

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 Pós-Graduação Programa de em Microbiologia, Instituto do 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



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, Faela, 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 elevadas. O fungo Rasamsonia temperaturas mais 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 βxilosidase 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 $K_{\rm m}$ e $V_{\rm max}$ obtidos através de ajuste não linear da curva foram similares para os substratos pNPG e pNPGal, sendo eles de 1,95 e 2,54 µmol/min.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 mM⁻¹s⁻¹. A β-glicosidase purificada foi suscetível a todos os cátions, sendo que sua atividade residual foi mantida apenas até 25% em presença de Cd²⁺, Hg²⁺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, celulases, Rasamsonia emersonii.

ABSTRACT

True thermophilic fungi are part of a group not yet well known, with few species described. Many of the strains considered thermophilics are, in fact, thermotolerants. 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, βglycosidase 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 µmol/min.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 mM⁻¹s⁻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
Figura 2	Substratos potenciais e produtos de valor agregado produzidos em biorrefinas de resíduos com uso de ascomicetos filamentosos
Figura 3	Modo de ação das enzimas celulolíticas na fibra de celulose29
Figura 4	Representação esquemática da hemicelulose e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico. Ac = Grupo acetil32
Figura 5	Produtos provenientes da ação de microrganismos em substratos lignocelulósicos
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 (LeicaICC 50) – 40x
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) CMCase, xilanase, FPase; (b) Avicelase, pectinase, amilase; (c) β-glicosidase, β-xilosidase, Mn peroxidase, lacase; (d) Protease
Figura 8	Produção das enzimas pelo fungo <i>R. emersonii</i> S10 cultivado em 4 diferentes substratos lignocelulósicos
Figura 9	Efeito da variação de (a) pH e (b) temperatura de incubação na atividade da β-glicosidase em solução enzimática bruta63
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
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 molecular81
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)
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
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
Figura 15	Picos de atvidades 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
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
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 3,589
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
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 substrato93

Figura 20	Curva de Michaelis-Menten da β-glicosidase purificada utilizando como substratos (a) pNPG+glicose (8 mM), (b) pNPG e (c) pNPGal
Figura 21	Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da β -glicosidase purificada do fungo R . emersonii S10
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 ($E_{\rm d}$) da β -glicosidase purificada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Etapa da purificação da β-glicosidase do fungo <i>R. emersoni</i> S10 87						
Tabela 2	Efeito de íons e agentes caotrópicos sobre a atividade da glicosidase de <i>R. emersonii</i> S10. A atividade foi realizada utilizand como mistura reacional 40 μL de solução tampão acetato de sód 0,1 M pH 3,5, 50 μL de pNPG a 5 mM e 10 μL de solução (enzim + íon de interesse) a 70 °C, durante 15 min. Valores em % indica a perda de força catalítica quando comparados à enzima pu (100%). BME - β-Mercaptoetanol						
Tabela 3	Valores obtidos através do ajuste da curva99						
Tabela 4	Parâmetros termodinâmicos da termoinativação irreversível da β-glicosidase purificada104						

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Δ**G**_d Variação da energia livre de Gibbs da desnaturação

térmica irreversível

 ΔH_{d} Variação de entalpia da desnaturação térmica irreversível

∆**S**_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

Energia de ativação para desnaturação irreversível

EC Enzyme comission

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FPLC Fast Protein Liquid Chromatography

h Constante de Planck (6,63 x 10⁻³⁴ J.s)

HEPES Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2 etanossulfónico

k_b Constante de Boltzmann (1,38 x 10⁻²³J.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⁻¹K⁻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

t½ Tempo de meia vida

TRIS Tampão Tris (hidroximetil) aminometano

UV-VIS Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

САРІ́Т	TULO I: Introdução Geral e Revisão da Literatura	19		
1.	INTRODUÇÃO	20		
2.	OBJETIVOS			
2.1.	Objetivos gerais	21		
2.2.	Objetivos específicos2	1		
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22		
3.1.	Fungos termofílicos	22		
3.2.	Enzimas28			
3.3.	Substratos e cultivos sólidos	37		
4.	REFERÊNCIAS	43		
	FULO II : Avaliação das condições físicoquímicas de cultivo do fung			
	<i>msonia emersonii</i> S10 e perfil de secreção de enzima 			
	líticas5			
	no			
	INTRODUÇÃO			
2.	MATERIAS E MÉTODOS5			
2.1.	Microrganismo5			
2.2.	Substratos e meios para o cultivo em estado sólido			
2.3.	Pré-inóculos para os cultivos em estado sólido5			
2.4.	Produção das enzimas por cultivo em estado sólido 5 4	4		
	Determinação das atividades enzimáticas5	•		
	. Xilanase (EC 3.2.1.8) 54			
2.5.2.	Atividade em papel de filtro (FPase) (EC 3.2.1.91)5	5		
2.5.3.	Endoglucanase (EC 3.2.1.4) 5	5		
2.5.4.	β-glicosidase (EC 3.2.1.21) 5	6		
2.5.5.	β-xilosidase (EC 3.2.1.37) 5	6		
2.5.6.	Avicelase (EC 3.2.1.91)5	7		
2.5.7.	Determinação da atividade de amilase (EC 3.2.1)57	7		
2.5.8.	Determinação de atividade proteolítica (EC 3.4) 5	7		
2.5.9.	Determinação da atividade de lacase (EC 1.10.3.2) 5	8		
2.5.10	Determinação da atividade de Mn peroxidase (EC 1.11.1.13) 5	8		

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. Análise quantitaviva das enzimas liberadas pelo fungo <i>R. emersonii</i> S	10
através de cultivo em estado sólido	59
3.2. Efeito do tipo de substrato fermentativo sobre a produção das enzima	as
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	32
3.4. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade da enzima	β-
glicosidase quando em ausencia de substrato	63
4. CONCLUSÃO	64
5. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO III: Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos	е
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 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> S10.7	73
2.4. Caracterização da enzima purificada	4
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 7	4
2.4.2.1. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima7	' 4
2.4.2.2. Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzin	na
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	termodinâmico	s da	desnatur	ação	térmica
irreversível.						78
2.4.3.2.	Determinação	da constante d	de termoir	nativação	(K_d) e	meia-vida
(t _{1/2})						78
2.4.3.3.	Energia de ativ	/ação da desnat	uração tér	mica <i>E</i> d (、	J.mol-1)	79
2.4.3.4.	Entalpia de ati	vação da desna	turação téi	rmica ∆ <i>H</i> d	(J.mol-	1) 79
2.4.3.5.	Energia livre d	le Gibbs de ativ	ação da c	lesnatura	ção térr	nica ∆ <i>G</i> d
(kJ. mol ⁻¹)						79
2.4.3.6.	Entropia de ati	vação da desna	turação té	rmica ∆ <i>S</i> d	(J. mol	⁻¹) 79
3. RESU	JLTADOS E DIS	CUSSÃO				80
3.1. Purifi	cação das enzin	าลร				80
3.1.1. Ensa	ios preliminares	de purificação				82
3.1.2. Purifi	cação da β-glico	sidase e β-xilos	idase do f	ungo <i>R. e</i>	merson	ii S10. 85
3.2. Deter	minação do tem	po de reação de	e β-glicosi	dase		88
3.3. Carao	cterização bioqu	ímica da β-glico	sidase de	R. emers	onii S10) 89
3.3.1. Efeito	os do pH e temp	eratura sobre a	atividade d	da enzima		89
3.3.2. Efeito	os do pH e temp	eratura sobre a	estabilida	de da enz	zima qu	ando em
ausência de	substrato					91
3.3.3. Estud	lo dos efeitos d	le íons, compos	stos orgán	icos e ini	bidores	sobre a
atividade da	enzima					93
3.4. Ativid	ade da β-glico	sidase sobre c	substrate	o pNPG,	pNPG-	+Glicose,
Celobiose	e pNPGalactos	se em diferen	tes conce	entrações	e pa	râmetros
cinéticos						96
3.5. Estud	los termodinâmi	cos com a enzir	na purifica	da		99
4. CON	CLUSÕES E PE	RSPECTIVAS				104
5. REFE	ERÊNCIAS					105
CAPÍTULO	IV: Trabalho re	alizado na Univ	ersidad Ca	astilla-La-	Mancha	durante
o estágio no	exterior entre s	etembro de 201	6 a julho d	le 2017: S	Study of	probiotic
and biotech	nnological poter	ntial of non-sac	ccharomyc	es yeasts	from	brazilian
ecosystems						111
	(anexo): Selection					

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 se 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 lignocelulosica 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 fisicas e fisico-químicas, compostos químicos inbidores 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 ermersonii* 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 celulases, hemicelulases, 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.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fungos termofílicos

Os fungos filamentosos são amplamente distribuídos na natureza fazendo parte da microbiota dos solos, águas, nos organismos vegetais e animais. Nesses últimos, os fungos estabelecem relações mais estreitas como parasitismo e simbiose e, como organismos saprofíticos, agindo na matéria orgânica como decompositores (IWASHITA, 2002). A maioria dos fungos do solo tolera ambientes constantemente variáveis e se adaptam a estressores bióticos e abióticos o que pode exigir um custo metabólico considerável.

Quando provenientes de ambientes de solo, onde experimentam habitats temporalmente dinâmicos consistindo em mudanças de temperatura, umidade, osmolaridade, privação de nutrientes, interações antagônicas como a presença de toxinas e predadores, os fungos tendem a apresentar características fisiológicas e morfológicas resultantes da adaptação e essas condições (ANDRADE-LINARES et al., 2016). Essas características, assim como os bioprodutos delas resultantes são aspectos diferenciadores desses organismos quando se buscam cepas para desenvolvimento de bioprocessos na produção em larga escala de uma ampla gama de produtos de valor agregado, incluindo ácidos orgânicos, enzimas e antibióticos (POSCH et al., 2013).

A evolução de fungos de solo como ascomicetos e basidiomicetos ocorreu no sentido da adaptação a substratos sólidos. O primeiro estágio de desenvolvimento é a germinação dos esporos e, após isso, os fungos filamentosos formam hifas tubulares que se alongam a partir das pontas e ao mesmo tempo, formam novas ramificações. O crescimento apical das hifas vegetativas envolve a translocação dos nutrientes e dos materiais sintetizados nas regiões distais para a região apical, onde a hifa vai incorporar esse material na síntese de parede celular (NIELSEN, 1996). A ramificação é um processo pelo qual são produzidas novas hifas e resulta em aumento da área superficial da colônia, o que auxilia a obtenção de nutrientes e oxigênio e também para facilitar eventos de fusão entre diferentes hifas da colônia (HARRIS; KRAUS, 1998). Essa morfologia permite que os microrganismos colonizem a superfície

do substrato e penetrem na sua matriz em busca de nutrientes. A biomassa microbiana na superfície e no interior da matriz do substrato secreta enzimas despolimerizantes (glicosidases, proteases, lipases) e assimila os nutrientes minerais e fontes de carbono liberados da ação dessas enzimas sobre esse substrato (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). A alta produtividade de enzimas extracelulares dos fungos filamentosos está relacionada a essa forma de crescimento apical e ramificações, visto que cada ponta de hifa corresponde a uma região secretora e quanto mais ramificada for a colônia, maior a área de secreção. As habilidades que esses organismos têm em crescer em uma ampla gama de substratos de baixo custo, associadas a essa forma de secreção de proteínas, fazem dos fungos filamentosos e seu crescimento em substratos sólidos residuais um importante sistema fermentativo (WARD, 2012).

Além da versatilidade dos fungos na degradação de materiais sólidos, os efeitos da variação da temperatura em sua estrutura e fisiologia celular exerceram sobre esses organismos uma pressão seletiva de diferenciação de grupos com relação à capacidade de adaptação a faixas mais elevadas de temperatura. A existência de ambientes geotérmicos estáveis permitiu a seleção dessas espécies que não apenas resistem às elevadas temperaturas, mas que exigem essas temperaturas para sobreviver (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Os fungos filamentosos, por serem eucarióticos, têm adaptação mais limitada que os procariotos às variações de temperatura, visto que o sistema de membrana desse grupo envolve complexo ajuste bioquímico e estrutural às temperaturas acima da faixa mesofílica (GOMES et al., 2007). Em eucariotos a ocorrência de poros nas membranas gera um ambiente de incompatibilidade com a estabilidade térmica e ainda, o sistema de saturação dos ácidos graxos da membrana como ocorre em procariotos, caso se fizesse presente em eucariotos, dificultaria principalmente a atividade da membrana nuclear (MADIGAN, 2010).

Um dos mais significativos fatores de adaptação à termofilia são os mecanismos intrínsecos relacionados às estruturas primárias e secundárias das proteínas (GOMES et al., 2007). As macromoléculas são inativadas

irreversivelmente pelo calor, mas em microrganismos termofílicos estes componentes são mais estáveis (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Há um crescente interesse biotecnológico pelas enzimas produzidas por microrganismos termofílicos devido a sua capacidade de atuar em condições em que as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos seriam geralmente desnaturadas (HOUGH; DANSON, 1999; MAHESHWARI et al., 2000).

As enzimas termofílicas e termoestáveis apresentam tempos de reação mais curtos para a completa sacarificação do polissacarídeo de plantas em comparação com as enzimas hidrolíticas mesófilas (VAN DEN BRINK et al., 2013). Este tipo de enzima possibilita a condução da reação de hidrólise a temperaturas superiores a 50 °C, o que lhes confere propriedades marcantes como maior velocidade no processo hidrolítico, menor viscosidade do meio, execução de testes com maiores concentrações de produtos e substratos, além de diminuição do risco de contaminação por fungos mesofílicos (MORETTI, 2010).

