

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 02/08/2020.



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

ISABEL ZAPAROLI ROSA

Produção de enzimas despolimerizantes de material
vegetal pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* S10,
por cultivo em estado sólido

São José do Rio Preto

2018

ISABEL ZAPAROLI ROSA

Produção de enzimas despolimerizantes de material
vegetal pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* S10,
por cultivo em estado sólido

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Capes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2018

Rosa, Isabel Zaparoli.

Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* S10, por cultivo em estado sólido / Isabel Zaparoli Rosa. -- São José do Rio Preto, 2018
159 f. : il., grafs. , tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos. 3. Xilanases. 4. Fungos.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Isabel Zaparoli Rosa

Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* S10, por cultivo em estado sólido

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Capes

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
USP – São Paulo

Prof. Dr. Guillermo Ladino Orjuela
UNIFEV – Câmpus Votuporanga

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
02 de agosto de 2018

Aos meus pais, Amélia Zaparoli Rosa e José Antonio Rosa.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu esteio nos momentos de dificuldade, por colocar em meu coração a certeza de que Nele tudo posso e por me capacitar para tudo aquilo a que Ele me destina.

À Profa. Dra. Eleni Gomes, pela orientação, paciência e por ser um exemplo de mulher e profissional a todos nós do LBMA.

Aos meus pais, pelo incansável apoio, por toda dedicação e amor e por tudo que me ensinaram e ensinam. Sem vocês nada seria possível. Amo vocês.

Ao meu irmão, que além de irmão é amigo. Obrigada pela torcida de sempre.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, sou muito grata a todos os momentos compartilhados. Em especial aos irmãos de coração que ali ganhei: Gi, Josi, Jana, Carol, Pedro, Diego, Tiago, Galindo vocês são maravilhosos.

Aos meus colegas Erick, Diego e Roni um obrigada todo especial por todas as trocas de conhecimento e experiências de bancada, vocês contribuíram muito para os resultados deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa da professora Ana Isabel Briones, por terem me acolhido tão bem durante meu estágio na UCLM, e por todos os ensinamentos e momentos compartilhados. Pilar, Ana, María, Bea, Natali...as echo mucho de menos, chicas!!

Ao Prof. Dr. Gustavo Bonilla, pela atenção de sempre nos muitos momentos de dúvidas que a ele recorri.

Aos meus amigos da Silver Fern, por todos os momentos de distração, de parceria e por acreditarem que eu sempre posso mais. Valeu turma das 7!!

Aos meus amados da vida, Carol (irmã que a vida me deu), Ferdi, Galindo, Diego, Josi, Gon, Miguel, Chip, Facla, Maria, Jeanne, Junior, Pilar, Passarini (meu caos...), Cassi, Erika. Vocês são fundamentais para mim.

À minha tia querida Eunice Elizabeth, que sempre esteve presente na minha formação acadêmica e na minha vida me norteando nos momentos em que a mente teimava em escurecer.

À Unesp e a todos os seus funcionários, em especial aos funcionários da sessão de pós de graduação, e às meninas lindas que ajudam na organização do nosso laboratório.

À Capes pela bolsa de estudos concedida.

Epígrafe

Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.

