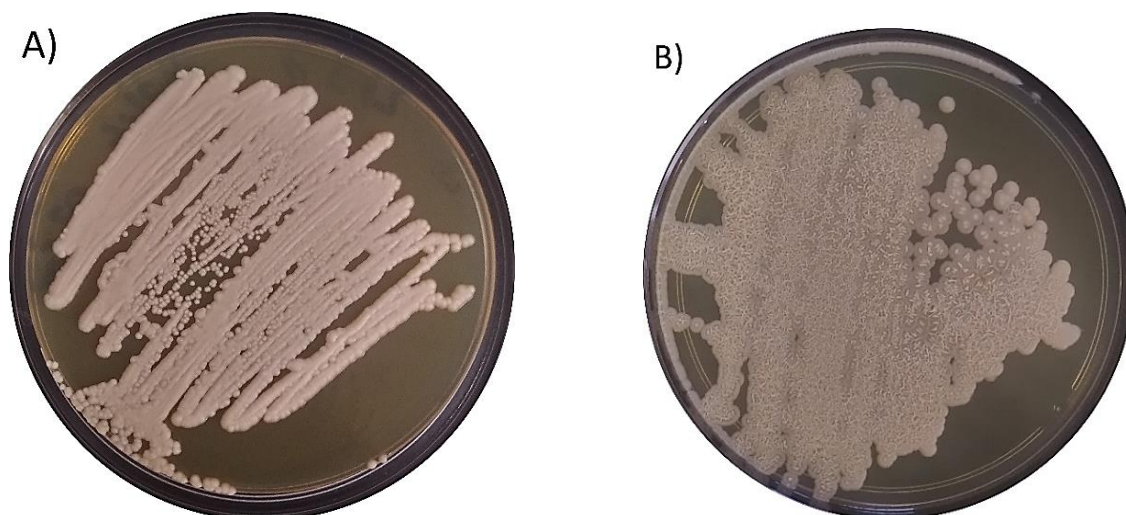
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Os microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas as cepas das leveduras *Aureobasidium pullulans* 3.1 e *Aureobasidium leucospermi* 86 (Figura 1), isoladas a partir de flores e armazenadas na coleção de trabalho do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE/Unesp de S. J. Rio Preto.

A conservação das culturas puras foi feita por estocagem a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pérolas de vidro, lavadas com ácido nítrico e esterilizadas, foram adicionadas à suspensão de leveduras, que foram mantidas *overnight* em glicerol (15%) no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, então, transferidas para freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 1. Cultivo meio YEPD da levedura *A. pullulans* (A) e *A. leucospermi* (B).



Fonte: autoria própria.

3.2. Cultivo em estado sólido e obtenção de solução enzimática

Células de *A. pullulans* e *A. leucospermi* foram retiradas de estoque em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e crescidas em Erlenmeyers inclinado de 125 mL contendo 20 mL de meio YEPD, por 72 horas a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, o inóculo foi obtido através da suave raspagem da superfície da cultura em Erlenmeyer de cada uma das espécies, utilizando 25 mL da solução salina estéril. Foram preparados 8 Erlenmeyers inclinado de 125 mL contendo 20 mL de meio para cada espécie de levedura. A suspensão de células e solução salina de cada um desses Erlenmeyers, foram unidos em um único Erlenmeyer de 250 mL para cada espécie, segundo metodologia adaptada de Leite et al. (2007) e assim usado como inóculo.

Para o cultivo em estado sólido, foram utilizados 5 gramas farelo de trigo como substrato, em embalagens de polipropileno (15x25 cm) (Figura 2), hidratados com 6 mL de solução salina estéril. A esse substrato foram adicionados 5 mL de inóculo de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. Anteriormente, o farelo de trigo foi submetido a lavagens com água destilada e seco em estufa com circulação de ar a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 2. Saco de cultivo contendo farelo de trigo e solução salina.



Fonte: autoria própria.

As embalagens foram incubadas a 29 °C por 288 horas (12 dias), sendo removida uma delas a cada 24 horas. A cada embalagem removida contendo o material fermentado, foram adicionados 50 mL de água destilada, o qual foi homogeneizado em agitador por 1 hora, a 160 rpm, em temperatura de 25 ± 2 °C, filtrado em tecido musseline e centrifugado a 10.000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática para verificar a atividade de hidrólise do substrato 4-Nitrofenol α -L- arabinofuranosídeo (pNPA).

3.3 Determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade de α -L- arabinofuranosidase e identificação do período de produção máxima da enzima, foi realizado um ensaio utilizando 10 μ L de solução enzimática de cada um dos 12 dias de cultivo de cada levedura, , 40 μ L de tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 50 μ L de pNPA 2 mM diluído em tampão acetato 0,1 M pH 5,0. A reação foi conduzida por 20 minutos a 40 °C, paralisada pela adição de 100 μ L de carbonato de sódio 2 M e lida em espectrofotômetro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. A solução do dia com maior atividade enzimática foi considerado como 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

Após a caracterização, foi realizado um ensaio com as soluções enzimáticas do 12° e 5° dia de cultivo de *A. pullulans* e *A. leucospermi*, respectivamente, definidos como os dias de máxima produção de α -L-arabinofuranosidase, em temperatura e pH ótimos das α -L-arabinofuranosidasas dessas leveduras para avaliar a atividade enzimática. Para isso foi utilizado 10 μ L de solução enzimática devidamente diluída em tampão MES 0,1 M pH 6,0, 40 μ L de tampão MES 0,1 M pH 6,0 e 50 μ L de pNPA 2 mM diluído nesse mesmo tampão. A reação foi conduzida a 60 °C por 20 minutos, paralisada pela adição de 100 μ L de carbonato de sódio 2 M e lida em espectofotometro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O tempo de reação ótimo para a determinação da atividade enzimática foi estabelecido através da avaliação de relação linear entre a quantidade de produto liberada e o tempo de reação dentro das condições deste ensaio. Foram avaliados três tempos para cada espécie (10, 20 e 30 minutos). A quantificação da atividade enzimática foi feita confrontando-se a leitura com curva de calibração (8 pontos) tendo como padrão o 4-nitrofenol na concentração de 0 a 0,08 μ M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de 4-nitrofenol por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

3.4. Caracterização bioquímica funcional das α -L-arabinofuranosidasas

A caracterização bioquímica funcional das α -L-arabinofuranosidasas de *A. pullulans* e *A. leucospermi* foi feita utilizando as soluções enzimáticas obtidas de 288 e 120 horas de

cultivo, respectivamente.