Os fungos termofilicos não se restringem a uma ordem taxonômica específica e ocorrem em todos os grupos filogenéticos. Segundo Maheshwari et al., (2000) dos cerca de 50.000 fungos descritos até o ano 2000, apenas 18 gêneros eram considerados termofílicos, porém após mudanças ocorridas na classificação taxonômica, os fungos termofílicos passaram a abranger 20 genêros (Acremonium, Arthrinium, Canariomyces, Chaetomium, Humicola, Myceliophthora, Myriococcum, Mucor, Malbranchea. Melanocarpus, Rasamsonia, Remersonia, Rhizomucor, Scytalidium, Sordaria, Thermoascus, Thermophymatospora e Thermomyces. Thermomucor, compreendendo cerca de 44 espécies embora algumas foram e continuam identificados com diferentes nomes (MOUCHACCA, 2000; DE OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, muitos fungos termotolerantes têm sido classificados como termofílicos, principalmente em pesquisas aplicadas (MOUCHACCA, 2000). Estas desordens na taxonomia dos fungos geram conflitos e, às vezes identificações errôneas (GOMES et al., 2007, GOMES et al., 2016).

Usando o critério de que um fungo termófilo é aquele que cresce mais rápido em 45 °C do que a 34 °C, e que a verdadeira termofilia não é generalizada no reino dos fungos, Morgenstern et al., (2012) sugerem que os

fungos termófilos conhecidos pertencem às ordens *Sordariales (Myriococcum thermophilum, Scytalidium thermophilum), Eurotiales (Talamomyces emersonii, T. thermophila, Thermomyces lanuginosus)* e possivelmente a *Mucorales,* abrigando *Calcarisporiella thermophila* no grupo de fungos basais *Onygenales* (BERKA et al., 2011).

O fungo estudado no presente trabalho, *Rasamsonia emersonii* S10 foi recentemente isolado em trabalho de pesquisador do grupo do Laboratorio de Bioquimica e Microbiologia Aplicada, IBILCE, UNESP, SJRP. O fungo *R. emersonii* pertence ao filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*. É um fungo termofílico e foi uma das espécies que passaram pela exclusão de dupla nomenclatura pelo Código de Nomenclatura Internacional para Algas, Fungos e Plantas (NORVELL, 2011), sendo que sua sinonímia antes da ocorrência da mudança era *Talaromyces emersonii*. Em 2011 ficou estabelecido que fungos devessem ter apenas uma nomeação.

De acordo com a classificação tradicional, a maioria das espécies de *Talaromyces* é mesófila, mas existem exceções que são as espécies do grupo emersonii e thermophila. O grupo emersonii inclui *Talaromyces emersonii*, *T. byssochlamydoides*, *T. bacillisporus* e *T. leycettanus*, todas as quais crescem bem a 40 °C. *Talaromyces bacillisporus* e *T. leycettanus* são termotolerantes, e *T. emersonii* e *T. byssochlamydoides* são verdadeiramente termofílicas (STOLK; SAMSON, 1972).

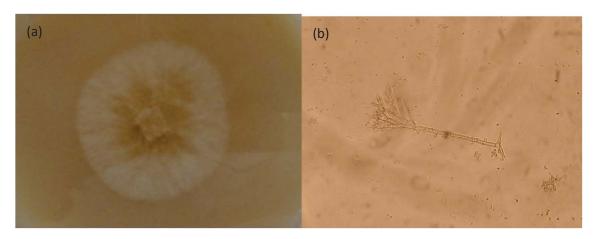
Com base em novos dados moleculares, fisiológicos e fenotípicos divergências apareceram com relação à taxonomia de algumas espécies de termofílicos, o gênero *Rasamsonia* foi introduzido para acomodar as espécies *Geosmithia argillacea, Talaromyces emersonii, Talaromyces byssochlamydoides.* Os membros deste gênero formam conidióforos parecidos com os encontrados no gênero *Penicillium*, mas diferem quanto à formação de fiálides cilíndricas geralmente diminuindo gradualmente em direção ao ápice, estipes de paredes ásperas, conídeos marrom-oliva e ascomas, se presentes, com uma cobertura reduzida. Além disso, espécies *Rasamsonia* são termotolerantes ou termofílicas, enquanto as pertencentes à *Penicillium* são geralmente mesófilicas. Entre todas as espécies desse gênero, o termofílico

Rasamsonia emersonii é utilizado comercialmente para a produção de enzimas termoestáveis (YILMAZ et al., 2014).

O microrganismo *R. emersonii* (Figura 1) apresenta conidióforos com conídeos regularmente ramificados de coloração marrom-oliva, ascomas presentes e amadurecimento dentro de 7 a 10 dias.

*Talaromyces emersonii Stolk, Antonie van Leeuwenhoek 31: 262. 1965 ≡ Penicillium emersonii Stolk, Antonie van Leeuwenhoek 31: 262. 1965 ≡ Rasamsonia emersonii (Stolk) Houbraken & Frisvad, Antonie van Leeuwenhoek 101: 417. 2011. [MB339920]. — Herb.: CBS H-7817. Ex-type: CBS 393.64 = ATCC 16479 = CECT 2607 = IFO 31232 = IMI 116815 = IMI 116815ii (YILMAZ et al., 2014).

Figura 1 - Representação do fungo *R. emersonii* S10: (a) em placa de Petri cultivado em meio de aveia e (b) por micrografia de esporângio, 40x.

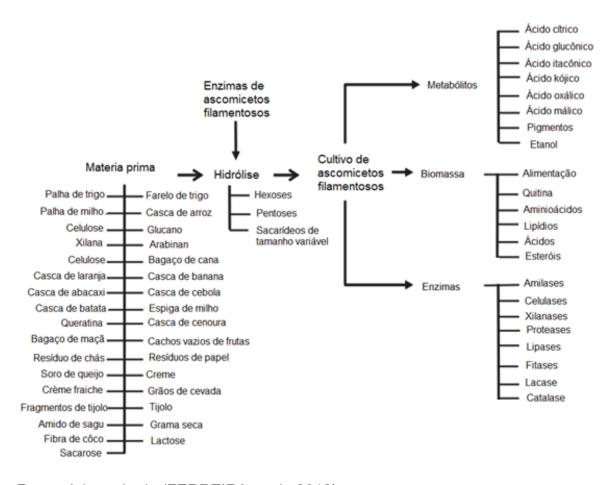


Fonte: Autoria própria.

Alguns testes de cultivo a 37 °C encontrados na literatura em dois diferentes tipos de meios de cultura foram realizados para ser possível a observação de algumas características do fungo: crescimento variando de pequeno a moderado, esporulação ausente ou muito restrita, exsudato e pigmentos solúveis ausentes, micélio discreto e branco, podendo chegar a castanho-claro. Em outro caso, esporulação fraca ou ausente, pigmentos solúveis ausentes, micélio imperceptível, se esporulação está presente, então é possível observar uma colônia marrom-oliva pálido (HOUBRAKEN et al; 2012).

Os ascomicetos filamentosos detêm alto potencial para serem biocatalisantes no núcleo dos "resíduos biodegradáveis". A gama de possíveis substratos e produtos de valor agregado produzidos a partir da "lixiviação de resíduos com uso de ascomicetos filamentosos" é apresentada na Figura 2 (FERREIRA et al., 2016).

Figura 2 - Substratos potenciais e produtos de valor agregado produzidos em biorrefinarias de resíduos com uso de ascomicetos filamentosos.



Fonte: Adaptado de (FERREIRA et al., 2016).

Os ascomicetos são produtores de celulases e enzimas relacionadas, mantendo altas atividades enzimáticas que podem servir para diferentes fins em diversos setores industriais como têxteis, papel e celulose, alimentos e ração animal, combustível, química, gestão de resíduos e indústrias farmacêuticas.

3.2. Enzimas

Os fungos filamentosos saprofíticos evoluíram como excelentes degradadores de lignocelulose por meio de eficiente expressão e secreção de enzimas extracelulares que atuam sobre os polímeros que compoem as paredes celulares das plantas. O fungo detecta a presença da lignocelulose por meio de diferentes tipos de indutores, geralmente derivados da hidrólise daqueles polímeros e respondem secretando um grupo de enzimas hidrolíticas e, na sequência, assimilam os monômeros de açúcares liberados, os quais sustentam seu crescimento. Os indutores da expressão das enzimas CAZymes (enzimas ativas de carboidratos), liberados a partir da degradação da lignocelulose, são monômeros ou dímeros de xilose, lactose, arabinose, celobiose (DALY et al., 2015; HUBERMAN et al., 2016).

"Regulons" é o termo utilizado para nomear e definir grupos de genes que são induzidos e expressos em substratos específicos. Os genes que codificam as CAZymes, ativados através de polissacarídeos, são um dos maiores grupos desses "regulons". Além dos reguladores bioquímicos, fatores ambientais como pH e luz também têm papel crucial na regulação e expressão desses genes. Assim, as diferenças na produção de CAZymes podem ser explicadas em parte pelo sistema homeostático pelo qual um fungo responde às flutuações de pH do ambiente. Além das CAZymes, outro grupo de genes regulados em resposta à lignocelulose e seus derivados são proteínas de transporte de membrana que têm papel importantíssimo na degradação da lignocelulose por permitirem a absorção do indutor e assimilação dos produtos de quebra dos polímeros (DALY et al., 2015; EZEILO et al., 2017).

A biodegradação da celulose é feita por um complexo de enzimas oxidativas e hidrolíticas que agem sinergisticamente na transformação da macromolécula em monômeros e dímeros de glicose. Esse complexo é formado por endoglucanases, exoglucanases e β-glicosidase (GOYAL et al., 1991), classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico: a) Endoglucanases (EC 3.2.1.4), que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases (EC 3.2.1.91), que atuam na região externa da celulose; e c) β-glicosidases (EC 3.2.1.21) que constituem um grupo de enzimas bem caracterizadas, biologicamente e industrialmente que catalisam

mecanisticamente a transferência de grupos glicosil entre nucleófilos de oxigênio (PAL et al., 2010); as β-glicosidases hidrolisam oligossacarídeos curtos e celobiose a glicose (LYND et al., 2002). Geralmente, as endoglucanases e celobiohidrolases funcionam sinergicamente na hidrólise de celulose (RABINOVICH et al., 2002) (Figura 3).

A celobiose desidrogenase oxida a celobiose e celooligossacarídeos de elevada massa molar, utilizando uma ampla faixa de aceptores de elétrons, como quinonas, radicais fenólicos, oxigênio, Fe³⁺, Cu²⁺ (FLITSCH et al., 2013).

CH,OH CH,OH

B-glucosidase

Unidade de

Glicose

Extremidade não

redutora

Figura 3 - Modo de ação das enzimas celulolíticas na fibra de celulose.

Fonte: Adaptado de Watanabe; Tokuda (2010).

Endo-B-1, 4-glucanase

(endoglucanase) (cellulase)

Cellobiohydrolase

(exocellobiohydrolase) (exocellulase)

Os problemas fundamentais envolvidos na hidrólise enzimática da celulose estão em três áreas principais:

1-) Com relação ao substrato sólido e multiplicidade de substratos - teores de lignina e hemicelulose, tamanho e área superficial do substrato celulósico,

Extremidade redutora

cristalinidade e grau de polimerização da celulose, grau de adsorção da enzima sobre celulose e lignina, e a associação constante entre o substrato celulolítico e a enzima que variam de acordo com a fonte do substrato e o tempo durante a reação de hidrólise (RYU; MANDELS, 1980).

2-) Com relação ao sistema multi-enzimático, efeito sinergístico e inibição - As endo- e exo-celulases e β-glicosidase têm mecanismo de reação coordenado pelo qual o substrato celulósico polimérico é degradado até o monômero de glicose. Essa atuação segue um efeito sinergístico, ou seja, quando atuam conjuntamente, apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais. Têm sido descritas três interações sinergísticas entre as celulases: 1) EnG-ExG - a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; 2) ExG-ExG - as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase; 3) sinergias ExG-BG e EnG-BG, a celobiohidrolase a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β-glicosidase (BEHERA et al., 2017). Entretanto, no complexo sistema da regulação da expressão dessas enzimas, na sequência de reação de hidrólise, o produto de cada passo de reação exerce efeito inibitório sobre a enzima que o gerou. O efeito da inibição do produto da β-glicosidase é mais grave, devido à acumulação do produto final na sequência de reação. Por outro lado, a ausência dessa enzima leva ao acúmulo de celobiose que inibe a endoglucanase (YOON et al., 2014). Assim, a atividade relativa e a taxa de cada componente enzimático em um coquetel de hidrólise devem ser otimizados em relação à taxa de reação geral, de modo a não causar qualquer passo limitante de velocidade na sequência de reações.

3-) Inativação enzimática - a perda de atividade da enzima pode ser decorrente de vários fatores, desde ação de inibidores até inativação total ou parcial da proteína. Fatores como temperatura, pH, cisalhamento, íons minerais, proteases e adsorventes de celulases podem diminuir ou bloquear a ação das enzimas. O grau de inativação da celulase por esses fatores varia com os diferentes componentes da celulose durante a hidrólise (RYU; MANDELS, 1980).

As β-glicosidases (BG) formam um grupo altamente heterogêneo, fazem parte das glicosil hidrolases e encontram-se amplamente distribuídas em bactérias, fungos, plantas e animais (BHATIA et al., 2002). Representam um grupo de enzimas com funções variadas, responsáveis por catalisarem a hidrólise de ligações β-glicosídicas de dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados, exibindo alta especificidade. A classificação dessas enzimas tem sido realizada com base na similaridade de sequência de aminoácidos e similaridades estruturais de seis famílias das hidrolases de glicosídeos GH 1, GH 3, GH 5, GH 9. GH 30 (http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html), sendo que a família GH 1 possui o maior número de β-glicosidases já caracterizadas, e dessa forma a maior parte dos estudos já realizados se resume a pesquisas baseadas nessa família de enzimas.