Marie Curie

RESUMO

Os fungos termofílicos verdadeiros fazem parte de um grupo ainda não muito conhecido, sendo relativamente poucas as espécies descritas. Muitas das cepas consideradas termofílicas são na verdade termotolerantes, ou seja, apresentam maior crescimento em temperaturas mesofílicas, mas toleram temperaturas mais elevadas. O fungo *Rasamsonia emersonii* S10, recentemente isolado, apresenta um perfil termofílico verdadeiro, pouco comum, com crescimento em temperaturas ao redor de 60 °C. O presente trabalho buscou conhecer mais sobre as características de crescimento desse fungo e das enzimas extracelulares por ele secretadas quando em cultivos em substratos sólidos lignocelulósicos. Entre as enzimas testadas, endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e β -xilosidase foram as que foram detectadas com as maiores atividades. Foram selecionadas as enzimas β -glicosidase e β -xilosidase para estudos subsequentes, com cultivo do fungo em diferentes substratos, seguindo-se da purificação de ambas as enzimas e caracterização da β -glicosidase. As proteínas foram purificadas em coluna cromatográfica de troca aniônica. Ao final do processo, chegou-se a um fator de purificação de 11 e rendimento de 96% para a β -glicosidase. Estudos bioquímicos revelaram que as condições melhores para atividade da enzima foram pH 3,5 e temperatura de 70 °C. Essa enzima, quando em ausência de substrato, foi estável em estreita faixa de pH (5 a 8,5) e em temperaturas entre 45 a 75 °C. Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} obtidos através de ajuste não linear da curva foram similares para os substratos pNPG e pNPGal, sendo eles de 1,95 e 2,54 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 31,53 e 31,42 mg/mL^{-1} , respectivamente, e os valores calculados de k_{cat} e da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) foram respectivamente, de 163,63 e 102,79 s^{-1} e 83,77 e 40,46 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. A β -glicosidase purificada foi suscetível a todos os cátions, sendo que sua atividade residual foi mantida apenas até 25% em presença de Cd^{2+} , Hg^{2+} e K^+ , chegando a 5% e 0 em presença de Ag^+ e Cu^{+2} . As análises termodinâmicas indicaram que a 70 °C a enzima apresenta meia vida de 7 horas e necessita de 23,50 horas para redução de sua atividade a 10% do valor inicial.

Palavras-chave: fungo termofílico, celulasas, *Rasamsonia emersonii*.

ABSTRACT

True thermophilic fungi are part of a group not yet well known, with few species described. Many of the strains considered thermophilic are, in fact, thermotolerant. Fungus *Rasamsonia emersonii* S10, recently isolated by the group of the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, presented an uncommon thermophilic profile, with a higher growth in temperatures around 60 °C. Due to the fact that this growth profile is rare among fungal species, the present project sought to know more about the growth characteristics of this fungus and extracellular enzymes secreted in solid cultures by using lignocellulosic residues as substrates. Endoglucanase, exoglucanase, β -glycosidase and β -xylosidase demonstrated the best quantitative results among the enzymes tested. For the following steps, β -glucosidase and β -xylosidase enzymes were selected. Quantitative analysis was carried out with the enzymes, ending with the purification of both and β -glycosidase characterization. The enzymes were purified on anion exchange chromatographic column. The process led to a purification factor of 11 and yield of 96% for β -glucosidase. The biochemical data revealed optimum conditions for enzyme activity at pH 3.5 and temperature of 70 °C and stability profiles in the absence of substrate with pH from 5 to 8.5 and temperature from 45 to 75 °C. The kinetic parameters K_m and V_{max} obtained by non-linear curve fitting were similar for the substrates pNPG and pNPGal, being 1.95 and 2.54 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 31.53 and 31.42 mg/mL^{-1} , respectively, and the calculated values of k_{cat} and the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) were, respectively, 163.63 and 102.79 s^{-1} and 83.77 and 40.46 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. The purified β -glycosidase was susceptible to all cations, and its residual activity was maintained only up to 25% in presence of Cd^{2+} , Hg^{2+} and K^+ , reaching 5% and 0 in the presence of Ag^+ and Cu^{+2} . The thermodynamic analysis indicated that at 70° C the enzyme had a half-life of 7 hours and required 23.5 hours to reduce its activity to 10% of the initial value.