3.4.1. Influência do pH e temperatura na atividade e estabilidade das α -L-arabinofuranosidases

O efeito de pH na atividade e estabilidade enzimática foi avaliado usando os reagentes de tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M com a abrangência de pH de 3,0 a 10,0, com variações de 0,5 unidades. Para ensaio de pH ótimo foram utilizados 10 μ L das soluções enzimáticas, de cada levedura, devidamente diluídas em água, 40 μ L de cada tampão pH 3 a 10, individualmente, e 50 μ L de substrato pNPA 2 mM diluído em água. A reação foi conduzida a 40 °C por 20 minutos para ambas as leveduras. O tempo de reação ótimo para a determinação da atividade enzimática foi estabelecido através da avaliação de relação linear entre a quantidade de produto liberada e o tempo de reação dentro das condições deste ensaio. Foram avaliados três tempos para cada espécie (10, 20 e 30 minutos). A reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de carbonato de sódio 2 M e a leitura foi realizada em 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O pH no qual foi obtido maior atividade enzimática, foi considerado como 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

O efeito da temperatura na atividade das enzimas foi avaliado com abrangência de 30 a 80 °C, com variações de 5 °C. O ensaio foi realizado conforme descrito acima para ambas as leveduras, porém o tampão utilizado no preparo da diluição das soluções enzimáticas, na reação e diluição de pNPA foi MES 0,1 M pH 6,0, conforme análise de resultado obtido do ensaio de pH ótimo. A leitura foi realizada a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. A temperatura na qual foi obtida maior atividade enzimática foi considerada 100%, sendo o resultado expresso em atividade relativa.

A estabilidade frente ao pH das α -L-arabinofuranosidases de *A. pullulans* e *A. leucospermi* foi avaliada com abrangência de pH de 3,0 a 10,0, com variações de 0,5 unidades. Para isso foram incubados juntamente 25 μ L das soluções enzimáticas de cada levedura e 75 μ L de cada tampão. O ensaio foi realizado em dois lotes para cada espécie, um incubado por 24 horas a 4 °C e outro incubado por 24 horas a 25 °C. Para reação foram utilizados 10 μ L das soluções incubadas, adicionado 40 μ L do tampão MES 0,1 M pH 6,0 e 50 μ L de pNPA 2 mM dissolvido nesse mesmo tampão. As reações foram conduzidas por 20 minutos a 60 °C. A reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de carbonato de sódio 2M e a leitura foi realizada em 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

Os ensaios de termoestabilidade foram realizados com abrangência de temperatura de 30 a 80 °C, com intervalo de 5 °C. O ensaio consistiu da incubação de 10 μ L das soluções

enzimáticas, de cada levedura, adequadamente diluídas em tampão MES 0,1 M pH 6,0 nessas diferentes temperaturas por 15, 30 e 60 minutos. A reação foi realizada da mesma maneira descrita acima para o pH ótimo, porém a reação foi conduzida a 60°C, conforme análise de resultado obtido do ensaio de temperatura ótima, e foi paralisada pela adição de 100 µL de carbonato de sódio 2 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

3.4.2. Efeito de solvente orgânico sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidases

A influência do solvente orgânico etanol sobre a atividade enzimática das α -L-arabinofuranosidases de *A. pullulans* e *A. leucospermi* foi avaliado nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% (v/v).

O efeito desse solvente orgânico foi avaliado por meio da incubação das soluções enzimáticas devidamente diluídas em tampão MES 0,1 M pH 6,0 na presença de etanol de modo que a concentração final do mesmo fosse as descritas acima e mantidos por 5 minutos em temperatura ambiente. As reações enzimáticas foram conduzidas na sequência e as misturas reacionais consistiram de 15 µL dessas soluções enzimáticas, 15 µL de tampão MES 0,1 M pH 6,0 e 70 µL de pNPA 2 mM diluído neste mesmo tampão, sendo conduzidas a 60 °C por 20 minutos para ambas as espécies. O tempo de reação ótimo para a determinação da atividade enzimática foi estabelecido através da avaliação de relação linear entre a quantidade de produto liberada e o tempo de reação dentro das condições deste ensaio, sendo avaliados três tempos para cada espécie (10, 20 e 30 minutos). As reações foram interrompidas pela adição de 80 µL de carbonato 2 M e lidas em espectrofotômetro a 410 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

3.4.3. Efeito de açúcares sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidases

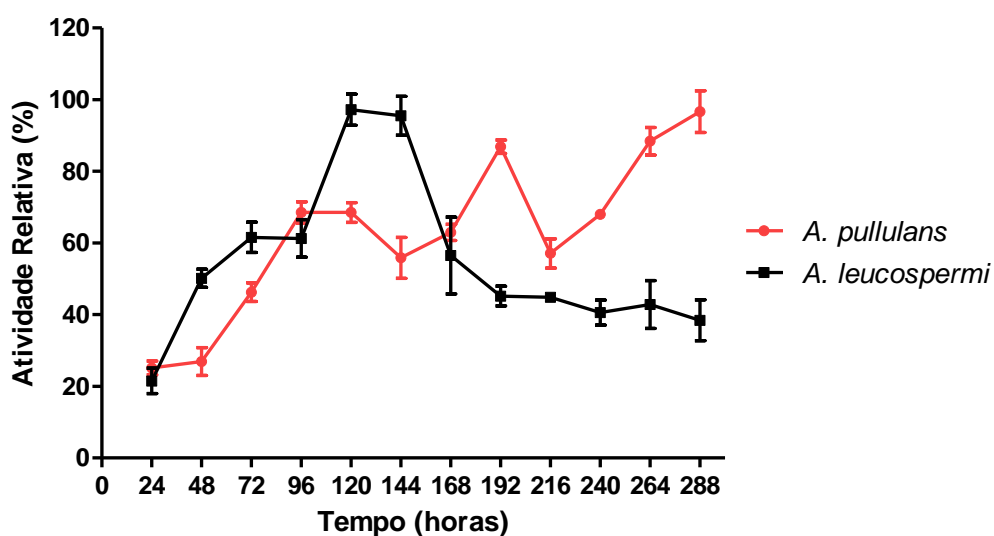
A influência dos açúcares glicose e arabinose sobre a atividade enzimática das α -L-arabinofuranosidases de *A. pullulans* e *A. leucospermi* foram avaliadas. A glicose foi avaliada nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810, 945, 1080, 1350 e 1615 mM e a arabinose nas concentrações de 3, 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675 e 810 mM. Os ensaios foram realizados e conduzidos como descritos no item 3.4.2. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual, considerando-se a atividade da enzima sem tratamento como 100%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção das α -L-arabinofuranosidas