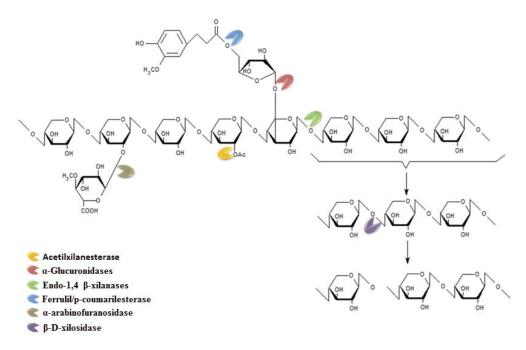
As famílias de GHs realizam a hidrólise de ligações glicosídicas através de dois mecanismos típicos: retenção ou inversão da quiralidade do carbono anomérico. Ambos os mecanismos dependem da mudança de configuração do oxigênio glicosídico durante a reação e ambos empregam um par de ácidos carboxílicos no sítio ativo para a hidrólise. No mecanismo de inversão, a reação ocorre de forma que uma molécula de água ataca o grupo de saída, enquanto que no mecanismo de retenção há o envolvimento de um deslocamento duplo com um intermediário enzima-glicosil (MCCARTER; WITHERS, 1994).

As BGs têm papel importante na indústria de alimentos e vêm sendo estudadas quanto à capacidade de liberar compostos fenólicos a partir de sua forma glicosilada em resíduos do processamento vegetal, que podem ser utilizados como antioxidantes, agentes flavorizantes, a exemplo da liberação do terpeno em vinhos (VATTEN; SHETTY, 2002; DAROIT, 2007).

Devido à sua estrutura heterogênea, a degradação das hemiceluloses requer um complexo enzimático que inclui além daquelas que atuam no polímero central de xilano, as que atuam nas cadeias laterais (RYABOVA et al., 2009). Segundo Wong et al., (1988) esse complexo é composto por: Endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) que hidrolisam as ligações β -1,4 da cadeia principal de resíduos de xilose; 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), que catalisam a hidrólise da xilobiose e de alguns 1,4- β -D-xilo-oligossacarídeos a partir da extremidade não redutora; α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), que

hidrolisam os grupos α -L-arabinofuranosil terminais; α -glucoronidases (EC 3.2.1.1), requeridas para a hidrólise das ligações α -1,2 glicosídicas entre xilose e acido glucurônico ou sua ligação 4-O-metil-éster; acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), hidrolisam as ligações entre xilose, acido acético e ácido ferúlico; p-coumárico esterases (EC 3.1.1-) que removem ácidos pirúvico e coumárico dos resíduos de arabinose das cadeias laterais (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da hemicelulose e da atuação das enzimas do sistema xilanolítico. Ac = Grupo acetil.



Fonte: Adaptado de (POLIZELI et al., 2005).

As feruloil esterases incluem ácido ferúlico esterases, cinnamoil esterases, ácido cinnamico hidrolases, p-coumaroil esterases e hidroxicinnamoil esterases (PAPINUTTI; FORCHIASSI, 2007; WONG, 2016). Feruloil esterases atuam de forma sinergística com xilanases na hidrólise das ligações éster ferúlico (FA) e ácido diferúlico de material da parede celular e, por conseguinte, desempenham um papel importante na degradação da biomassa vegetal. O FA liberado da parede celular da planta pela ação de FAEs é um antioxidante natural eficaz com potenciais aplicações nas indústrias

farmacêuticas e de alimentos. Outra aplicação seria no processamento de polpa e papel e como aditivos para a alimentação animal na assimilação de nutrientes (TOPAKAS et al., 2007).

As celulases e hemicelulases têm um papel fundamental na quebra das ligações cruzadas das estruturas polissacarídicas da perede celular e na degradação dos polissacarídeos neutros, como a celulose e hemicelulose, o que expõe mais facilmente a pectina para a atuação das pectinases. As pectinases por sua vez são um grupo complexo de enzimas que degradam várias substâncias pécticas, que se apresentam como polissacarídeos estruturais na lamela média e nas paredes celulares primárias de plantas jovens (GUMMADI; PANDA, 2003).

A classificação das pectinases se baseia em três critérios: o substrato preferencial de ação (pectina, ácido pectínico ou oligo-D-galacturonato), ação, transeliminação ou hidrólise e padrão de clivagem randômico ou terminal. As pectina esterases (EC 3.1.11.1) catalisam a desesterificação de grupos metoxil de galacturonato formando ácido pectínico. Polimetilgalacturonases (PMG) catalisam a clivagem hidrolítica de ligações α-1,4-glicosídicas e a ação pode ser endo (preferencial em pectinas altamente esterificadas) ou exo (em terminações não-redutoras da cadeia de pectina) (KASHYAP et al., 2001). Poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise de ligações α-1,4-glicosídicas em ácido pectínico. As endo-poligalacturonase hidrolisam as ligações glicosídicas α (1→4) internas, causando a despolimerização da molécula e liberando oligossacarídeos de ácido poligalacturônico, enquanto que as exopoligalacturonase removem as moléculas de ácido D-galacturônico pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) a partir da extremidade não redutora liberando ácidos di ou monogalacturônico (JAYANI et al., 2005).

A lignina é tida como o único recurso natural renovável usado para a síntese de produtos químicos aromáticos. Seu isolamento e transformação continuam atraindo cada vez mais atenção para o uso em processos biotecnológicos ou produção de calor e eletricidade (JINXING et al., 2013). As ligações éteres dominam a união entre as unidades da lignina, que apresenta um grande número de interligações. Esta resina amorfa atua como um "cimento" entre as fibrilas e como um agente enrijecedor no interior das fibras. A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela

existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose (SILVA et al; 2009). O destaque das enzimas lignocelulolíticas entre as oxirredutases é por sua atuação sobre os substratos acontecer de forma difusa, não-específica, por vezes indireta e orientada basicamente pelas diferenças entre os potenciais de oxidorredução dos substratos e enzimas, além de agirem via mediadores não proteicos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; POINTING, 2001). O sistema ligninolítico básico é formado pelas enzimas denominadas fenoloxidases, onde estão a tirosinase e a lacase (que oxida compostos fenólicos e reduz o oxigênio molecular da água), e as peroxidases. As peroxidases, por sua vez, são constituídas pela peroxidase dependente de manganês (MnP; EC 1.11.1.13) e pela lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14), que catalisam uma variedade de reações oxidativas que são dependentes de H₂O₂ (HATAKKA, 1994; HOFRICHTER, 2002, ARO et al., 2005). As lacases (benzenediol: oxigênio oxirredutase, EC 1.10.3.2) fazem parte de um grupo de enzimas com funções degradação e polimerização. Em fungos, participam, além da biodecomposição da lignina, de processos fisiológicos vegetativos e reprodutivos, como pigmentação do conidióforo e síntese de melanina para composição da parede das hifas. Essa enzima pode degradar lignina mesmo na ausência de outras ligninases, como a manganês peroxidase e a lignina peroxidase (MAYER; STAPLES, 2002). Fazem parte do grupo das enzimas cobre-oxidases (ou oxidases de cobre) e tem mecanismo de catálise fundamentado na redução do oxigênio molecular formando água, à custa de sucessivas oxidações mono-eletrônicas do substrato. O ciclo catalítico das lacases inicia-se com a ligação de um substrato redutor em T1, no sítio ativo da enzima. O cobre ligado a T1 extrai elétrons do substrato e os transfere para o domínio trinuclear T2/T3, que reduz o O₂ a H₂O, ao mesmo tempo em que libera o substrato oxidado. Os radicais formados deflagram reações não enzimáticas que envolvem quebras alquil-arílicas, polimerização de compostos fenólicos e anilinas, oxidações nos Cα e desmetilações (DURAN et al., 2002; BALDRIAN, 2010).

As peroxidases são um grupo de enzimas oxirredutases que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora de elétrons. Na degradação da lignina duas peroxidases são muito importantes:

A lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13. A lignina peroxidase (LiP) (E. C. 1.11.1.14) é uma enzima capaz de oxidar vários compostos aromáticos não fenólicos como o álcool benzílico (CONESSA et al., 2002). A LiP difere das demais peroxidases pelo fato de ter substratos aromáticos não fenólicos como preferenciais. Enquanto radicais fenoxilas são os primeiros produtos de oxidação de substratos fenólicos pelas peroxidases em geral, os cátions aromáticos são formados após a oxidação de anéis aromáticos não fenólicos como o álcool benzílico, por meio da remoção de um elétron, com subsequente formação de radicais catiônicos tipo aril, os quais são decompostos espontaneamente dando origem a uma variedade de produtos finais (HATAKKA, 1994). Uma vez que a lignina degradada pela lignina peroxidase fornece um substrato para a lacase, ambas as enzimas podem ser consideradas como "parceiras" em certas rotas da biotransformação (LEONOWICZ et al., 2001). A MnP atua exclusivamente como fenoloxidase em substratos fenólicos utilizando Mn^{2+/}Mn³⁺ como par redox intermediário. A enzima possui a capacidade de oxidar uma vasta gama de compostos de lignina aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Essa enzima é encontrada em fungos ligninolíticos, agindo conjuntamente com LiP e a lacase na biodegradação da lignina ou de compostos relacionados a ela (HAWARI et al., 2000). A força oxidativa do sistema de peroxidase de manganês pode ser consideravelmente melhorada na presença de co-oxidantes adicionais adequados, tais como tióis (LEONOWICZ et al., 2001).

As amilases (EC 3.2.1) são enzimas que hidrolisam as moléculas de amido e derivados de polissacarídeos em polímeros compostos por unidades de glicose (REDDY et al.; 2003; SAID; PIETRO, 2004). São de ocorrência ubíqua, produzidas por plantas, animais e microrganismos. No entanto, as fontes microbianas são as preferidas para a produção em larga escala. As amilases são classificadas a partir de seu modo de ação em duas categorias, endoamilases e exoamilases (GUPTA et al., 2003). Pertencente ao grupo das endoamilases, a α -amilase quebra as ligações glicosídicas α -(1,4) presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina aleatoriamente, sobre vários pontos da cadeia simultaneamente (SAID; PIETRO, 2004). Os produtos finais da hidrólise por α -amilase fúngica são principalmente maltose e maltotriose, sendo que na fase inicial de hidrólise, além da maltose e

maltotriose outros malto-oligossacarídeos de maiores GP são produzidos (SAHNOUN et al., 2012). Dessa forma a α-amilase fúngica também tem uma ação sacarificante sobre o amido (SOUZA et al., 1996).

As lipases (glicerol éster hidrolase E.C. 3.1.1.3) são enzimas da classe das hidrolases que atuam sobre ligações éster de acilgliceróis liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Normalmente são ativadas por uma interface água-óleo е apresentam quimioseletividade, regioseletividade e estereoseletividade (REINEHR et al., 2014). Além de catalisarem reações de hidrólise, também realizam reações de síntese em meios aquo-restritos como reações de esterificação e transesterificação (JAEGER; EGGERT, 2002). Lipases microbianas têm grande potencial para as aplicações comerciais, devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade para o substrato, e muitos ácidos não-naturais, álcoois ou aminas podem ser utilizados como o substrato (CARVALHO et al., 2005). O uso de resíduos agroindustriais para produção de lipases fúngicas em cultivos sólidos deve ser incentivado, sendo que as condições de processo podem ser aprimoradas, a fim de viabilizar a utilização das enzimas em aplicações industriais específicas para cada área (REINEHR et al., 2014).

Uma taxa de transferência de oxigênio adequada na fermentação deve ser mantida durante o crescimento e a produção enzimática. Durante essa fase, no entanto, é necessário pelo menos o nível de manutenção da taxa de absorção de oxigênio para o metabolismo energético e uma quantidade correspondente de oxigênio deve ser fornecida às células. Se a taxa de transferência de oxigênio for insuficiente ou se for menor que a razão de manutenção do oxigênio, a biossíntese de celulase cessa (RYU; MANDELS, 1980).

Fica claro, então, que o modo de ação de uma determinada enzima na superfície da celulose é definido por uma série de parâmetros: comprimento e estrutura do seu local ativo, a força de fixação das ligações dos polipeptídeos que formam o sítio ativo, a probabilidade de rotação livre dos segmentos de molécula de substrato polimérico dentro dos sítios ativos de diferentes subunidades para unidades monoméricas de polímero, localização de CBD (sítio catalítico do substrato) em relação ao CD (sítio catalítico da enzima) e sua afinidade pela superfície de celulose, comprimento e grau de elasticidade

conformacional do vinculador de interdomínio, a presença de outros domínios na estrutura enzimática, que pode formar agregados proteína-proteína na superfície da celulose. Devido ao caráter estritamente topoquímico do processo geral, os dados estruturais devem ser considerados no contexto de cinética heterogênea e termodinâmica, levando em consideração a evolução das interações enzima-substrato durante a hidrólise (RABINOVICH et al., 2002).

3.3. Substratos e cultivos sólidos

A utilização de matéria prima biológica como substrato físico para processos fermentativos vem sendo empregada há tempos, e sempre se levando em conta a preocupação com a depleção dos solos, a manutenção da vegetação nativa, a contaminação da água e a quantidade de resíduos gerados (TRIMBLE et al., 1984; KLASS, 1985; ZSUZSA, 1990). Lewis em 1976 relatou o uso de "culturas energéticas" em que os plantios eram executados visando não somente o consumo dos produtos colhidos, mas também dos resíduos produzidos e a partir disto, o uso dos mesmos, como fonte de energia (SONNINO, 1994).