Key words: thermophilic fungus, cellulases, *Rasamsonia emersonii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação do fungo <i>R. emersonii</i> S10: (a) em placa de Petri cultivado em meio de aveia e (b) por micrografia de esporângio.....	26
Figura 2	Substratos potenciais e produtos de valor agregado produzidos em biorrefinas de resíduos com uso de ascomicetos filamentosos.....	27
Figura 3	Modo de ação das enzimas celulolíticas na fibra de celulose.....	29
Figura 4	Representação esquemática da hemicelulose e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico. Ac = Grupo acetil.....	32
Figura 5	Produtos provenientes da ação de microrganismos em substratos lignocelulósicos.....	42
Figura 6	Representação do fungo <i>R. emersonii</i> S10: (a) em placa de Petri cultivado em meio de aveia e (b) por micrografia de esporângio e esporos em microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) – 40x.....	53
Figura 7	Análise quantitativa de produção enzimática do fungo <i>R. emersonii</i> S10 a partir de cultivos sólidos. As amostras foram tomadas no 4° e 10° dias de experimento. (a) CMCCase, xilanase, FPase; (b) Avicelase, pectinase, amilase; (c) β -glicosidase, β -xilosidase, Mn peroxidase, lacase; (d) Protease.....	61
Figura 8	Produção das enzimas pelo fungo <i>R. emersonii</i> S10 cultivado em 4 diferentes substratos lignocelulósicos.....	62
Figura 9	Efeito da variação de (a) pH e (b) temperatura de incubação na atividade da β -glicosidase em solução enzimática bruta.....	63
Figura 10	Estabilidade da β -glicosidase produzida pelo fungo <i>R. emersonii</i> S10 em função do (a) pH do meio após 24 h de incubação e em função da (b) temperatura após 1 hora de incubação em ausência de substrato.....	64
Figura 11	Perfis de bandas eletroforéticas referentes à β -glicosidase presente na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo sólido de <i>R. emersonii</i> S10 utilizando farelo de trigo, por 144 h. (a) Gel SDS-PAGE 10% com visualização das bandas de proteínas reveladas pelo método de comassie blue. (b) Zimograma específico para detecção de atividade de β -glicosidase em gel	

	10% mostrando uma isoforma da enzima de estudo. M - Marcador de peso molecular.....	81
Figura 12	Perfil de atividade de β -glicosidase (a) e β -xilosidase (b) do <i>R. emersonii</i> S10 dos eluatos obtidos de minicolunas de resina Q-Sepharose® Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH (faixa de pH de 3 a 8,5).....	83
Figura 13	Perfis eletroforéticos dos eluatos obtidos de minicolunas de resina Q-Sepharose® Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH (faixa de pH de 6 a 8,5). M - Marcador de peso molecular; (a) β -glicosidase; (b) β -xilosidase.....	83
Figura 14	Perfis eletroforético em SDS-PAGE 10% ilustrando a etapa de eluição da proteína da resina Q-Sepharose® Fast Flow no teste de purificação em pequena escala frente à simulação de gradiente salino linear com NaCl (0,04 a 2 M). Tampão Bis-Tris 20 mM pH 6,0. M - Marcador de peso molecular; (a) β -glicosidase; (b) β -xilosidase.....	84
Figura 15	Picos de atividades enzimáticas no cromatograma e bandas eletroforéticas das frações com atividade de β -glicosidase em cromatografia por troca aniônica usando coluna Resource Q 6 mL (fluxo 3 ml/min) (a). Em (b), bandas eletroforéticas em gel de acrilamida 10% de alíquota pura injetada, e gráfico quantitativo da atividade enzimática das alíquotas.....	86
Figura 16	Bandas eletroforéticas das frações com atividade de β -xilosidase em cromatografia por troca aniônica usando coluna Resource Q 6 mL (GE Healthcare) (fluxo 3 ml/min) e análise em gel SDS-PAGE 10% das frações eluídas.....	87
Figura 17	Influência do tempo de reação (0, 1, 5, 10, 12, 15, 18, 20, 25 e 30 min) na atividade da β -glicosidase purificada de <i>R. emersonii</i> S10. Substrato: pNPG 5 mM. Teste realizado a 70°C e pH 3,5.....	89
Figura 18	Efeito do pH (a) sobre a atividade da β -glicosidase purificada, a 70 °C, utilizando tampão acetato de sódio (pH 3 – 5,5), MES (pH 6 e 6,5), HEPES (pH 7 e 7,5), glicina (pH 8 – 9,5) e CAPS (pH 10 e 10,5). Efeito da temperatura de incubação (b) sobre a atividade da β -glicosidase purificada. A reação ocorreu em pH 3,5, utilizando tampão acetato de sódio 0,1 M, e pNPG 5 mM durante 15 min.....	91
Figura 19	Efeitos do pH após 24 horas de incubação (a) e da temperatura durante 1 hora de incubação (b) sobre a estabilidade da β -glicosidase purificada, quando em ausência de substrato.....	93