As soluções enzimáticas contendo α -L-arabinofuranosidas obtidas do cultivo de *A. pullulans* e *A. leucospermi* ao longo dos 12 dias foram analisadas por meio da hidrólise do substrato 4-Nitrofenil α -L-arabinofuranosídeo. Os perfis das atividades de α -L-arabinofuranosidase encontradas ao longo dos 12 dias para cada espécie mostrou que as maiores atividade foram obtidas em 288 e 120-144 horas de cultivo para enzima de *A. pullulans* e de *A. leucospermi*, respectivamente (Figura 3).

Figura 3. Gráficos indicando a relação entre atividade relativa (%) e tempo (horas) para produção da enzima α -L-arabinofuranosidase em bioprocesso em estado sólido das leveduras *A. pullulans* e *A. leucospermi* durante 288 horas, utilizando pNPA 2 mM diluído em tampão acetato 0,1 M pH 5,0. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

As soluções enzimáticas obtidas de 288 e 120 horas de *A. pullulans* e *A. leucospermi* do cultivo em estado sólido, utilizando como substrato o farelo de trigo, reagidas em temperatura e pH ótimos (pH 6 a 60 °C) produziram 0,11 U mL⁻¹ e 0,12 U mL⁻¹, respectivamente, de atividade α -L-arabinofuranosídica (Tabela 1). Essas atividades foram muito superiores as obtidas para *P. ofunaensis* e *T. multisoron* neste trabalho, 0,010 e 0,004 U mL⁻¹, respectivamente, também

utilizando como substrato o farelo de trigo em cultivo em estado sólido após 216 horas. As produções foram similares a obtida por Temer (2012) no cultivo submerso de *Penicillium janczewskii* utilizando farelo de trigo, onde a atividade obtida foi de 0,1 U mL⁻¹ após 168 horas, entretanto, *P. janczewskii* obteve 0,21 e 0,18 U mL⁻¹ de atividade ao ser utilizado bagaço de malte e bagaço de laranja, respectivamente, como fonte de carbono em cultivo submerso. Terrone (2017) estudando a produção de α -L-arabinofuranosidase de *Aspergillus hortai* obteve 0,0034 U mL⁻¹ em 168 horas de cultivo submerso suplementado com farelo de trigo, produção muito inferior a obtida por *A. pullulans* e *A. leucospermi* neste trabalho. Entretanto Guerfali e colaboradores (2010) observaram que o farelo de trigo, entre fontes de carbono puras e outros resíduos agroindustriais avaliados, foi a fonte de carbono no cultivo submerso que resultou na maior produção de arabinofuranosidase por *Talaromyces thermophilus*, 0,25 U mL⁻¹, em 120 horas de cultivo, produtividade superior as encontradas aqui.

Tabela 1. Atividades de α -L-arabinofuranosidase obtidas das reações da solução enzimática de *A. pullulans* e *A. leucospermi* utilizando como substrato pNPA 2 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 6,0 a 60 °C (condições ótimas de pH e temperatura). Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.

Espécie	Unidade de enzima (U mL ⁻¹)
<i>A. pullulans</i>	0,11 \pm 0,01
<i>A. leucospermi</i>	0,12 \pm 0,01

Fonte: autoria própria

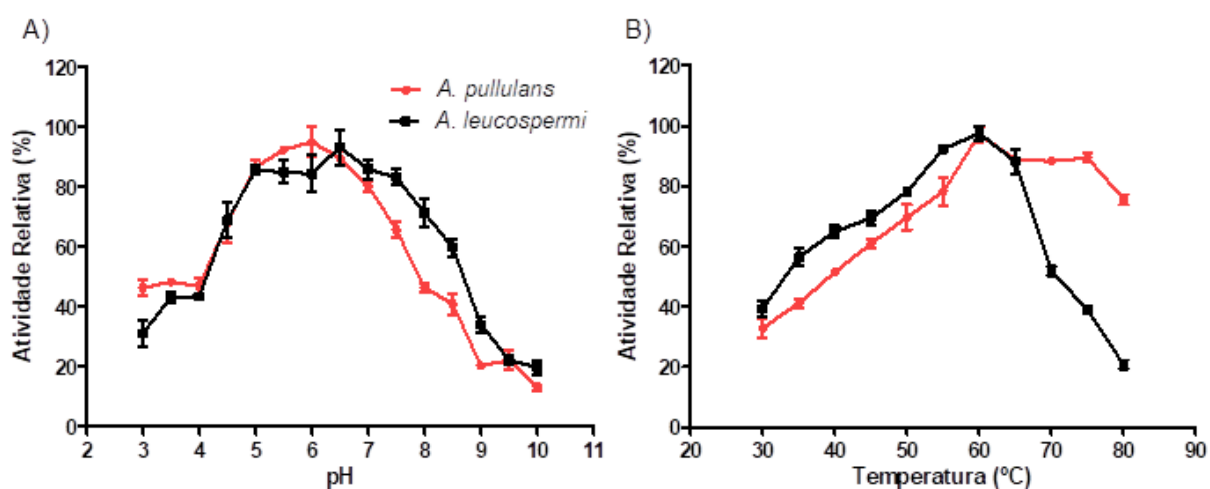
4.2 Caracterização físico-química

4.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das α -L-arabinofuranosidasas

