

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/04/2022.

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.

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 experienciar 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 bioprocesso 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, respectivamente, 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

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*.

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.