Figura 20	Curva de Michaelis-Menten da β -glicosidase purificada utilizando como substratos (a) pNPG+glicose (8 mM), (b) pNPG e (c) pNPGal.....	98
Figura 21	Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da β -glicosidase purificada do fungo <i>R. emersonii</i> S10.....	100
Figura 22	Gráfico de primeira ordem da desnaturação térmica irreversível da β -glicosidase purificada do <i>R. emersonii</i> S10.....	101
Figura 23	Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da inativação/desnaturação térmica (E_d) da β -glicosidase purificada.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Etapa da purificação da β -glicosidase do fungo <i>R. emersonii</i> S10.....	87
Tabela 2	Efeito de íons e agentes caotrópicos sobre a atividade da β -glicosidase de <i>R. emersonii</i> S10. A atividade foi realizada utilizando como mistura reacional 40 μ L de solução tampão acetato de sódio 0,1 M pH 3,5, 50 μ L de pNPG a 5 mM e 10 μ L de solução (enzima + íon de interesse) a 70 °C, durante 15 min. Valores em % indicam a perda de força catalítica quando comparados à enzima pura (100%). BME - β -Mercaptoetanol.....	95
Tabela 3	Valores obtidos através do ajuste da curva.....	99
Tabela 4	Parâmetros termodinâmicos da termoinativação irreversível da β -glicosidase purificada.....	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔG_d	Variação da energia livre de Gibbs da desnaturação térmica irreversível
ΔH_d	Variação de entalpia da desnaturação térmica irreversível
ΔS_d	Variação de entropia da desnaturação térmica irreversível
ABTS	2,2'-azino-bis etilbentiazoline
BSA	Soro albumina bovina
CAPS	Tampão ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico
CCR	Repressão catabólica de carbono
CMC	Carboximetilcelulose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
Ea	Energia de ativação da enzima
E_(d)	Energia de ativação para desnaturação irreversível
EC	Enzyme comission
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
h	<i>Constante de Planck</i> ($6,63 \times 10^{-34}$ J.s)
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2 etanosulfônico
k_b	<i>Constante de Boltzmann</i> ($1,38 \times 10^{-23}$ J.K ⁻¹)
k_d	Constante de primeira ordem da taxa de reação da inativação térmica
MES	Tampão ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pNPG	p-nitro-fenil- β -D-glicopiranosídeo
pNPX	p-nitro-fenil- β -D-xilopiranosídeo

pNPGal	4-Nitro-fenil α -D-galactopiranosideo
Q₁₀	Coeficiente térmico
R	Constante universal dos gases (8,314 J.mol ⁻¹ K ⁻¹)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de SDS
T	Temperatura absoluta em Kelvin
t_{1/2}	Tempo de meia vida
TRIS	Tampão Tris (hidroximetil) aminometano
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: Introdução Geral e Revisão da Literatura.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivos gerais.....	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1. Fungos termofílicos.....	22
3.2. Enzimas.....	28
3.3. Substratos e cultivos sólidos.....	37
4. REFERÊNCIAS.....	43

CAPÍTULO II: Avaliação das condições físicoquímicas de cultivo do fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> S10 e perfil de secreção de enzimas celulolíticas.....	50
---	-----------