A Figura 4 mostra o efeito do pH e temperatura nas atividades de α -L-arabinofuranosidase das soluções enzimáticas de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. A α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* apresentou maior atividade na faixa de pH 5-6,5 e a 60 °C enquanto a enzima de *A. leucospermi* apresentou maior atividade na faixa de pH 5,0-7,5 e a 60 °C. Ambas as leveduras apresentam maior atividade em uma ampla faixa de pH. Acima de 65 °C, a enzima de *A. leucospermi* apresentou rápida perda de atividade, mantendo apenas cerca de 18% a 80 °C,

diferente da enzima de *A. pullulans* que manteve cerca de 74% de atividade a essa mesma temperatura. A partir do pH 8, ambas as enzimas perderam atividade progressivamente. Em pH 10, a α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* manteve apenas 10% de atividade enquanto que a de *A. leucospermi* 17%, tendo maior tolerância a esse pH. O pH ótimo encontrado no presente trabalho foi diferente dos observados por Uesaka e colaboradores (1978) para α -L-arabinofuranosidase da levedura *Rhodotorula flava*, a qual apresentou máxima atividade em pH 2,0. No entanto os resultados obtidos nesse trabalho corroboraram com os obtidos para a arabinofuranosidase da levedura *Pichia capsulata*, que apresentou pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 50 °C (YANAI; SATO, 2000). Diferentes características são encontradas na literatura para α -L-arabinofuranosidases de *A. pullulans*, De Wet e colaboradores (2008) obtiveram máxima atividade nos pH 3,5-4,0 e temperatura de 55 °C, já Saha e Bosthast (1998) obtiveram máxima atividade no pH 4,5 e 75 °C, além de mais de 70% de atividade a 80 °C. O fungo *Chaetomium* sp. apresentou temperatura ótima de 65-70 °C e maior atividade nos pH 4,5-7,0 e assim como para *A. pullulans* e *A. leucospermi* aqui observado, a atividade da enzima diminuiu quando o pH aumentou acima de 8,0 ou diminuiu abaixo de 4,0 (YAN et al., 2012).

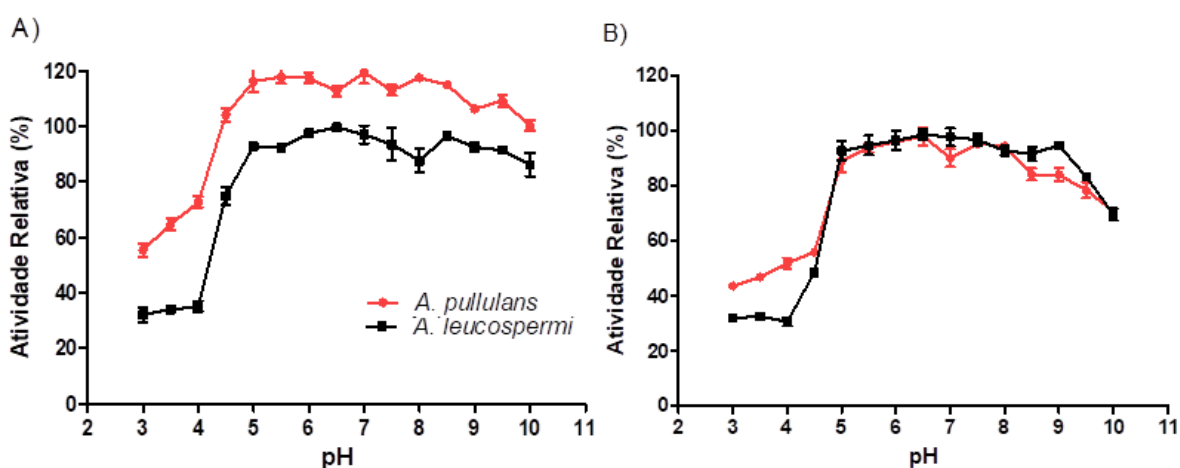
Figura 4. Efeitos do pH (A) e temperatura (B) sobre atividade de α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. Foi utilizado como substrato pNPA 2 mM diluído em tampões *Good Buffer* (BEYNON; EASTERBY, 1996) a 0,1 M, para ensaio de pH, e em tampão MES 0,1 M PH 6,0, para ensaio de temperatura. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

A estabilidade das enzimas incubadas em diferentes valores de pH foi investigada após serem mantidas por 24 horas nas temperaturas de 4 e 25 °C (Figura 5). Ambas as espécies mantiveram acima de 80% e 70% de atividade quando incubadas nos pH 5-10 por 24 horas a 4 e 25 °C, respectivamente. *A. pullulans* apresentou ainda um aumento de atividade quando incubada a 4 °C nessa faixa de pH, variando de 19 a 11%. Ambas as espécies obtiveram, de maneira geral, uma menor estabilidade quando incubadas nos pH 3-4 tanto a 4 °C quanto a 25 °C, a enzima de *A. leucospermi* manteve apenas cerca de 30% de atividade. Quando incubada a 25 °C, *A. pullulans* não apresentou o mesmo aumento de atividade observado de quando incubada a 4 °C. Ao comparar os resultados aqui obtidos com os de *P. capsulata*, observa-se que manteve mais de 80% de sua atividade numa menor faixa de pH de 6-8 a 25 °C (YANAI; SATO, 2000), é possível perceber a ampla estabilidade de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. A α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* estudada por Saha e Bosthat (1998) manteve mais de 80% de atividade no pH 3,5-6,5, diferente das atividades aqui observadas nos pHs 3-4,5. Já a α -L-arabinofuranosidase oriunda de *A. pullulans* expressa heterologicamente em *P. pastoris*, manteve mais de 80% de sua atividade na faixa de pH 4,0-9,0, sendo esse resultado semelhante ao obtido para ambas as leveduras aqui estudadas (OHTA; FUJII, HIGASHIDA, 2013). Os resultados aqui obtidos para ambas as enzimas em ambas as temperaturas avaliadas, corroboram, ainda, os observados por Yan e colaboradores (2012) para a α -L-arabinofuranosidase do fungo *Chaetomium* sp. que manteve mais de 80% de sua atividade nos pH 5,0-10.