Resíduos lignocelulósicos de madeira, grama, excedentes agrícolas, silvícolas e resíduos sólidos urbanos são particularmente abundantes e têm elevado potencial para bioconversão. A acumulação de grande quantidade de materiais lignocelulósicos em locais onde existem problemas para a eliminação dos mesmos é muito desvantajosa não só pela deterioração do meio ambiente, mas também pela perda de material potencialmente valioso que poderia ser usado na fabricação de papel, produção de combustível, compostagem, alimentação humana e animal, entre outros. Vários mercados inovadores que prevêem o uso destes materiais lignocelulósicos têm sido identificados recentemente (SÁNCHEZ, 2009).

Estes excedentes podem ser classificados em dois grupos principais: aqueles em que a lignocelulose é a principal fonte de carbono e aqueles em que, além da lignocelulose, existem concentrações significativas de carboidratos simples, como mono e dissacarídeos (VILLAS-BÔAS et al., 2002).

Apenas uma pequena quantidade de celulose, hemicelulose e lignina produzidas como subprodutos na agricultura ou na silvicultura é utilizada, sendo o restante considerado excedente. Muitos microrganismos são capazes de degradar e utilizar celulose e hemicelulose para assimilação do açúcar como fontes de carbono e energia. A celulose aparece na natureza associada a outros compostos das plantas e esta associação pode afetar a sua biodegradação. A celulose é um homopolímero constituído por monômeros de glicopiranose ligados entre si por ligações glicosídicas β-1,4. Esta conformação β permite que a celulose forme cadeias retas bem longas. Diversas destas cadeias dispostas paralelamente e interligadas por ligações de hidrogênio formam as microfibrilas que são muito resistentes. As fibras de celulose apresentam regiões cristalinas e amorfas, sendo que estas últimas são mais facilmente hidrolisáveis enzimaticamente (DA-SILVA et al., 1997).

A hemicelulose é um polissacarídeo de menor massa molecular do que a celulose. É formada por pentoses como D-xilose e L-arabinose, hexoses como D-manose, D-galactose, D-glicose, e açúcares ácidos como 4-O-metilglucurônico, D-galacturônico e D-glucurônicos. Os açúcares estão ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4- e às vezes por β -1,3.

A lignina por sua vez está ligada a ambos os polímeros de açúcares, formando um selo físico que caracteriza uma barreira impenetrável na parede celular da planta. Ela está presente na parede celular para dar suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos e estresse oxidativo. Consiste de um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e opticamente inativo, formado a partir de unidades de fenilpropano unidas por ligações C-C e aril-éter, sendo o aril-glicerol e o β-aril éter as estruturas predominantes. Esse polímero é sintetizado pela geração de radicais livres, que são liberados na desidrogenação mediada pela peroxidase de três álcoois propiônicos de fenil: álcool coniferílico (guaiacil propanol), álcool cumarílico (p-hidroxifenil propanol) e álcool sinapílico (siringil propanol) (EZEILO et al., 2017).

Muitos fatores, como o grau de polimerização, teor de lignina, a cristalinidade da celulose, teor de umidade e o tamanho das partículas, limitam a digestibilidade da hemicelulose e celulose presentes na biomassa lignocelulósica. Para resolver estes percalços a estratégia seria a remoção da

hemicelulose, pois isso aumentaria o tamanho dos poros do substrato alterando assim a estrutura de lignina e proporcionando às enzimas hidrolíticas uma melhor acessibilidade até a celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A degradação da lignina se dá no metabolismo microbiano secundário, geralmente ocorrendo na fase estacionária, quando o substrato foi completamente colonizado pelo microrganismo e as enzimas ligninolíticas já foram produzidas. Durante a fase de crescimento ativo, a hemicelulose e os compostos solúveis em água são utilizados como fontes de carbono. A fração de celulose geralmente não é usada como fonte de carbono durante a fase de crescimento ativo e seu conteúdo deve permanecer intacto para aumentar a digestibilidade da lignocelulose (MOYSON; VERACHTERT, 1991).

A capacidade de degradação de lignina por fungos é influenciada pela penetração de hifas no substrato e pela quantidade de contatos físicos formados entre o substrato e o fungo, que capacitam o micélio fúngico se ligar fisicamente à lignina. Em um cultivo submerso, esse contato seria interrompido, já que o sistema nesse tipo de cultivo necessita de constante agitação (KIRK et al., 1978; ROUCHES et al., 2015) fazendo com que a eficiência do processo degradativo fosse dimunuída. Ponto esse onde o cultivo sólido se sobresai, além do que, o cultivo sólido permite maiores cargas de matéria-prima, favorece a fixação de enzimas fúngicas ao substrato, bem como a difusão de oxigênio.

O cultivo em estado sólido é um método alternativo de cultura que vem ganhando atenção de pesquisadores ao longo dos últimos 20 anos e credibilidade entre muitas corporações industriais (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012). Trata-se de uma tecnologia limpa com grande potencial de aplicação na produção ou extração de compostos biologicamente ativos a partir de fontes naturais. Os resíduos agroindustriais reutilizados nesta área são de particular interesse devido a sua disponibilidade, baixo custo e características que permitem a obtenção de diferentes compostos, além de ser uma alternativa favorável ao meio ambiente (MARTINS et al., 2011).

O estabelecimento das relações entre a fisiologia dos microrganismos e os fatores físico-químicos é o alvo para o desenvolvimento de modelos apropriados. O sistema de cultivo sólido é influenciado pelo tipo de cepa e substrato utilizados, além de vários outros parâmetros do processo, incluindo a

composição de carbono e nutrientes, o teor de umidade, o tamanho das partículas, a temperatura de incubação, o pH e a densidade do inóculo. Entre os vários fatores, a umidade crítica e a natureza do substrato sólido são os fatores mais importantes capazes de afetar os processos. No caso de fungos, uma umidade de 40-60% é suficiente, mas a seleção de substrato depende de vários fatores, principalmente relacionados com custo e disponibilidade (SINGHANIA et al., 2009). Por cultivo em estado sólido, os microrganismos podem até crescer em substratos não pré-tratados, como farelo de trigo (BANSAL et al., 2014), palha de trigo (FERREIRA et al., 2016).

Outra característica biológica da cultura do estado sólido é a mudança na localização da atividade de algumas enzimas, em que as ações das mesmas passam a ser observadas no meio reacional e pouca atividade é observada na parede celular. Isso sugere que o destino de algumas enzimas é afetado pelas condições de cultura. A passagem de proteínas através da parede celular é um procedimento essencial para a sua detecção e fornece outra abordagem para a produção de proteínas homólogas e heterólogas (IWASHITA, 2002).

As propriedades reológicas do meio (particularmente a viscosidade) são influenciadas pela forma de crescimento fúngico. Quando os fungos dão origem a suspensões miceliais densas o meio é mais viscoso e, portanto, o oxigênio e outros elementos de resistência na transferência de massa podem tornar-se fatores limitantes (GIBBS et al., 2000). A capacidade de degradar lignocelulose eficientemente é geralmente associada com o crescimento micelial o qual permite ao fungo transportar para o substrato lignocelulósico, que constitui sua fonte de carbono, nutrientes escassos como nitrogênio e ferro, haja vista que a ausência desses nutrientes pode conduzir o fungo a respostas de estresse (DALY et al., 2015).

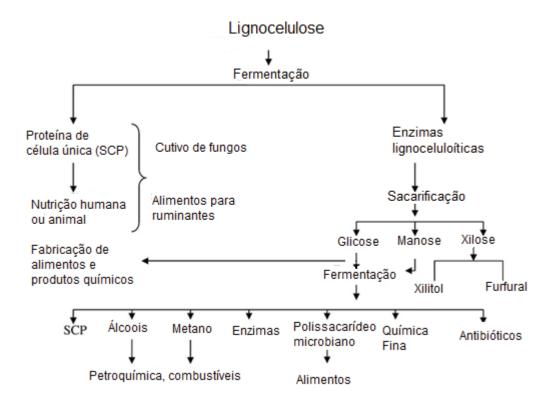
A estrutura recalcitrante da lignocelulose, que pode resultar em limitação de carbono ou inanição e, portanto no estresse nutricional, exige a descoberta de microrganismos com complexos enzimáticos super potentes ou a construção de tais microrganismos usando ferramentas genéticas (DALY et al., 2015; FERREIRA et al., 2016).

A capacidade dos fungos em degradar materiais lignocelulósicos é devido aos seus sistemas enzimáticos altamente especializados. Os fungos

possuem dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: o sistema hidrolítico, que produz hidrolases as quais são responsáveis pela degradação do polissacarídeo e um sistema ligninolítico oxidativo e extracelular exclusivo, que degrada lignina e abre os anéis de fenil (SÁNCHEZ, 2009). Em condições de cultivo a ativação da transcrição ou desrepressão por meio de nutrientes nas vias sensíveis também são necessárias para a indução total da resposta lignocelulolítica (HUBERMAN et al., 2016).

Os microrganismos celulolíticos podem estabelecer relações sinérgicas com espécies não celulolíticas em resíduos celulósicos; a interação se dá para completar a degradação da celulose que é convertida em glicose e esta em dioxido de carbono e água, quando em condições aeróbias, e em condições anaeróbias em dióxido de carbono, metano e água (GOYAL et al., 1991) (Figura 5).

Figura 5 - Produtos provenientes da ação de microrganismos em substratos lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de (GOYAL, et al., 1991).

É evidente na atualidade a necessidade de se encontrar fontes alternativas para obtenção de energia e produtos químicos, visando melhorar os processos que envolvem a utilização desses materiais lignocelulósicos, a fim de gerar mais produtos em biotecnologia a partir de menos consumo energético e barateamento de processos industriais. Com isso é possível direcionar o aproveitamento desses materiais vegetais através da sua conversão para produtos de valor agregado em um conceito de "biorrefinaria de resíduos" (FERREIRA et al., 2016).

Considerando o exposto e que as celulases executam múltiplas etapas até desconstruir a celulose, uma abordagem sistemática para investigar cada um desses passos elementares com medidas termodinâmicas, cinéticas, medições bioquímicas e simulações moleculares, produzirão os *insights* necessários para melhorar os modelos de desconstrução da celulose por coquetéis enzimáticos.

4. REFERÊNCIAS

- ANDRADE-LINARES, D. R.; VERESOGLOU, S. D.; RILLIG, M. C. Temperature priming and memory in soil filamentous fungi. **Fungal Ecology**, v. 21, p. 10–15, 2016.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÃ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases occurrence and properties. **FEMS Microbial Review**, v. 30, p. 215-242, 2010.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175–185, 2012.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Review in Biotechnology**, v. 22, p. 375-407, 2002.
- BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: **A reviewJournal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2017.
- CAGNON, B.; PY, X.; GUILLOT, A.; STOECKLI, F.; CHAMBAT, G. Contributions of hemicellulose, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 292–298, 2009.
- CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Quimica Nova**, v. 28, p. 614-621, 2005.
- CHUNDAWAT, S. P. S., BECKHAM, G.T., HIMMEL, M.E., DALE, B.E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering,** v. 2, n. 1, p. 121–145, 2011.
- CONESSA, A.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. **Journal Biotechnology**, v. 93, p. 143 158, 2002.
- DAROIT, J. D. Caracterização de uma Beta-Glicosidase de *Monascus* purpureus, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 137, 2007.
- DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulase, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Bol. SBCYA**, n. 31, p. 249–260, 1997.

- DALY, P.; VAN MUNSTER, J. M.; RAULO, R.; ARCHER, D. B. Transcriptional regulation and responses in filamentous fungi exposed to lignocellulose transcriptional regulation and responses in filamentous fungi exposed to lignocellulose. v. 1, p. 82–127, 2015.
- DE OLIVEIRA, B. T.; GOMES, E.; RODRIGUES, A. Thermophilic fungi in the new age of fungal taxonomy. **Extremophiles**, p. 31–37, 2015.
- DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907-931, 2002.
- ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. **Caxias do Sul: Educs**, p. 510, 2004.
- ESTERBAUER, H. et al. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 51–65, 1 jan. 1991.
- EZEILO, U. R.; ZAKARIA, I. I.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monooxygenases. **Biotechnology and Biotechnological Equipment,** v. 31, p. 647-662, 2017.
- FERREIRA, J.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334–345, 2016.
- FLITSCH, A; PRASETYO, E. N.; SYGMUND, C.; LUDWIG, R.; NYANHONGO, G. S; GUEBITZA, G. M. Cellulose oxidation and bleaching processes based on recombinant *Myriococcum thermophilum* cellobiose dehydrogenase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 60–67, 2013.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic Materials. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 70-78, 2012.
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 29 jan. 2000.
- GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; DA-SILVA, R. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.
- GOMES, E.; SOUZA, A. R.; ORJUELA, G. L.; DA SILVA, R.; OLIVEIRA, T. B.; RODRIGUES, A. Applications and benefits of thermophilic microorganisms and their enzymes for industrial biotechnology. Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications. **Fungal Biology**. p. 459–492, 2016.
- GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 37–50, 1 jan. 1991.
- GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of

- microbial pectinases a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987–996, 2003.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry,** v. 32, p. 1-18, 2003.
- HARRIS, S. D.; KRAUS, P. R. Regulation of septum formation in *Aspergillus nidulans* by a DNA damage checkpoint pathway. **Genetics**, v. 148, n. 3, p. 1055–1067, 1998.
- HATAKKA, A. Lignin modifying enzyme from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, p. 125–135, 1994.
- HAWARI, J.; BEAUDET, S.; HALASZ, A.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G. Microbial degradation versus mineralization. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.54, p. 605-618, 2000.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 2009.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbiology Technology**, v. 30, p. 454 466, 2002.
- HOUBRAKEN, J., SPIERENBURG, H.; FRISVAD, J. C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 403–421, 2012.
- HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p. 1-51, cap. 4, 2014.
- HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. Extremozymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, p. 39-46, 1999.
- HUBERMAN, L. B.; LIU, J., QIN, L., GLASS, N. L. Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 101–111, 2016.
- IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 530–5, 2002.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931- 2944, 2005.
- JINXING, L.; LI, XUEHUI, L.; GUO, B.; WANG, L.; ZANG, N. Catalytic delignification of sugarcane bagasse in the presence of acidic ionic

- liquids. Catalyses Today, Amsterdan, v. 200, p. 99-105, 2013.
- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215–227, 2001.
- KIRK, T. K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W. J.; LORENZ, L. F.; ZEIKUS, J. G. Influence of culture parameters on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of microbiology**, v. 117, p. 227–285, 1978.
- KLASS, D. L. Energy from biomass and wastes: a review and 1983 update. **Resources and Conservation**, v. 11, p. 157-239, 1985.
- LANGARICA-FUENTES, A.; HOULDEN, A.; ROBSON, G. D.; FOX, G. An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. **Fungal Ecology**, v. 11, n. 0, p. 132–144, 2014.
- LEONOWICZ, A., CHO, N. S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: Properties and activity on lignin.