Resumo.....	51
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAS E MÉTODOS.....	52
2.1. Microrganismo.....	52
2.2. Substratos e meios para o cultivo em estado sólido.....	53
2.3. Pré-inóculos para os cultivos em estado sólido.....	54
2.4. Produção das enzimas por cultivo em estado sólido.....	54
2.5. Determinação das atividades enzimáticas.....	54
2.5.1. Xilanase (EC 3.2.1.8).....	54
2.5.2. Atividade em papel de filtro (FPase) (EC 3.2.1.91).....	55
2.5.3. Endoglucanase (EC 3.2.1.4).....	55
2.5.4. β -glicosidase (EC 3.2.1.21).....	56
2.5.5. β -xilosidase (EC 3.2.1.37).....	56
2.5.6. Avicelase (EC 3.2.1.91).....	57
2.5.7. Determinação da atividade de amilase (EC 3.2.1).....	57
2.5.8. Determinação de atividade proteolítica (EC 3.4).....	57
2.5.9. Determinação da atividade de lacase (EC 1.10.3.2).....	58
2.5.10. Determinação da atividade de Mn peroxidase (EC 1.11.1.13).....	58

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1.	Análise quantitativa das enzimas liberadas pelo fungo <i>R. emersonii</i> S10 através de cultivo em estado sólido.....	59
3.2.	Efeito do tipo de substrato fermentativo sobre a produção das enzimas β -glicosidase e β -xilosidase pelo fungo <i>R. emersonii</i> S10.....	60
3.3.	Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades da enzima β -glicosidase no estrato enzimático bruto.....	62
3.4.	Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade da enzima β -glicosidase quando em ausência de substrato.....	63
4.	CONCLUSÃO.....	64
5.	REFERÊNCIAS.....	64

CAPÍTULO III:	Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos da β -glicosidase de <i>R. emersonii</i> S10.....	68
----------------------	---	----

	Resumo.....	69
1.	INTRODUÇÃO.....	69
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
2.1.	Purificação das enzimas.....	71
2.1.1.	Ensaios de purificação em pequena escala de β -xilosidase e β -glicosidase.....	71
2.1.2.	Análise da β -glicosidase e da β -xilosidase por eletroforese SDS-PAGE e Zimograma.....	71
2.2.	Determinação da concentração total de proteína.....	73
2.3.	Purificação da β -glicosidase e β -xilosidase do fungo <i>R. emersonii</i> S10.....	73
2.4.	Caracterização da enzima purificada.....	74
2.4.1.	Determinação do tempo de reação de β -glicosidase.....	74
2.4.2.	Caracterização bioquímica da β -glicosidase de <i>R. emersonii</i> S10.....	74
2.4.2.1.	Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima.....	74
2.4.2.2.	Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato.....	75
2.4.2.3.	Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade da enzima.....	75
2.4.2.4.	Estudos cinéticos quanto à temperatura de reação, cálculo de E_a e Q_{10}	76
2.4.3.	Estudo dos parâmetros cinéticos da enzima.....	77

2.4.3.1.	Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível.....	78
2.4.3.2.	Determinação da constante de termoinativação (K_d) e meia-vida ($t_{1/2}$).....	78
2.4.3.3.	Energia de ativação da desnaturação térmica E_d (J.mol ⁻¹).....	79
2.4.3.4.	Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_d (J.mol ⁻¹).....	79
2.4.3.5.	Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_d (kJ. mol ⁻¹).....	79
2.4.3.6.	Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_d (J. mol ⁻¹)....	79
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
3.1.	Purificação das enzimas.....	80
3.1.1.	Ensaio preliminares de purificação.....	82
3.1.2.	Purificação da β -glicosidase e β -xilosidase do fungo <i>R. emersonii</i> S10.....	85
3.2.	Determinação do tempo de reação de β -glicosidase.....	88
3.3.	Caracterização bioquímica da β -glicosidase de <i>R. emersonii</i> S10.....	89
3.3.1.	Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima.....	89
3.3.2.	Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato.....	91
3.3.3.	Estudo dos efeitos de íons, compostos orgânicos e inibidores sobre a atividade da enzima.....	93
3.4.	Atividade da β -glicosidase sobre o substrato pNPG, pNPG+Glicose, Celobiose e pNPGalactose em diferentes concentrações e parâmetros cinéticos.....	96
3.5.	Estudos termodinâmicos com a enzima purificada.....	99
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	104
5.	REFERÊNCIAS.....	105

CAPÍTULO IV: Trabalho realizado na Universidad Castilla-La-Mancha durante o estágio no exterior entre setembro de 2016 a julho de 2017: Study of probiotic and biotechnological potential of non-saccharomyces yeasts from brazilian ecosystems.....