Figura 5. Efeito do pH em incubação por 24 horas a 4 °C (A) e a 25 °C (B), nas atividades de α -L-arabinofuranosidasas produzidas *A. pullulans* e *A. leucospermi*. A reação foi feita utilizando pNPA a 4 mM. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.

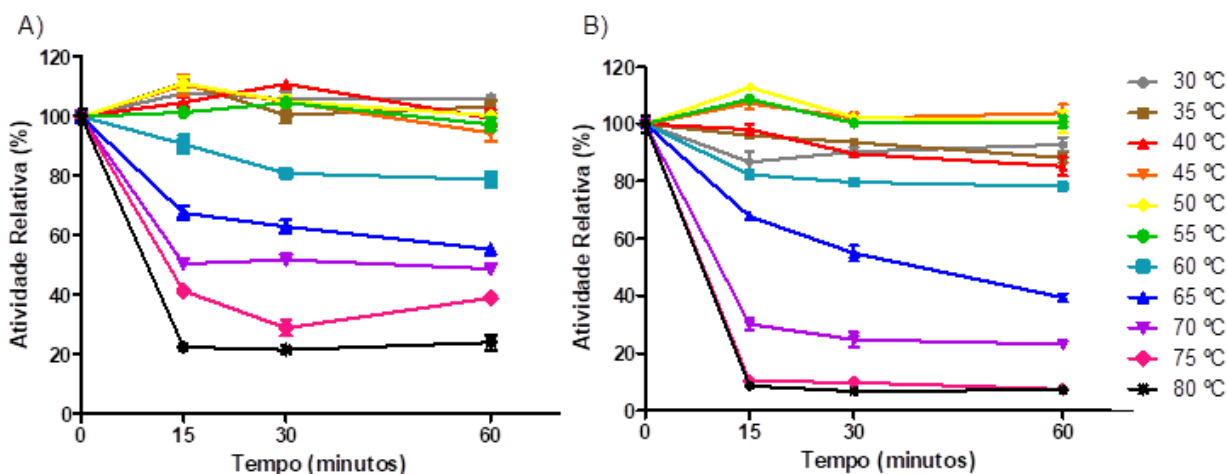


Fonte: autoria própria.

As soluções enzimáticas contendo α -L-arabinofuranosidasas de *A. pullulans* e *A. leucospermi* foram incubadas nas temperaturas de 30-80 °C por 15, 30 e 60 minutos (Figura 6). As enzimas de *A. pullulans* e *A. leucospermi* mantiveram mais de 75% de atividade ao serem incubadas na faixa de temperatura de 30-60 °C, por uma hora. A 80 °C por uma hora, manteve-se cerca de 24 e 7% de atividade as α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* e de *A. leucospermi*, respectivamente, sendo assim a α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* mais termoestável quando comparada com *A. leucospermi*. A enzima de *P. capsulata* (YANAI; SATO, 2000) manteve menos de 20% de sua atividade quando incubada a 60 °C por 30 minutos, mostrando menor termoestabilidade quando comparada com as α -L-arabinofuranosidase das leveduras desse estudo. *A. pullulans* estudada por Saha e colaboradores (1998) manteve mais de 80% de sua atividade durante meia hora na faixa de temperatura de 30-80 °C, uma termoestabilidade maior que as observadas aqui. A α -L-arabinofuranosidase de *Chaetomium* sp. apresentou mais de 80% de atividade nas temperaturas 40-55 °C por 30 minutos, porém menos de 30% a 70 graus, diferente da de *A. pullulans* e *A. leucospermi* deste trabalho que apresentaram atividade superior a 30% nestas mesmas condições, que apesar de serem microrganismos mesófilos demonstraram possuir enzima com maior termoestabilidade que a proveniente de um fungo termófilo (YAN et al., 2012).

Os vinhos apresentam pHs que variam de 2,5-3,8 (RIOU et al, 1998), dessa forma as arabinofuranosidas de *A. pullulans* apresentando característica de maior interesse para essa aplicação, já que apresentou atividade de 43-51% nos pHs 3-4 a 25 °C, respectivamente, enquanto *A. leucospermi* manteve cerca de 32% nessas mesmas condições.

Figura 6. Efeito da temperatura sobre as atividades de α -L-arabinofuranosidas de *A. pullulans* (A) e de *A. leucospermi* (B) quando incubadas por 15, 30 e 60 minutos nas temperaturas de 30-80 °C, com intervalo de 5 °C, na ausência de substrato. Para reação foi utilizado pNPA 2 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 6,0 como substrato. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.



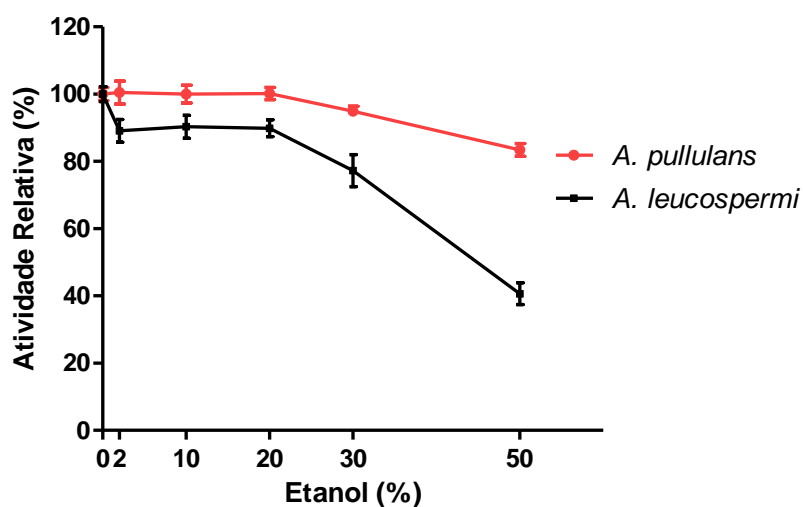
Fonte: autoria própria.