 Journal of Basic Microbiology, v. 41, n. 3–4, p. 185–227, 2001.
- LEWIS, C. W. Biomass-energy outlay versus energy returns: a critical appraisal. **Energy**, v. 2, p. 241-248, 1977.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN Z. Y. L. W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.
- MCCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, p. 885–892, 1994.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock.** 12^a Edição. 2010.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461–488, 2000.
- MARTINS, S.; MUSSATTO, S.I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.
- MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**; v. 60, p. 551-65, 2002.
- MORETTI, M. M. S. Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de canadeaçúcar em açúcares fermentescíveis. 2010. 112f. **Dissertação (Mestrado)**

- Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista
 Júlio de Mesquita Filholl, Rio Claro, 2010.
- MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.; ISHMAEL, N.; DARMOND, C.; MARQUETEAU, S.; MOISAN, M. C.; QUENNEVILLE, G.; TSANG, A. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, p.489-502, 2012.
- MOUCHACCA, J. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. **Crypt Mycology**, v.18, p. 19–69, 2000.
- MOYSON, E.; VERACHTERT, H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 421–424, 1991.
- NIELSEN, J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms **Trends** in **Biotechnology** Elsevier Current Trends, v. 14, p. 438-443, 1996.
- NORVELL, L. L. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new C. **Mycotaxon**, v. 116, p. 481–490, 2011.
- PAL, S.; BANIK, S. P.; GHORAI, S.; CHOWDHURY, S.; KHOWALA, S. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β-glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2412–2420, 2010.
- POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20 33, 2001.
- POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.
- POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 37–44, 2013.
- RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry**. v. 67, n. 8, p. 850–71, 2002.
- REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, A.; SAMBASIVA RAO, K. R. S. An overview of the microbial α -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 645-648, 2003.
- REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. **Quimica Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.
- ROGALINSKI, T.; INGRAN, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **Journal of**

- **Supercritical Fluids**, v. 47, p. 54–63, 2008.
- ROUCHES, E.; ZHOUB, S.; STEYERA, J. P; CARRERE, H. White-Rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1784–1792, 2015.
- RYABOVA, O.; VRSANSKA, M.; KANEKO, S.; VAN ZYL, W. H.; BIELY, P. A novel family of hemicellulolytic a-glucuronidase. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1457–1462, 2009.
- RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 2, p. 91–102, 1980.
- SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M. A.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two α-amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 18–25, 2012.
- SAID, S; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. **Editora Legis Summa**, p. 416, 2004.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, 2009.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.
- SOUZA, E. L.; HOFFMANN, E. H. E.; CASTILHO, V. M.; LIMA, V. A.; BELLINI, M. Z.; CRUZ, V. D.; CRUZ, R. Produção e caracterização de α-amilase produzida por *Rhizopus sp.* In: **Arq. Biol. Tecnol**, v 39, p. 831-839, 1996
- SONNINO, A. Agricultural biomass production Is an energy option for the future. **Renewable Energy**, v. 5, p. 857–865, 1994.
- STOLK, A. C.; SAMSON, R. A. The genus *Talaromyces*. Studies on *Talaromyces* and related genera II. **Stud Mycology**, v. 2, p.1–67, 1972.
- TOPAKAS, E.; VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 497–509, 2007.
- TRIMBLE, J. L.; HOOK, R. I. VAN; FOLGER, A. G. Biomass for energy: the environmental issues. **Biomass and Bioenergy**, v. 6, n. 2387, p. 3–13, 1984.
- VAN DEN BRINK, J. et al. Efficient plant biomass degradation by thermophilic

- fungus *Myceliophthora heterothallica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1316–1324, 2013.
- VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. **Food Biotechnology,** 16, no. 3, p. 189-210, 2002.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; ALEXANDER, D. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 98, p. 1–12, 2002.
- YILMAZ, N.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 175–341, 2014.
- YOON, S. Y.; HAN, S. H.; SHIN, S. J. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. **Energy**, v. 77, p. 19–24, 2014.
- WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1119–1139, 2012.
- WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic Systems in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 609–632, 2010.
- WONG, K. K.; TAN, L. U.; et al. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiology Review**, v. 52, p. 305-317, 1988.
- WONG, P.; SRITIPPAYAWANB, S.; SUWANNAKHONC, N.; TAPPROM A, DEOISARES, R.; SANGUANSERMS, T. Q-Sepharose micro-column chromatography: A simple screening method for identifying beta thalassemia traits and hemoglobin E carriers. **Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 16–17, p. 1288–1291, 2016.
- ZSUZSA, P. Possibilities for utilization of the energy content of the solid wastes of settlements. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 4, p. 173–180, 1990.

CAPITULO II:

Avaliação das condições físico químicas de cultivo do fungo Rasamsonia emersonii S10 e perfil de secreção de enzimas celulolíticas

Resumo: O fungo Rasamsonia emersonii S10, recentemente isolado, apresenta perfil termofílico pouco comum, com crescimento em temperaturas ao redor de 60 °C. Esse fungo foi cultivado em substrato sólido composto por uma mistura de palha de milho, farelo de soja e farelo de trigo (1:1:1) e a produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas foram estudadas através da dosagem das enzimas de interesse. Endoglucanase, exoglucanase, βglicosidase e β-xilosidase apresentaram as maiores atividades entre as enzimas testadas, com 50 u/g, 320 u/g, 80 u/g e 60 u/g respectivamente. Além disso, foi detectada produção de avicelase (1,4 u/g), amilase (1,6 u/g) e protease (660 UAP). Com esse experimento contatou-se o grande potencial de produção de enzimas extracelulares por esse fungo, tanto as do complexo ligno-hemi-celulolíticos, quanto amilolítico e proteolítico. Para continuidade do trabalho, foram selecionadas as enzimas β -glicosidase e β -xilosidase, com cultivo do fungo em farelo de trigo e palha de milho, respectivamente, sendo que a produção das enzimas a partir do extrato bruto após seis dias de fermentação foi de 56 u/g para a β-glicosidase e 13 u/g para a β-xilosidase. A caracterização da β-glicosidase mostrou pH ótimo de 4 e temperatura ótima de 65 °C, já nos ensaios de estabilidade em ausência de substrato, a faixa de pH situou-se entre 4,5 e 5,5 e a de temperatura entre 50 e 65 °C.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são um grupo de microrganismos de grande importância dentro do contexto da biodegradação de biomassa, pois são os principais produtores de enzimas extracelulares envolvidas nesse processo (BALDRIAN; VALASKOVÀ, 2008; SÁNCHEZ, 2009). Estes microrganismos apresentam grande capacidade adaptativa, colonizando diferentes ambientes, com variações de temperatura, umidade, pH, pressão osmótica, além de poderem utilizar grande variedade de fontes de carbono e outros nutrientes (LANGARICA-FUENTES et al., 2014). No entanto, sabe-se que o tipo do solo também influencia a estrutura das comunidades dos fungos e outros microrganismos ali presentes em razão do tamanho das partículas, pH,

capacidade de troca de íons e da disponíbilização de matéria orgânica (GARBEVA et al., 2004).

Um dos principais fatores de adaptação dos fungos para utilização de diferentes fontes de carbono é sua capacidade de secretar enzimas despolimerizantes que atuam sobre a biomassa disponibilizando compostos de carbono assimiláveis (GOMES et al., 2007).

A produção de enzimas a partir de cultivos em estado sólido por fungos filamentosos é bastante vantajosa devido ao fato de o processo simular o habitat natural dos microrganismos. Entretanto, as condições de temperatura, pH, atividade de água e tempo de cultivo influenciam no processo e precisam ser conhecidas para cada fungo e substrato (BALDRIAN; VALASKOVÀ, 2008; SÁNCHEZ, 2009).

Desse modo, nesta estapa do trabalho estudaram-se as condições físicoquímicas de cultivo do fungo como pH, temperatura e umidade, e características nutricionais, avaliando efeitos de diferentes substratos lignocelulósicos e fontes de macronutrientes e avaliou-se perfil de secreção de celulases, hemicelulases, ligninases, amilases, peroxidases.

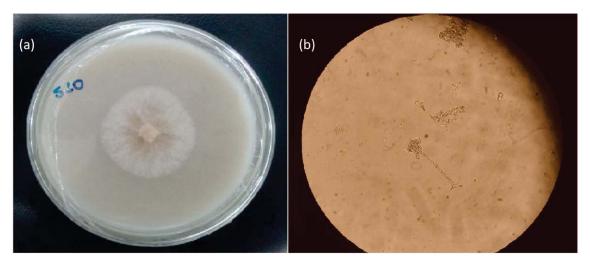
2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Foi utilizado no trabalho o fungo da linhagem *Rasamsonia emersonii* S10 (Figura 6) isolado de amostras de solo, Chácara Jataí, Adolfo – SP (ROSA, 2014) e agora pertencente à coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE/UNESP - Campus de São José do Rio Preto. Esse fungo foi identificado pela equipe do Prof. Dr. André Rodrigues/IB/UNESP Rio Claro e apresentou 100% de similaridade com *R. emersonii* CBS 355.92 (JF417465).

A cultura utilizada tem sido mantida por repiques sucessivos em meio Sabouraud (Himedia) e Malte 2% e sob óleo mineral, água e criopreservadas em glicerol 20% (Dinâmica) (- 80 °C).

Figura 6 - Representação do fungo *R. emersonii* S10: (a) em placa de Petri cultivado em meio de aveia e (b) por micrografia de esporângio e esporos em microscópio fotômico binocular (LeicalCC 50) – 40x.



Fonte: Autoria Própria

2.2. Substratos e meios para o cultivo em estado sólido

O fungo termofílico *R. emersonii* S10 foi cultivado em estado sólido, conforme definido em trabalho anterior (ROSA, 2014). Os substratos (adquiridos em lojas especializadas em produtos agrícolas e o bagaço de cana cedido pela Usina Açucareira Virgulino Oliveira S/A – unidade de José Bonifácio) utilizados para a fermentação foram: farelo de soja (FS), farelo de trigo (FT), palha de milho (PM), bagaço de cana (BC). Os materiais foram lavados e secos a 45 °C até massa constante, moídos e peneirados em granulometria de aproximadamente 1,0 mm. Os materiais foram autoclavados a 120 °C, por 30 minutos. Amostras de 5,0 g desses substratos receberam 20 mL de solução nutriente (proporcionando umidade inicial de cerca de 80%) composta por (g/L): (NH₄)₂SO₄ (3,5); KH₂PO₄ (3,0); MgSO₄. 7 H₂O (0,5); CaCl₂ (0,5), Tween 80 (10,0), sendo o pH ajustado para 5,0 com soluções de NaOH (1 M) e HCl (1 M) sendo por fim autoclavados durante 20 minutos.

2.3. Pré-inóculos para os cultivos em estado sólido

Para cada cultivo sólido foi feito um pré-inóculo em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio nutriente sólido inclinado (Sabouraud). O fungo foi inoculado na superfície deste meio, por estrias, e incubado a 60 °C até completo crescimento micelial. Após este período o microrganismo foi suspendido com auxílio de alça de inoculação em 150 mL da solução nutriente estéril. Por se tratar de um fungo não formador de esporos livres, um volume dessa suspensão equivalente a 5 mg.g⁻¹ de substrato foi utilizado como inóculo para cada recipiente de fermentação.

2.4. Produção das enzimas por cultivo em estado sólido

Os cultivos foram conduzidos em embalagens de polipropileno (12 x 20 cm), utilizando-se 5 g de substratos. Nos cultivos para a avaliação da influência do tempo sobre a produção das enzimas, amostras foram tomadas a cada 24 h retirando-se uma embalagem de fermentação por amostragem, por até 336 h. A cada amostra foram adicionados 100 mL de água deionizada, sendo a mistura homogeneizada manualmente e mantida sob agitação em shaker (100 rpm) por 30 minutos. Após este período, o material foi filtrado em disco de tecido nylon, centrifugado a 10000 xg por 15 min, a 5 °C, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas imediatamente após serem obtidos. Os sobrenadantes remanescentes foram identificados e congelados a -4 °C.