Co-autoria (anexo): Selection of potential non-Sacharomyces probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach.....

111

151

CAPÍTULO I:
Introdução Geral e Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO

Os fungos termofílicos são importantes componentes da microbiota que se desenvolvem nos acúmulos de material vegetal, produtos agrícolas e florestais e outras fontes de matéria orgânica, em que o ambiente quente, úmido e aeróbio fornece as condições básicas para seu desenvolvimento. Eles constituem um grupo fisiológico heterogêneo que engloba diversos gêneros como *Humicola*, *Thermomyces*, *Talaromyces*, *Rasamsonia*, *Myceliophthora*, *Myriococcum*, *Remersonia*, *Rhizomucor*, *Scytalidium*, *Sordaria*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Thermomucor* (LANGARICA-FUENTES et al., 2014). As enzimas produzidas por fungos termofílicos apresentam várias propriedades importantes para bioprocessos, como o fato de suas propriedades termofílicas permitirem que os bioprocessos sejam realizados em temperaturas acima de 40 °C, conferindo maior fluidez e operacionalidade com maiores concentrações de substratos e produtos e ainda, a diminuição do risco de contaminação por microrganismos mesofílicos. Além de termo-estabilidade, as termozimas são geralmente mais resistentes a detergentes e às enzimas proteolíticas, além de serem estáveis em amplas faixas de pH, o que possibilita serem usadas em diferentes tipos de materiais e processos (GOMES et al., 2007).

As enzimas direcionadas aos bioprocessos precisam ter uma robustez estrutural e funcional suficiente para resistir às condições de reação que, geralmente, são desfavoráveis às proteínas. Por exemplo, a sacarificação de biomassa lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentescíveis requer atividade de um número de enzimas, as quais atuam de forma sequencial e complementar, requerendo estabilidade durante as condições não muito brandas do processo. Além das condições físicas e físico-químicas, compostos químicos inibidores também podem ser gerados como vários derivados de lignina que são potenciais inibidores das enzimas e microrganismos. Portanto, a ligação não produtiva da lignina ou a desativação de proteínas por esses inibidores precisam ser superadas e, portanto, a busca de enzimas com propriedades diferenciadas é uma estratégia tecnológica importante (KIM et al., 2014). Nesse contexto, as enzimas dos fungos termofílicos, ainda pouco estudadas, podem ser o diferencial.

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose (34 - 50%), hemicelulose (19 - 34%) e lignina (11 - 30%), que se encontram associadas por meio de diferentes tipos de ligações covalentes e não covalentes (ROGALINSKI et al., 2008; CAGNON et al., 2009; YOON et al., 2014). Os açúcares presentes nos materiais lignocelulósicos podem ser fermentados a combustíveis, tais como, etanol, butanol e biogás (GALBE; ZACCHI, 2012).

Neste trabalho são apresentados resultados dos estudos realizados com um fungo termofílico e suas enzimas que degradam material lignocelulósico, com foco nas β -glicosidases, dividido em três capítulos. Um quarto traz os resultados de trabalho realizado durante o Doutorado Sanduiche na Universidad de Castilla La Mancha (UCLM), sob a supervisão da Profa. Dra. Ana Isabel Briones.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Explorar e conhecer a biologia do fungo *Rasamsonia ermerstonii* S10, estudando as enzimas que podem ser por ele produzidas em cultivo em estado sólido em diferentes substratos lignocelulósicos.

2.2. Objetivos específicos

- estudar as condições físico-químicas de cultivo do fungo como pH, temperatura e umidade, e características nutricionais, avaliando efeitos de diferentes substratos lignocelulósicos e fontes de macronutrientes;
- avaliar o perfil de secreção de celulasas, hemicelulasas, ligninases, amilases, peroxidases;
- purificar a enzima produzida em maior quantidade e/ou com características mais interessantes sob o ponto de vista de aplicação na sacarificação de material lignocelulósico;
- caracterizar a enzima purificada, com foco em sua termoestabilidade.