4.2.2 Efeito de solvente orgânico sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidas

O efeito da presença de etanol foi avaliado nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% (v/v), de acordo com o exposto na Figura 7. Avaliar a tolerância das α -L-arabinofuranosidas a presença de etanol é importante já que essas enzimas são utilizadas na produção de vinhos. Boa parte da expressão sensorial do bouquet do vinho se deve à presença de compostos terpenóides e as α -L-arabinofuranosidas estão envolvidas na hidrólise de monoterpil glicosídeos da uva durante a fermentação de vinho, melhorando o aroma, sendo, portanto, enzimas de extrema importância para indústria vinícola (GUNATA et al., 1990). Além do etanol, testes de inibição de glicose são necessários para verificar a aplicabilidade da enzima na produção de vinho.

Ao avaliar a curva do efeito do etanol sobre a atividade de β -glicosidase é possível observar que em todas as concentrações de incubação, a enzima de *A. pullulans* foi a mais tolerante a presença de etanol, apresentando uma boa estabilidade ao manter mais de 90% de atividade nas concentrações de 2-30% e mais de 80% de atividade na concentração de 50% de etanol. A enzima de *A. leucospermi* manteve cerca de 40% de atividade na concentração de 50%. Os vinhos apresentam de maneira geral uma porcentagem alcoólica entre 10 e 15% (RIOU et al., 1998), dessa maneira essas leveduras apresentariam características de interesse por parte da indústria vinícola. Apesar de ambas as leveduras apresentarem tolerância a presença de etanol, esse solvente orgânico não teve um efeito estimulante sobre a atividade enzimática, como relatado por Yanai e Sato (2000) para α -L-arabinofuranosidase de *P. capsulata*, onde em 15% de etanol houve aumento de 15% da atividade inicial. Por outro lado, *Colletotrichum graminicola* apresentou menos de 60% de atividade na presença de 5% de etanol (DE CARVALHO et al., 2018), tendo menor caráter de tolerância ao etanol do que as leveduras aqui estudadas. Apesar de a enzima α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* ter sido estudada (SAHA; BOTHAST, 1998; OHTA et al., 2013), não foi encontrado nenhum registro na literatura sobre testes de inibição de etanol sobre ela.

Figura 7. Efeito do etanol nas concentrações de 2, 10, 20, 30 e 50% na atividade de α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. Foi utilizado como substrato pNPA 2 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 6,0. Os valores são expressos como média (n = 3) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

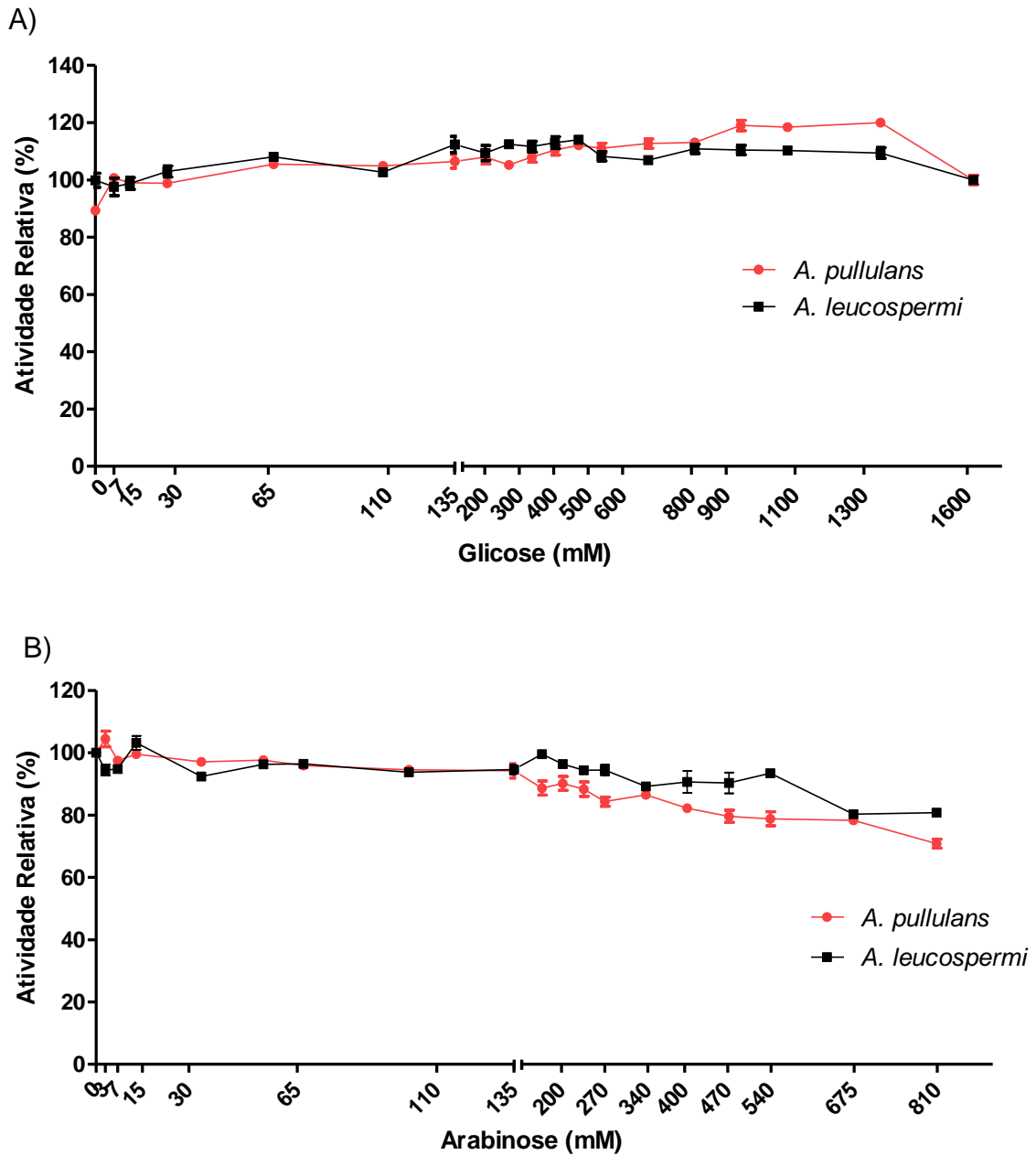
4.2.3 Efeito de açúcares sobre a atividade das α -L-arabinofuranosidasas