2.5. Determinação das atividades enzimáticas

2.5.1. Xilanase (EC 3.2.1.8)

A atividade de xilanase foi determinada em mistura de reação contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato xilana Birchwood (Sigma X0502) (10,0 g/L), em tampão acetato 0,10 M, pH 5,0. A reação foi mantida a 60 °C por 10 minutos e então interrompida pela adição de

1,0 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir de uma curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

2.5.2. Atividade em papel de filtro (FPase)(EC 3.2.1.91)

A atividade de celulase em papel de filtro (FPase) foi avaliada como proposto por Ghose (1987) em mistura de reação composta por 1,0 mL de tampão acetato 0,05 mol/L, pH 4,8, uma fita de papel de filtro Whatman N °1 de 1 x 6,0 cm e 0,5 mL de extrato enzimático. Após uma hora de reação, a 60 °C, a mesma foi paralisada em banho de gelo e a quantidade de açúcares redutores liberados foi dosada pelo método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto de reação, com base em curva analítica de glicose. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 540 nm.

2.5.3. Endoglucanase (EC 3.2.1.4)

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de xilanase (item 2.5.1), porém utilizando-se carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g/L) como substrato e curva padrão de glicose e incubada a 60 °C. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto de reação. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 540 nm.

2.5.4. β-glicosidase (EC 3.2.1.21)

A atividade de β-glicosidase foi determinada em tubos de ensaio e em microplacas. Para a determinação da atividade em tubos, 0,05 mL do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 0,25 mL de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 0,25 mL de 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (4 mM) – pNPG, Sigma-Aldrich, adaptado do descrito por Coston e Loomis, (1969). A reação foi a princípio mantida a 60 °C por 10 minutos, e então, interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2 M). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de nitrofenol por minuto de reação.

Em microplacas, a atividade de β -glicosidase foi determinada como descrito por (SANTOS et al., 2016). O processo foi realizado 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 de enzima. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

As placas foram incubadas em MJ Rearch PTC200 *Thermal Cycler* (BioRad) na temperatura inicial de 70 °C, por 15 min, seguida de resfriamento imediato a 4 °C. A reação foi paralisada após adição de 100 µL de solução de Na₂CO₃ (1 M). A absorbância foi medida a 410 nm usando leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS para quantificação do nitrofenol liberado. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de açúcar requerida para gerar 1,0 µmol de nitrofenol por minuto nas condições de ensaio. A reação controle foi conduzida nas mesmas condições.

2.5.5. β-xilosidase (EC 3.2.1.37)

A atividade de β -xilosidase foi avaliada por procedimento idêntico ao descrito (em tubos) para β -glicosidase, exceto pela substituição do substrato pelo 4-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma-Aldrich).

2.5.6. Avicelase (EC 3.2.1.91)

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consistiu na adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto em 0,9 mL de solução 1% de celulose microcristalina – avicel tendo sido diluído 1,0 mL em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0 e incubado a 60 °C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Miller (1959). Antes de ser realizada a leitura (540 nm) no espectrofotômetro, a reação foi mantida em repouso pelo tempo de 20 minutos para que pudesse ocorrer a precipitação do substrato, impedindo que a turbidez do mesmo interferisse na leitura.

2.5.7. Determinação da atividade de amilase (EC 3.2.1.1)

Para a determinação de amilases, 250 μ L de uma solução contendo 1% de amido em tampão fosfato NaH₂PO₄ 0,5 M e pH 7,0 foram adicionados a 250 μ L de amostra. A mistura foi incubada por 60 minutos a 60 °C. Os açúcares redutores foram determinados pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS). A leitura foi realizada em 540 nm usando-se glicose como padrão (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 0,1 μ moles/min de açúcares redutores de acordo com as condições do método.

2.5.8. Determinação de atividade proteolítica (EC 3.4)

A atividade de protease foi determinada pela técnica da Azocaseína proposta por Leighton et al., (1973). Em 250 μL de uma solução 1% de azocaseína em tampão fosfato pH 8,0 (0,2 M) foi adicionado 150 μL de extrato enzimático, incubando-se a 60 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada com 1,0 mL de ácido tricloroacético a 10%. Após centrifugação da amostra a 10.000

rpm por 10 minutos, foi adicionado 1,4 mL de uma solução de NaOH (0,1 M) a 1,2 mL de sobrenadante obtido. A leitura foi realizada em 440 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produz a alteração em uma unidade de leitura de absorbância por minuto de acordo com as condições do método.

2.5.9. Determinação da atividade de lacase (EC 1.10.3.2)

A atividade de lacase foi determinada por método espectrofotométrico indireto utilizando-se 2,2'-azino-bis etilbentiazolina (ABTS) em mistura de reação de 1,0 mL contendo 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0); 0,1 mL de ABTS 1 M (em água) e 0,6 mL da fonte enzimática. A mistura de reação foi incubada por 5 minutos a 60 °C e a oxidação do ABTS foi medida pelo aumento da absorbância a 420 nm (BUSWELL et al., 1995). O branco foi composto por todos os componentes da mistura de reação substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação. Uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 µmol de ABST por minuto (ϵ_{420} = 3,6 x 10⁴ mol⁻¹ L⁻¹ cm⁻¹) por mg de proteína.

2.5.10. Determinação da atividade de manganês peroxidase (EC 1.11.1.13)

A atividade de manganês peroxidase foi medida utilizando-se o vermelho de fenol (1g. L^{-1}) como substrato ($\epsilon_{4.460} = \text{mol}^{-1}$. $L.\text{cm}^{-1}$) (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação foi de 1,0 mL contendo 0,5 mL do extrato enzimático, 0,1 mL de solução de vermelho de fenol (1,0 g. L^{-1}), 0,1 mL de lactato de sódio pH 4,5 (250 mM), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 0,05 mL de sulfato de manganês (2 mM) e 0,05 mL de H_2O_2 (2 mM) em tampão succinato de sódio (20 mM), pH 4,5. A solução resultante foi incubada por 15 minutos a 60 °C e a reação interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH (2

M). A absorbância foi medida a 610 nm contra um branco feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação. Uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 μmol de vermelho de fenol por minuto por mg de proteína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise quantitativa das enzimas liberadas pelo fungo Rasamsonia emersonii S10 em cultivo em estado sólido.

O propósito deste *screening* enzimático foi a determinação das atividades de enzimas despolimerizantes de material vegetal secretadas pelo microrganismo. Foram detectadas atividades de xilanase, CMCase, avicelase, β-glicosidase, β-xilosidase, lacase, Mn-peroxidase, amilase e protease nas soluções enzimáticas brutas obtidas a partir do substrato fermentado (Figura 7).

Após 10 dias de cultivo (Figura 7 a, b, c) observou-se que as atividades de xilanase, CMCase, avicelase, amilase, β-glicosidase, β-xilosidase se destacaram dentre todas as enzimas avaliadas. É importante ressaltar que nesse experimento não se levou em conta as condições ideais de cultivo para a produção de cada enzima, além de não se ter também determinadas, as condições reacionais que levariam a maiores atividades. Com esse experimento constatou-se o grande potencial de produção de enzimas extracelulares por esse fungo, tanto as do complexo ligno-hemi-celulolíticos, quanto pectinolítico, amilolítico e proteolítico.

Cabe destacar que a alta atividade de protease detectada no meio de cultura pode ser um fator diminuição das atividades das enzimas, decorrente da proteólise no meio fermentativo.

Com base nos dados acima, para a continuidade do trabalho foram escolhidas as enzimas β -glicosidase e β -xilosidase, em função dos valores de atividade detectados. As enzimas xilanase e CMCase foram estudadas em projetos paralelos (CHIEROTTI, 2016; ZANONI, 2017).

3.2. Efeito do tipo de substrato fermentativo sobre produção das enzimas β-glicosidase e β-xilosidase pelo fungo *Rasamsonia* emersonii S10

Na Figura 8 observa-se a produção de β -glicosidase e β -xilosidase pelo fungo quando cultivado em diversos substratos lignocelulósicos como farelo de soja (FS), bagaço de cana (BC), palha de milho (PM) e farelo de trigo (FT). Na Figura 8 (a) ficou evidente a maior produção de β -glicosidase em meio de farelo de trigo enquanto a β -xilosidase (Figura 8 b), foi produzida em maior quantidade em meio com palha de milho. O tempo de cultivo em que as maiores atividades de ambas as enzimas foram determinados foi de seis dias.

Alguns testes preliminares que foram realizados com cultivos em misturas de substratos (1:1:1), como o mostrado no item 3.1, tiveram por algumas vezes resultados (dados não apresentados neste trabalho) melhores que os encontrados quando do uso de um único substrato, porém a coloração do extrato e a quantidade de outras proteínas presentes no caldo eram elevadas, o que se mostrou desvantajoso para um processo de purificação, que é um dos objetivos do trabalho. Embora a indução transcricional direta dos genes das enzimas seja controlada por diferentes mecanismos, a repressão catabólica de carbono (CCR) exercida pela glicose presente no meio pode ser diferente dependendo do tipo do substrato e da quantidade desse açúcar disponível (HUBERMAN et al., 2016).

Figura 7 - Análise quantitativa de produção de enzimas pelo fungo R. *emersonii* S10 a partir de cultivos em substratos sólidos. As amostras foram tomadas no 4° e 10° dias de experimento. (a) CMCase, xilanase, FPase; (b) Avicelase, pectinase, amilase; (c) β-glicosidase, β-xilosidase, Mn peroxidase, lacase; (d) Protease.

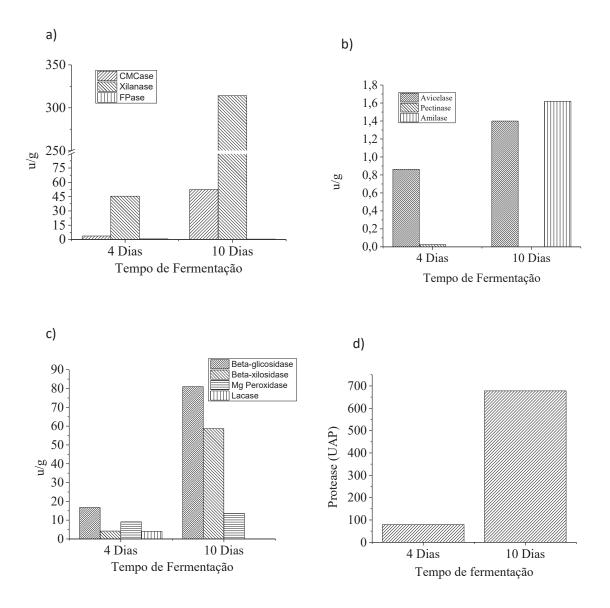
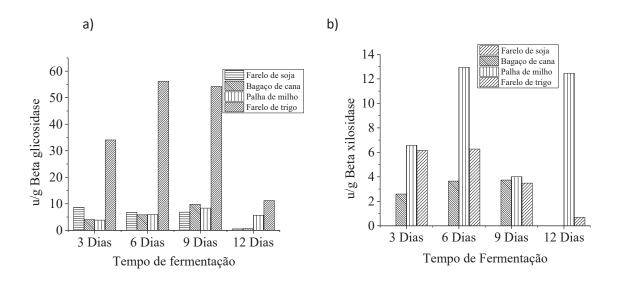


Figura 8 - Produção das enzimas pelo fungo *R. emersonii* S10 cultivado em 4 diferentes substratos lignocelulósicos.



3.3. Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades da enzima β-glicosidase no extrato enzimático bruto.

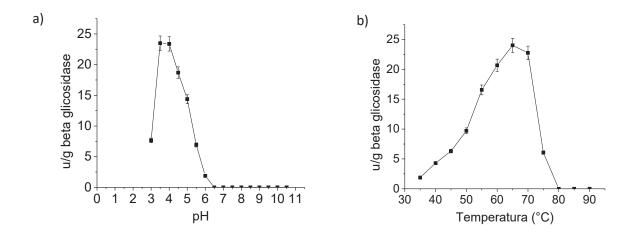
Os ensaios para avaliação dos efeitos do pH do meio reacional sobre a atividade β -glicosidase foram conduzidos à temperatura de 60 °C. O extrato enzimático do fungo *Rasamsonia emersonii* S10 apresentou ótima atividade em pH 3,5. Na literatura são mostrados pHs ótimos de atividade entre 4,0 e 5,0 para a maioria das β -glicosidases fúngicas (GAO et al., 2014; LEITE et al., 2007).

O ensaio para avaliação do efeito da temperatura (Figura 9 b) de reação sobre a atividade da β-glicosidase em extrato bruto foi realizado no pH indicado como melhor para a atividade da enzima, conforme dados da figura 9 a.

O fungo *R. emersonii* S10 mostrou um perfil tipicamente termofílico com atividades máximas entre 65 e 70 °C, acima dos valores relatados na literatura como o do fungo termotolerante *Aspergilus fumigatus* (ANG et al., 2013) e do termofílico *Thermomyces lanuginosus* CBS (LI et al., 2005) *Thermoascus aurantiacus* (KALOGERIS et al., 2003). Esse perfil mostra-se muito interessante quando se buscam enzimas para aplicação em sacarificação de

material lignocelulóssico em condições não assépticas e sujeitas a variações de temperatura e pH.

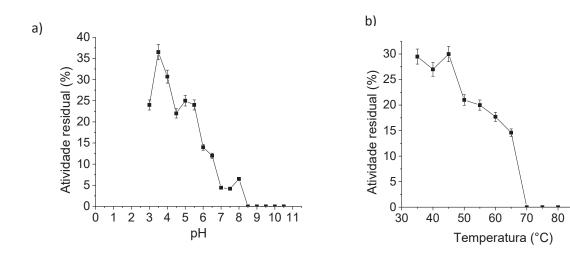
Figura 9 - Efeito da variação de (a) pH e (b) temperatura de incubação na atividade relativa da β-glicosidase em solução enzimática bruta.



3.4. Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade da enzima β -glicosidase quando em ausência de substrato.