BIBLIOGRAFIA

- ÁLVAREZ-CALATAYUD, G.; MARCOS, A.; MARGOLLES, A. Probióticos, prebióticos y salud: evidencia científica. **Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos**, 2016.
- ALVES-ARAÚJO, C.; PACHECO, A.; ALMEIDA, M. J.; SPENCER-MARTINS, I.; LEÃO, C.; SOUSA, M. J. Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. **Microbiology**, v. 153, p. 898-904, 2007.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑGA, M. R.; ARÉS, I.; MARTÍNEZ, M. A. Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits, Chapter 1 Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00001-0>, 2016.
- ANTUNES, J.; AGUIAR, C. Search for killer phenotypes with potential for biological control. Short Communications, **Annals of Microbiology**, Milan, v. 62, p. 427-433, 2012.
- ARÉVALO-VILLENA, M.; FDEZPACHECO-RGUEZ, P.; BEVILACQUA, A.; CORVO, M. A. Probiotic capability of *Saccharomyces* yeast (Send **Food Microbiology**), 2016.
- ARMANDO, M. R., PIZZOLITTO, R. P.; DOGI, C. A.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 256-264, 2012.
- ASKAR, A.; TREPTOW, H. Biogene amine in Lebensmitteln. Ulmer, Stuttgart Vorkommern, Bedeutung und Bestimmung. Stuttgart, Germany. Eugen Ulmer, **GmbH & CO**, 1986.
- BASSO, R. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could no-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations. **Food Research International**, v. 86, p. 112-120, 2016.
- BAUTISTA-GALLEGO, J.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; RANTSIOU, K.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; COCOLIN, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, p. 135-142, 2013.
- BOURDICHON, F., CASAREGOLA, S., FARROKH, C., FRISVAD, J. C., GERDS, M. J., HAMMESF, W.P., HARNETT, J., HUYS, G., LAULUND, S., OUWEHAND, A., POWELL, I. B., PRAJAPATI, J. B., SETO, Y., TER SCHURE, E., VAN BOVEN, A., VANKERCKHOVEN, V., ZGODA, A., TUIJTELAARS, S., HANSEN, E. H. Review: Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 87-97, 2012.
- CRUZ, T. M. L.; COUTO F. M. M.; FRANÇA, G. S.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R. P. Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro. In: IX

Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Recife. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009.

FADDA, M. E.; MOSSA, V.; DEPLANO, M.; PISANO, M. B.; COSENTINO, S. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 100-106, 2017.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Amerian Córdoba Park Hotel, Cordoba (Argentina), 2001.

FARIAS, M. V.; VITAL, M. J. S. Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Naturais). Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2008.

FLEET, G. H.; BALIA, R. The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. **Yeasts in Food and Beverages**, Chapter 12, p. 381 - 398, 2006.

FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p.170-175, 2007.

FUENTEFRÍA, A. M.; VALENTE, P. Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do hibiscus rosa-sinensis. **Dissertação** (mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

GARCIA-HERNANDEZ Y.; RODRÍGUEZ Z.; BRANDÃO L. R.; ROSA C. A.; NICOLI, J. R.; IGLESIAS, A. E.; PERÉZ-SANCHES, T.; SALABARRÍA, R. B.; HALAIHEL, N. Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 798-802, 2012.

GIL-RODRIGUEZ, A. M.; CARRASCOSA, A. V.; REQUENA, T. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 1156-1162, 2015.

GLUSHAKOVA, A. M.; KACHALKIN, A.V.; CHERNOV, I.YU. Yeasts in the flowers of entomophilic plants of the Moscow region. **Microbiology**, v. 83, p. 125–134, 2014.

GREPPI, A.; SAUBADE, F.; BOTTA, C.; HUMBLLOT, C.; GUYOT, J. P.; COCOLIN, L. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. **Food Microbiology**, v. 62, p. 169-177, 2017.