Foi avaliado o efeito da presença dos açúcares glicose e arabinose, em diferentes concentrações, na atividade enzimática, sendo os resultados apresentados na Figura 8. Ambas as espécies mantiveram mais de 90% de atividade nas diferentes concentrações de glicose em que foram avaliadas. É possível ainda observar que sobre ambas as espécies a glicose teve um efeito estimulante sobre a atividade α -L-arabinofuranosídica, esse efeito ainda foi maior em *A. pullulans* e foi observado nas concentrações de açúcar presente no vinho, 10-20% (675-1080 mM). *P. capsulata* sofreu uma maior inibição de atividade em presença de glicose quando comparada a este trabalho, o aumento progressivo das concentrações de glicose avaliadas levou ao aumento de inibição, em presença de 500 mM de glicose, a atividade enzimática foi reduzida em mais de 35% (YANAI; SATO, 2000). De Wet e colaboradores (2007) também observaram que a glicose, em 50 mM, não inibiu a atividade da enzima de *A. pullulans*, assim como observado por Saha e Bothast (1998) a não inibição da enzima de *A. pullulans* pela incubação em glicose a 110 mM. O fungo *C. graminicola*, assim como *A. pullulans* e *A. leucospermi*, não sofreu inibição de atividade na presença de 50 mM de glicose (DE CARVALHO et al., 2018).

Analisando em conjunto os resultados obtidos de estabilidade em pH 2,5-3,8, tolerância a 10-15% de etanol e 10-20% de glicose, a arabinofuranosidase de *A. pullulans* apresenta características de interesse para aplicação em indústria vinícola. Já a enzima de *A. leucospermi* não seria uma α -L-arabinofuranosidase ideal para essa aplicação por apresentar baixa em estabilidade nos pHs 3-4 quando comparado com *A. pullulans*.

Já para a arabinose, ambas as espécies mantiveram mais de 70% de atividade das suas enzimas nas diferentes concentrações em que foram avaliadas. Diferente da glicose, a arabinose não apresentou efeito estimulante sobre a atividade enzimática das leveduras. Comparando as espécies, *A. pullulans* apresentou maior inibição por arabinose, apresentando 70% de atividade na maior concentração avaliada, enquanto *A. leucospermi* 80%. De Wet e colaboradores (2007) verificaram que entre todos os açúcares avaliados na concentração de 50 mM, L-arabinose foi o único açúcar a inibir a atividade enzimática de *A. pullulans*, inibindo 56% da atividade da enzima, assim como para Saha e Bothast (1998) que obtiveram a arabinose como único açúcar que afetou negativamente a atividade enzimática de *A. pullulans*, mantendo 21,6% de atividade na concentração de 1200 mM desse açúcar. Já a α -L-arabinofuranosidase de *C. graminicola* se apresentou insensível a arabinose, não apresentando redução de atividade na presença de 50 mM desse açúcar (DE CARVALHO et al., 2018).

Figura 8. Efeito dos açúcares glicose (A) e arabinose (B) sobre a atividade de α -L-arabinofuranosidase de *A. pullulans* e *A. leucospermi*. Glicose foi avaliada nas concentrações de 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810, 945, 1080, 1350 e 1615 mM. E arabinose nas concentrações de 3, 7, 15, 30, 65, 110, 135, 200, 270, 340, 400, 470, 540, 675, 810 mM. Foi utilizado como substrato pNPA 2 mM diluído em tampão MES 0,1 M pH 6,0. Os valores são expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão.



Fonte: autoria própria.

5. CONCLUSÕES

As α -L-arabinofuranosidases de *A. pullulans* e *A. leucospermi* apresentaram pH ótimo na faixa de 5-6,5 e 5,0-7,5 e temperatura ótima de 60 °C, respectivamente. A atividade da enzima de *A. pullulans* foi de 0,11 U mL⁻¹ e *A. leucospermi* de 0,12 U mL⁻¹. Ambas as espécies apresentaram estabilidade numa ampla faixa de pH de 5-10, mantendo mais de 70% de atividade em ambas as temperaturas avaliadas. Foi notável a grande termoestabilidade dessas leveduras, mantendo mais de 80% de atividade quando incubadas por uma hora na faixa de temperatura de 30-60°C e ainda mantendo atividade quando incubadas por 1 hora a 80 °C. Ainda, essas leveduras apresentaram alta tolerância a glicose, assim como para arabinose.

A α -L-arabinofuanosidase de *A. pullulans* mostrou grande tolerância ao etanol, não tendo sua atividade afetada na presença de 2-20% desse solvente, tendo sido ainda mais tolerante quando incubada a 25 °C na faixa de pH 3-4, quando comparada a mesma enzima de *A. leucospermi*, apresentando assim potencial para aplicação na indústria vinícola.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC (Agência Embrapa de Informação Tecnológica). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html>. Acesso em: 11 mai. 2019.
- BEYNON, R. J.; EASTERBY, J. S. Buffer solutions. New York: New York: Oxford University, 1996.
- CAZY (Carbohydrate-Active enZymes Database). Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 11 mai. 2019.
- DE CARVALHO, D. R., CARLI, S., MELEIRO, L. P., ROSA, J. C., DE OLIVEIRA, A. H. C., JORGE, J. A., & FURRIEL, R. P. M. A halotolerant bifunctional β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase from *Colletotrichum graminicola*: Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 741-750, 2018.
- DE WET, B. J., MATTHEW, M. K., STORBECK, K. H., VAN ZYL, W. H., & PRIOR, B. A. Characterization of a family 54 α -L-arabinofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 975-983, 2008.
- DE-OLIVEIRA NETO, A. A.; SANTOS, C. M. R. A Cultura do Trigo. Brasília: Conab, 2017. 218p. Disponível também em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 13 fev. 2018. ISBN: 978-85-62223-09-9.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Pesquisa de produção global de trigo**, 2017. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 11 mai. 2019.
- GUERFALI, M., CHAABOUNI, M., GARGOURI, A., & BELGHITH, H. Improvement of α -L-arabinofuranosidase production by *Talaromyces thermophilus* and agro-industrial residues saccharification. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1361-1372, 2010.
- GUNATA, Z., BRILLOUET, J. M., VOIRIN, S., BAUMES, R., & CORDONNIER, R. Purification and some properties of an α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosylglucosides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 38, n. 3, p. 772-776, 1990.
- GWIRTZ, J. A.; WILLYARD, M. R.; MCFALL, K. L. W. Wheat: more than just a plant. In: MÜHLENCHMIE. **Future of flour: a compendium of flour improvement**. 2014. Disponível em: <<http://muehlenchemie.de/english/know-how/future-of-flour.html>>. Acesso em: 13 fev. 2018.
- KAJI, A. α -L-Arabinofuranosidase. **Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry**, v. 42, p. 383-94, 1984.
- LEITE, R. S. R., BOCCHINI, D. A., MARTINS, E. D. S., SILVA, D., GOMES, E., & DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, n. 1-12, 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**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.
- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, [s.l.], v. 3, n. 9, p. 267-298, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, 7. edição. **Editora Sarvier: São Paulo**, 2018.

NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B. α -L-Arabinofuranosidasas: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006.

OHTA, K.; FUJII, S.; HIGASHIDA, C. Characterization of a glycoside hydrolase family-51 α -l-arabinofuranosidase gene from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and its encoded product. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 3, p. 287-292, 2013.

PÉREZ, R.; EYZAGUIRRE, J. *Aspergillus fumigatus* produces two arabinofuranosidasas from glycosyl hydrolase family 62: comparative properties of the recombinant enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n.1, p. 143–154, 2016.

PERIYASAMY, K. et al. Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to Fermentable Sugars by Immobilized Magnetic Cellulolytic Enzyme Cocktails. **Langmuir**, [s/l], v. 34, n. 22, p. 6546–6555, mai. 2018.

RIOU, C., SALMON, J. M., VALLIER, M. J., GÜNATA, Z., & BARRE, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 10, p. 3607-3614, 1998.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays Biochemistry**, Preston, Inglaterra, v. 59, n. 3, p. 1-41, 2015.

SAHA, B. C. α -L-Arabinofuranosidasas: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 5, p. 403-423, 2000.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Purification and characterization of a novel thermostable α -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 1, p. 216-220, 1998.

TEMER, B. **Produção e caracterização de α -L-arabinofuranosidase de *Penicillium janckzweskii***. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 55 p. 2011.

TERRONE, C. C. **α -Arabinofuranosidase de *Aspergillus hortai* CRM 1919: produção, purificação, caracterização e aplicação na hidrólise de hemiceluloses de resíduos agroindustriais**. Tese (doutorado em Microbiologia aplicada). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro. 124 p. 2017.

UESAKA, E. I. J. I., SATO, M. A. S. A. Y. U. K. I., RAIJU, M. I. E. K. O., & KAJI, A. K. I. R. A. α -L-arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1073-1077, 1978.

YAN, Q., TANG, L., YANG, S., ZHOU, P., ZHANG, S., & JIANG, Z. Purification and characterization of a novel thermostable α -l-arabinofuranosidase (α -l-AFase) from *Chaetomium* sp. **Process biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 472-478, 2012.

YANAI, T.; SATO, M. Purification and characterization of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1181-1188, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, investigamos a capacidade de assimilação de xilose e produção das enzimas β -glicosidases e α -L-arabinofuranosidases por leveduras isoladas do ambiente. As leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron* se mostraram assimiladoras de xilose em meio YEPX com diferentes pH. Ambas as leveduras apresentaram melhor assimilação da pentose em pH inicial 4,5, o que pode ser indicativo de que o melhor transporte desse açúcar seja dependente de um simportador de próton. Em meio YEPX pH inicial 4,5, *P. ofunanesis* apresentou consumo mais rápido de xilose nas temperaturas de incubação de 32 e 36° C, enquanto *T. multisoron* apresentou o máximo de consumo do açúcar a 28 °C. Esses resultados permitiram, assim, inferir que o pH e a temperatura são fatores que podem afetar a expressão de transportadores de membrana de xilose, permitindo com que essa seja transportada com menor ou maior eficiência. Dessa forma, estes resultados servirão de base para estudos posteriores envolvendo proteoma e transcriptoma para investigar os transportadores de membrana de xilose nestas leveduras.

Nenhuma das alíquotas de cultivo, das diferentes fermentações em YEPX avaliadas, formou halo de inibição, indicando assim não ter sido secretado pelas leveduras *P. ofunaensis* e *T. multisoron*, no meio, moléculas que tivessem ação bactericida e/ou bacteriostática. Dessa forma, conclui-se que não houve a produção de peptídeos bioativos de caráter antimicrobiano por estas leveduras.

As β -glicosidases de *P. ofunaensis* e *T. multisoron* apresentaram uma produtividade de 0,40 e 0,21 U mL⁻¹ e maior atividade em pH 5,5-6,5 e 50-60 °C e pH 5-6 e 55 °C, respectivamente. Ambas as enzimas exibiram estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura de 30-50 °C, tolerância frente a diferentes íons metálicos, solventes orgânicos e compostos fenólicos nas diferentes concentrações avaliadas. Ambas as β -glicosidases foram tolerantes a presença de celobiose e, principalmente, xilose no meio. Além disso a enzima de *P. ofunaensis* apresentou características de interesse para possível aplicação em indústria vinícola, potencial qual deve ser investigado mais a fundo em estudos posteriores.

As α -L-arabinofuranosidases de *A. pullulans* e *A. leucospermi* apresentaram uma produtividade de 0,11 e 0,12 U mL⁻¹ e maior atividade em pH 5,5-6,5 e 60-70 °C e pH 5,0-7,5 e 60 °C, respectivamente. Ambas as enzimas exibiram estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura de 30-60°C. Em presença de 50% de etanol, a enzima produzida por *A. pullulans* apresentou alta tolerância, mantendo mais de 80% de sua atividade, enquanto que a enzima de *A. leucospermi* manteve 40% de sua atividade. Em incubação com glicose e arabinose, as

enzimas exibiram alta atividade enzimática (acima de 80%) em diferentes concentrações destes açúcares. A enzima de *A. pullulans* apresentou características de interesse para possível aplicação em indústria vinícola, potencial qual deve ser investigado mais a fundo em estudos posteriores.