Ensaios para avaliação da estabilidade enzimática quando são mantidas em variadas condições de pH e temperatura, em ausência do substrato, foram realizados visando demonstrar a estabilidade dessas proteínas em condições de estocagem. A porcentagem de atividade residual foi calculada tomando-se como 100% o valor da atividade enzimática no tempo zero de incubação. A figura 10 (a) e (b) mostra a preservação da atividade enzimática após 24 horas de incubação em diferentes valores de pH e temperatura, respectivamente. A enzima β-glicosidase do *R. emersonii* S10 em extrato bruto apresentou apenas 25% de atividade residual entre os pHs 4,5 e 5,5, que foi onde ocorreu a maior faixa de estabilidade (Figura 10 a).

Figura 10 - Estabilidade da β-glicosidase produzida pelo fungo do *R. emersonii* S10 em função do (a) pH do meio, após 24 horas de incubação e em função da (b) temperatura, após 1 hora de incubação em ausência de substrato.



Os perfis de estabilidade da enzima β -glicosidase em função da temperatura de incubação, em ausência do substrato, foram determinados a partir de diluições das alíquotas do extrato bruto em tampão cujo pH foi aquele em que a enzima obteve desempenho ótimo, conforme dados da figura 9 (a). A β -glicosidase do fungo, em extrato bruto, apresentou-se mais estável na faixa entre 50 e 65 °C, embora restando menos de 25% da atividade enzimática (Figura 10 b).

A termoestabilidade enzimática tem sido bastante explorada, visto o interesse em enzimas estáveis para sistemas aquecidos em processos industriais. Enzimas de fungos mesofílicos como de *Penicillium piceum* mantiveram 80% de sua atividade a 50 °C (GAO et al., 2014) e de *P. citrinium* a 60 °C (NG et al., 2010). Por outro lado, celulases de *T. aurantiacus* se mostraram estáveis na faixa de temperatura de 50 a 70 °C (GOMES et al., 1994).

4. CONCLUSÃO

O fungo termofílico *R. emersonii* S10 foi isolado a 55 °C e mostrou-se capaz de produzir celulases e xilanases em quantidades consideráveis, por meio de cultivo sólido nessa temperatura. Com os resultados obtidos,

observou-se claramente a relação entre a termofilia do fungo e a termoestabilidade da enzima produzida. Cabe ressaltar que a atividade de algumas enzimas do extrato bruto, apresentadas neste trabalho, caso da endoglucanase, por exemplo, foi maior que na maioria dos trabalhos apresentados na literatura científica.

5. REFERÊNCIAS

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y., SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, p. 1-10, 2013.

BALDRIAN, P.; VALASKOVÀ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Review**, v. 32, p. 501–521, 2008.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) edodes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 128, n. 15, p. 81-87, 1995.

CHIEROTTI, M. C. M. Caracterização de uma endoglucanase termoestável do fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* S10. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto, 2016.

COSTON, M. B.; LOOMIS, W. F. Isozymes of beta-glucosidase in *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Bacteriology**, v. 100, n. 3, p. 1208–1217, 1969.

GAO, L.; GAO, F.; JIANG, X.; ZHANG, C.; ZHANG, D.; WANG, L.; WU, G.; CHEN, S. Biochemical characterization of a new β -glucosidase (Cel3E) from *Penicillium piceum* and its application in boosting lignocelluloses bioconversion and forming disaccharide inducers: New insights into the role of β -glucosidase. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 768-774, 2014.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.; VAN ELSAS, J. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

- GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTINS, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quimica. Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.
- HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de Química Fisiológica**, 5 ed., p. 736, 1982.
- HUBERMAN, L. B.; LIU, J.; QIN, L.; GLASS, N. L. Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi. **Fungal Biology Reviews,** v. 30, n. 3, p. 101–111, 2016.
- ROSA, I. Z. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto, 2014.
- SANTOS, C. A.; ZANPHORLIN, L. M.; CRUCELLO, A.; TONOLI, C. C. C.; RULLER, R.; HORTA, M. A. C.; MURAKAMI, M. T.; SOUZA, A. P. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgI, a GH1 β -glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 71, 2016.
- KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.
- LANGARICA-FUENTES, A.; HOULDEN, A.; ROBSON, G. D.; FOX, G. An investigation of the biodiversity of thermophilic and thermotolerant fungal species in composts using culture-based and molecular techniques. **Fungal Ecology**, v. 11, n. 0, p. 132–144, 2014.
- LEHNINGER, A. L. Bioquímica. São Paulo Editora Edgard Blüncher, v.1, 1997.
- LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; E 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.

- LEITE, R. S.; 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, p. 1101-1106, 2007.
- LI, X. T.; JIANG; Z. Q., LI, L. T.; YANG, S. Q.; FENG, W. Y.; FAN, J. Y.; KUSAKABE, I. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. **Bioresource Technology**, v. 96., p. 1370-1379, 2005.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6 Ed. São Paulo: **Art Med**, 2014.
- NG, I.; LI, C.; CHAN, S.; CHIR, J.; CHEN, P.T.; TONG, C.; YU, S.; HO, T. D. Highlevel production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1310-1317, 2010.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.
- SETHURAMAN, A.; AKIN, D. E.; ERIKSON, K. E. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 27, p. 37-47, 1998.
- ZANONI, J. A. Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em estado sólido. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto, 2017.

CAPÍTULO III:

Purificação, caracterização bioquímica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos da β-glicosidase de *Rasamsonia emersonii* S10

Resumo: A solução enzimática bruta foi obtida pelo cultivo do fungo R. emersoni S10 em farelo de trigo e palha de milho. A purificação da proteína foi realizada em coluna cromatográfica de troca aniônica Resource Q (6 mL). O processo levou a um fator de purificação de 11 e rendimento de 96% para a β-glicosidase. Os dados bioquímicos revelaram que a enzima pura apresentou maior atividade em pH 3,5 e à temperatura de 70 °C. Os perfis de estabilidade, quando em ausência de substrato, demonstraram que a enzima é estável em ampla faixa de pH, entre 5 a 8,5 e em temperaturas entre 45 a 75 °C. Os parâmetros cinéticos $K_{\rm m}$ e $V_{\rm max}$ obtidos através de ajuste não linear da curva foram similares para os substratos pNPG e pNPGal, sendo eles de 1,95 e 2,54 µmol .min.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 mM⁻¹s⁻¹. A β-glicosidase purificada foi suscetível a todos os cations metálicos, compostos orgânicos e inibidores testados, sendo que sua atividade residual foi mantida apenas até 25% em presença de Cd²⁺, Hg²⁺e K⁺, perdendo 95 e 100 % da atividade em presença de Ag⁺ e Cu⁺², respectivamente. Os testes de termodinâmica indicaram que a enzima é estável na faixa de 50 até 70 °C, sendo necessárias 16,34 horas e 23,5 horas para redução de sua atividade a 10% do valor inicial nas temperaturas de 50 e 70 °C, respectivamente.

Palavras-chave: β-glicosidase, purificação, caracterização, termostabilidade.

1. INTRODUÇÃO

A purificação de produtos biotecnológicos de origem microbiana ou animal constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse. Em conjunto a essa variedade de características, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e o desenvolvimento da fase de cultivo, pois não existe processo de purificação que possa ser utilizado de forma geral e padronizada (PESSOA JUNIOR; KILIKIAN, 2005).

Diversos processos industriais podem ser desenvolvidos utilizando-se células inteiras como fonte de enzimas, mas a eficiência desses processos pode ser melhorada com o uso de enzimas já purificadas. O critério de seleção e caminho de purificação depende do objetivo final. Um alto grau de pureza geralmente não é necessário em alimentos processados, detergentes e na indústria de papel e celulose (CHIDI et al., 2008). Posteriormente à purificação enzimática, os estudos de caracterização de enzimas são importantes para entender seu comportamento e sua aplicabilidade. A viabilidade para seu uso industrial depende de conhecer a estabilidade térmica, o pH da enzima e outras propriedades como a cinética e termodinâmica da reação (BOKHARI et al., 2009).

Vários processos industriais são realizados em altas temperaturas ou em pH extremos, limitando o uso de enzimas não termoestáveis (ACHARYA; CHAUDHARY, 2011). Componentes dos meios reacionais como íons metálicos presentes em equipamentos, gerados por corrosão, por exemplo, podem influenciar na atividade da enzima. Ainda, o conhecimento das caracterísiticas de catálise e a cinética das enzimas permitem a modelagem das reações de modo a se obter o máximo de rendimento nos processos.

Nesta etapa do trabalho, β -glicosidase e da β -xilosidase produzidas pelo fungo foram purificadas e a β -glicosidase caracterizada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Purificação das enzimas

2.1.1. Ensaios de purificação em pequena escala de β- xilosidases e β- glicosidase

Estes ensaios simularam as condições encontradas numa coluna de purificação e foram realizados em tubos de 5 mL (WILLIAMS; FRASCA, 2011). A estratégia apresenta duas etapas, primeiramente foi determinado o pH de melhor interação entre proteína e resina iônica; e posteriormente foi realizada a determinação da concentração de sal necessária para eluição da proteína por definição do gradiente salino. A resina utilizada como teste foi a de troca aniônica Q-sepharose® Fast flow (Sigma-Aldrich).

Para avaliação do melhor pH de adsorção, foi adicionado 1,0 mL contendo 50% (v/v) da resina em diferentes tubos, sendo cada um equilibrado e ambientado em um pH (3,0-8,5). Após o processo de ambientação, foram adicionados 500 μL (250 μL de extrato bruto + 250 μL do tampão no pH correspondente) de solução. Os tubos foram então homogeneizados durante 10 minutos, o sistema foi decantado e o sobrenadante retirado para dosagem das atividades das enzimas e da proteína total. Posteriormente, as proteínas que ficaram ligadas à resina foram eluídas em um gradiente do tampão correspondente contendo concentrações de NaCl variando entre 0,04 e 2 M. A avaliação das bandas de proteínas liberadas foi realizada por meio de técnica de eletroforese SDS-PAGE.

2.1.2. Análise da β-glicosidase e da β-xilosidase por eletroforese SDS-PAGE e Zimograma

No caso do extrato bruto, as soluções enzimáticas foram concentradas 10 vezes em concentrador rotativo série RVC 2-18 CD Plus (Christ) durante 1h, a 10.000 xg e $60 \,^{\circ}\text{C}$. O material resultante foi depois então filtrado, congelado e liofilizado em liofilizador FR-Drying Digital Unit (ThermoFisher) durante 16h. O

liofilizado foi solubilizado em aproximadamente 15 μL de água ultrapura e 5 μL de tampão (2X Laemmli Sample Buffer) da Bio-Rad Laboratories. Este procedimento de liofilização foi reproduzido sempre que necessário também para a enzima já purificada.

As eletroforeses SDS-PAGE do extrato bruto e das alíquotas da enzima purificada foram realizadas da mesma forma, em gel poliacrilamida (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). O gel de concentração foi composto por 4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8 e o gel de corrida 10% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. A mistura de padrões de massa molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) da Bio-Rad Laboratories foi composto por miosina (200 kDa), β-galactosidase (116,25 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). A corrida das amostras no gel foi realizada a 150 V, 21mA e 3 W durante aproximadamente 100 minutos, e as bandas reveladas através do processo de coloração com nitrato de prata (OAKLEY et al., 1980).

A atividade enzimática dos extratos bruto e purificado foi detectada por zimograma em condições não desnaturantes. Para a enzima β-glicosidase, após a migração eletroforética o gel foi colocado em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 durante 10 minutos à temperatura ambiente. A reação de hidrólise foi realizada no interior do gel durante a incubação em tampão acetato de sódio 0,2 M com 0,1% de esculina e 0,03% de cloreto férrico a 50 °C por aproximadamente 15 minutos, até o surgimento de bandas. Logo após, a reação foi interrompida em solução aquosa de glicose 10% (Sigma-Aldrich). Para a enzima β-xilosidase, o zimograma em condições não desnaturantes prosseguiu-se conforme o descrito por Yan et al., (2008). Após eletroforese, o gel foi lavado três vezes com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. Após a lavagem, cobriu-se o gel com solução tamponada (tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0) de pNPX (3 mg/mL) por 15 minutos a 60 °C. Assim que se deu o surgimento das bandas a reação foi interrompida com solução de Na₂CO₃ 0,5 M.

A massa molecular das isoformas foi estimada em condições desnaturantes através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de

dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), estando o gel de corrida a 10 % e gel de empilhamento a 4%. O gel foi dividido em duas partes, a primeira corada com nitrato de prata e o restante corado pelo método de zimograma definido para cada enzima. A massa molecular das isoformas foi determinada comparando as bandas do zimograma com os padrões de proteínas globulares de massa molecular conhecida.

2.2. Determinação da concentração total de proteína

A concentração total de proteína foi determinada através do método descrito por Bradford (1976). Para tanto, 50 μL do extrato enzimático foram adicionados a 1,5 mL do reagente de Bradford, sendo feita a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A curva de calibração foi realizada tendo como padrão soro albumina bovina (BSA), em concentrações de 10-1000 μg.mL⁻¹. As dosagens de proteína foram expressas em μg.mL⁻¹ e todos os ensaios realizados em triplicata.

2.3. Purificação da β-glicosidase e β-xilosidase do fungo Rasamsonia emersonii S10.

Após os resultados obtidos no ensaio preliminar de purificação (item 2.1.1) e tendo sido definidos os parâmetros a serem seguidos, foi utilizado o sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography – Äkta Purifier 900 GE Healthcare) para o processo de purificação. Nessa etapa, foi utilizada uma coluna de troca aniônica Resource Q 6 mL (GE Healthcare) tendo como eluente A o tampão Bis-Tris 20 mM pH 6,0 e como eluente B o tampão Bis-Tris 20 mM pH 6,0 contendo 1 M de NaCl, utilizando gradiente linear e fluxo de 3 mL.min⁻¹ e coleta frações de 2 mL .