GROSSENS, K.; WILLAERT, R. Flocculation protein structure and cell–cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letter**, v. 32, p. 1571–1585, 2010.

GONZALEZ, R.; QUIRÓS, M.; MORALES, P. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to

lowering alcohol content of wines. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, p. 55-61, 2013.

HANS VAN DIJKEN. The 21st International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY 2001); Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non conventional Yeasts (NCY). **FEMS Yeast Research**, v.1, p. 337-338, 2002.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER U.; HUIS, IN'T VELD, J. H. Overview of gut flora and probiotics. **International journal of food microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.

JOHNSON, E. A. Mini-review: Biotechnology of no-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 503–517, 2013.

KRIEGER, N. Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum*. **Tese** (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts** – A Taxonomy Study. Elsevier, Fourth edition, 1999.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*, **Journal Molecular Biology**, v. 76, p.103-122, 1973.

MARTINS, F.; SILVA, A.; VIEIRA, A.; BARBOSA, F.; ARANTES, R.; TEIXEIRA, M.; NICOLI, J. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Arch. Microbiology**, v. 191, p. 623-630, 2009.

MICHEL, M.; KOPECKÁ, J.; MEIER-DÖRNBERG, T.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Screening for new brewing yeasts in the no-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. **Yeast**, v. 33, p. 129-144, 2016.

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

MOSLEHI-JENEBIAN, S.; PEDERSEN, L. L.; JESPERSEN, L. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. **Nutrients**, v. 2, p. 449-473, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. – Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6 Ed. São Paulo: **Art Med**, 2014.

PIZZOLITTO, R. P.; ARMANDO, M. R.; COMBINA, M.; DALCERO, A. M.; SALVANO, M. A. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs. **Journal of environmental science and health- Part B Pesticides, Food, Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 47, p. 933-941, 2012.

PORTUGAL, C.; PINTO, L.; RIBEIRO, M.; TENORIO, C.; IGREJAS, G.; RUIZ-LARREA, F. Potential spoilage yeasts in winery environments: Characterization

and proteomic analysis of *Trigonopsis cantarellii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 113–120, 2015.

PRIYA. A. J.; VIJAYALAKSHMI, S. P.; RAICHUR, A. M. Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layer through layer-by-layer approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11838-11845, 2011.

REUTER, R. J.; TAN D. X.; TERRON M. P.; FLORES L. J.; CZARNOCKU Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochem Pol**, v. 54, p. 1-9, 2007.

RODRIGUE-NARANJO, M. I.; TORIJA, M. J.; MAS, A.; CANTOS-VILLAR, E.; GARCIA-PARRILA, M. C. Production of melatonin by *Saccharomyces* strain under growth and fermentation condition. **Journal of Pineal Research**, v. 53, p. 219-224, 2012.

SANTOS, T. T. Identificação e análise do potencial enzimático de leveduras isoladas do afloramento rochoso do morro da pioneira – Bahia. Trabalho de conclusão de curso (**Bacharelado em Biologia**) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das almas, 2012.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 55, p. 1901 - 1906, 1989.

SPERANZA, B.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. **Journal of food science**, v. 76, p.12-16, 2011.

SUAREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. **Food Chemistry**, v. 102, p. 10-21, 2007.

VILLALBA, M. L.; SÁEZ, J. S.; MONACO, S.; LOPES, C. A.; SANGORRÍN, M.P. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 94–100, 2016.

VIZOSO-PINTO, M. G.; FRANZ, C. M. A. P.; SCHINLLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic porperties from human faeces and traditional fermented products. *Int. J. Food Microbiology*, v. 109, p. 205-214, 2006.

WALKER, G.M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* - **Springer**, v. 99, p. 25–34, 2011.

ZARA, S.; BAKALINSKY, A. T.; ZARA, G.; PIRINO, G.; DEMONTIS, M. A.; BUDRONI, M. FLO11-based model for air–liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2934–2939, 2005.