2.4. Caracterização da enzima purificada

2.4.1. Determinação do tempo de reação de β-glicosidase.

Tempos de reação entre 0 e 30 min foram testados para determinação do tempo adequado de reação, tomando por base os trabalhos relatados na literatura (GHORAI et al., 2010; GOTTSCHALK et al., 2010; KAUR et al., 2007; PAL et al., 2010). Foi utilizada uma solução de pNPG 5 mM e a incubação ocorreu a 70 °C durante os intervalos de tempo testados.

2.4.2. Caracterização bioquímica da β-glicosidase de R. emersonii S10

2.4.2.1. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima

O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi ensaiado empregando-se quatro diferentes soluções tampão de 0,1 M (pH 3 - 5,5: acetato de sódio; pH 6 e 6,5: MES (Sigma-Aldrich); pH 7 e 7,5: HEPES (Sigma-Aldrich); pH 8 - 9,5: glicina (Sigma-Aldrich); pH 10 e 10,5: CAPS (Sigma-Aldrich) a 70 °C. Os perfis de atividade em função da variação do pH da mistura reacional foram obtidos utilizando solução de pNPG 5 mM junto a cada solução tampão expostas acima, durante 15 min de tempo de reação enzimática.

O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima foi avaliado incubando-se a mistura reacional entre 35 e 90 °C, com intervalo de variação de 5 °C. A mistura constou de solução de 5 mM de pNPG junto a tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 3,5, por 15 min.

2.4.2.2. Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato.

O efeito do pH sobre a estabilidade da β-glicosidase foi estudado diluindo-se a enzima nas soluções tampão de investigação a 0,1 M, de tal modo que a concentração final do tampão fosse de 0,05 M. Após diluição, as amostras foram mantidas por 24 h à temperatura de bancada (~24 °C). Os valores de pHs testados foram os mesmos utilizados no ensaio de pH ótimo (item 2.4.2.1.).

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima foi avaliado incubando-se alíquotas da solução enzimática durante 1 h com temperaturas entre 35 e 90 °C, com variações de 5 °C.

O monitoramento da atividade da enzima, tanto para o estudo de estabilidade à temperatura, quanto para o estudo de estabilidade ao pH, foi avaliado incubando-se as alíquotas retiradas em seus respectivos tempos, nas condições de temperatura e pH ótimos obtidos anteriormente. As atividades enzimáticas foram expressas em atividade residual (%).

2.4.2.3. Estudo dos efeitos de íons sobre a atividade da enzima

Para avaliar a interferência dos íons metálicos sobre a atividade da β-glicosidase, foram utilizados sais para concentrações finais dos íons de 2 mM e 10 mM. Foram testados os seguintes íons metálicos: K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, (Dinâmica) Cu²⁺, Mn²⁺, (Merck), Fe³⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺ e Ag⁺ (Sigma-Aldrich). Os efeitos do agente quelante ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) (Merck), detergentes Tween 20, DMSO (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), SDS (Synth), inibidor fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich), glicose (Sigma-Aldrich) e o composto β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) foram avaliados nas concentrações de 10 mM no meio reacional. A reação enzimática ocorreu à temperatura ambiente durante uma hora em uma proporção de 1:1(íon-enzima v/v). As atividades relativas foram obtidas por comparação com o controle, ou seja, na ausência dos íons. Para o controle, a enzima foi diluída em água na mesma proporção que a utilizada nos ensaios.

2.4.2.4. Estudos cinéticos quanto à temperatura de reação, cálculo de E_a e Q_{10} .

Os experimentos para determinação da temperatura ótima de atividade foram executados como no descrito no item 2.4.2.1. A lei de Arrhernius foi utilizada para considerar a dependência das constantes de velocidade com a temperatura, sendo E_a calculada a partir da inclinação do gráfico de ln (atividade de beta glicosidase) versus 1000/T. Onde, E_a = -(inclinação.R), R corresponde a constante universal dos gases (8,314 J.K⁻¹.mol⁻¹) e T é a temperatura absoluta em Kelvin (K) (CASTRO et al., 2015; SAQIB et al., 2010).

$$Ea = -(inclinação. R)$$

O efeito da temperatura sobre a taxa de reação foi expresso em termos de coeficiente de temperatura (Q₁₀), que corresponde à taxa de aumento da reação enzimática com o aumento da temperatura a cada 10 °C. Este coeficiente foi determinado pela equação 2, sugerida por Dixon; Webb (1979).

(2)
$$lnQ10 = Ea.\frac{10}{RT^2}$$

Onde E é igual a energia de ativação (Ea).

A temperatura ótima em graus Celsius foi calculada pela equação 3, na qual 'x' é o ponto de intersecção das retas ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius.

(3)
$$T_{otima} = \left(\frac{1000}{x}\right) - 273,15$$

2.4.3. Estudo dos parâmetros cinéticos da enzima

A determinação das constantes cinéticas foi realizada incubando-se a enzima pura em solução de 4-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (pNPG) (Sigma-Aldrich), 4-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (pNPG) (Sigma-Aldrich) acrescido de solução de glicose 8 mM, celobiose (Sigma-Aldrich), 4β-D-galactopyranosídeo (Sigma-Aldrich), Nitrophenyl diversas concentrações (0, 2, 4, 4,5, 4,8, 5, 5,2, 5,5, 6, 8, 10 e 12 mM), cujos pH e temperatura do ensaio foram os ótimos para a atividade da enzima durante 15 minutos. O cálculo dos parâmetros $k_{\rm m}$ e $V_{\rm max}$ foi realizado por ajuste não linear de parâmetros no programa OriginPro 9.0 (OriginLab). Tanto a velocidade máxima (V_{max}), quanto a constante de Michaelis (K_m) Michaelis; Menten, (1913) foram obtidas por meio da equação de Lineweaver-Burk (equação 4), plotando-se um gráfico de regressão linear a partir das velocidades de reação nas diferentes concentrações de substrato.

(4)
$$\frac{1}{V_0} = \frac{k_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

A constante catalítica (k_{cat}), que representa quantas moléculas do substrato uma enzima consegue catalisar por unidade de tempo, e também é conhecida como *turnover number*, foi calculada de acordo com a equação 5. Além disso, a eficiência da enzima em converter o substrato, mesmo em baixas concentrações, em produto, foi representada de acordo com o quociente da divisão entre $\frac{k_{cat}}{k_m}$.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

Onde [E], é a concentração de enzima em mg.mL⁻¹.

2.4.3.1. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível

A enzima foi incubada em diversas temperaturas (30, 40, 50, 55, 60, 70, 80 e 90 °C) durante diferentes períodos (até 24 horas). Depois de transcorrido o tempo, a amostra foi colocada em banho de gelo e posteriormente mantida *overnight* a 4 °C para que as estruturas secundária e terciária se estabilizassem e qualquer dobramento reversível fosse refeito (SAQIB et al., 2012). Os cálculos dos parâmetros foram realizados como descrito abaixo.

2.4.3.2. Determinação da constante de termoinativação (K_d) e meiavida ($t_{1/2}$).

O valor da constante de velocidade de desativação (K_d) foi expressa como um decaimento exponencial e encontrada plotando ln (A/A0) versus o tempo. A energia de desnaturação (E_d) foi determinada pelo gráfico de Arrhenius, plotanto ln (K_d) em função de 1000/T em Kelvin (ABDEL-NABY et al., 2016).

O tempo aparente de meia-vida $(t_{1/2})$ da enzima, definido como o tempo em que a atividade residual atinge 50%, foi estimado pela relação de 0,693/k_d, conforme descrito na equação abaixo:

(6)
$$\frac{t1}{2} = \frac{\ln 2}{kd} = 0.693/kd$$

O tempo de redução decimal (valor D), definido como o tempo requerido para a redução de 90% ou um-log 10 da atividade enzimática inicial em uma determinada temperatura, está relacionado com a constante de desativação (k_d) e foi calculado como mostrado na equação 7:

(7)
$$D = 2,303/K_d$$

2.4.3.3. Energia de ativação da desnaturação térmica Ea_d (J.mol⁻¹)

Para tanto, foi construído um gráfico de ln k_d vs. 1000/T, sendo a E_d calculada pela equação 8:

(8)
$$Ea(d) = -(inclinação.R)$$

2.4.3.4. Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_d (J.mol⁻¹).

A entalpia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 9:

(9)
$$\Delta H(d) = Ea(d) - RT$$

2.4.3.5. Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_d (kJ. mol⁻¹).

A energia livre de ativação de desnaturação térmica irreversível foi estimada pela equação 10, na qual K_b é a constante de Boltzmann (1,38 x 10^{-23}) e h a constante de Planck (6,63 x 10^{-34} J.s):

(10)
$$\Delta G(d) = -RT. \ln \left(\frac{kd.h}{kb.T} \right)$$

2.4.3.6. Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_d (J. mol⁻¹).

A entropia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 11:

(11)
$$\Delta S(d) = \frac{\Delta H d - \Delta G d}{T}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação das enzimas

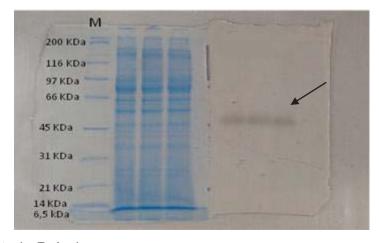
O que se espera de um processo de purificação de proteínas não é apenas a remoção de contaminantes, mas também a transferência da proteína purificada para um ambiente onde ela possa manter-se estável e funcional, a fim de ser possível sua aplicação onde for determinado. Alto grau de pureza é desejado quando se tratam de aplicações farmacológicas ou para análises estruturais; já nas aplicações industriais, como indústrias de alimentos, o grau de pureza moderado a baixo é aceitável (QUEIROZ et al., 2001).

Antes de se iniciar o processo de purificação foi feita uma avaliação da solução enzimática bruta com relação ao número de isoformas das enzimas presentes. A expressão de múltiplas isoformas de uma enzima é muito comum, e pode ser relacionada com a presença de diferentes fontes de carbono e formas de cultivo (ACTON, 2012), podem também resultar da presença de múltiplos genes, *splicing* de RNAm diferencial e modificações pós-traducionais, como glicosilação e digestão proteolítica. O mecanismo regulatório subjacente à geração de isoformas não é claro (AHMED et al., 2017).

O zimograma evidenciou uma única banda proteica com atividade de β-glicosidase, com massa molar estimada em 45 kDa, enquanto o zimograma para a atividade da β-xilosidase (resultado não mostrado), foi inconclusivo, pois o método utilizado não possibilitou uma revelação nítida da banda com atividade, porém foi possível verificar uma mancha de atividade em torno de 31 kDa. Na literatura, as β-glicosidases já foram bem estudadas e caracterizadas e suas massas moleculares variam de 12 a 350 kDa (BHATIA et al., 2002). Em contraste, as β-glicosidases do fungo termofílico *Humicola grisea* var. *termoidea* (PERALTA et al., 1997), *Scytalidium thermophilum* (ZANOELO et al., 2004), *Talaromyces thermophilus* (NAKKHARAT et al., 2006), *Chaetomium thermophillum* var. *coprophilum* (VENTURI et al., 2002), são monoméricas, com massas moleculares de cerca de 40-50 kDa. As β-glicosidases diméricas foram descritas para *Paecilomyces thermophila* (YANG

et al., 2008) e *Thermomyces lanuginosus* (LIN et al., 1999), mostrando massas moleculares nativas de aproximadamente 200 kDa. Mallek-Fakhfakh et al., (2016) ao estudarem a mesma enzima do fungo *Talaromyces thermophilus* encontraram, através de ensaios de zimograma, uma massa molecular de 116 kDa e Souza (2010), com o fungo *Humicola insolens*, purificaram glicosidase de 95 kDa. No trabalho de Prajapati e colaboradores (2018) com *Aspergillus tubingensis* NKBP-55, foi purificada uma β-glicosidase de elevada massa molecular (~250 kDa), resultado parecido com o encontrado nas análises de Saibi et al., (2011) com o fungo *Stachybotrys microspora* que mostrou uma proteína com massa molecular de 225 kDa. Em outros trabalhos com espécies do gênero *Aspergillus* podemos encontrar glicosidases com massas de 111 kDa, 102 kDa, 154 kDa (DECKER et al., 2001; RAWAT et al., 2015).

Figura 11 - Perfis de bandas eletroforéticas referentes à β-glicosidase presente na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo sólido de R. emersonii 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 massa molecular.



Fonte: Autoria Própria

3.1.1. Ensaios preliminares de purificação

Para o início do processo de purificação foi usada a resina Q-Sepharose que é um forte trocador de ânions que utiliza aminas quaternárias como ligante. Esta resina tem sido utilizada em diversas aplicações e nos procedimentos de cromatografia para purificação de produtos biológicos nos quais é empregada, foi verificada a remoção de grande quantidade de impurezas (WONG et al., 2016).

Inicialmente, segundo a metodologia descrita na seção 2.1.1., realizaram-se testes para verificar o melhor pH para adsorção das enzimas à resina. Conforme mostrado na figura 12 observa-se que a região de pH em que houve maior ligação de ambas as enzimas à resina foi entre pH 5,5 e 8,5. Os dados citados podem ser confirmados pela figura 13 (a) e (b). Os testes de pHs menores que 6 não estão demonstrados no gel SDS-PAGE 10% devido ao fato de terem sido visualizados muitos contaminantes, portanto sendo logo desconsiderados como opção para purificação das enzimas, pois as mesmas não adsorvem à resina na citada faixa de pH.

A ligação de proteínas na resina não ocorreu somente com as enzimas de interesse, contaminantes e outras proteínas também foram adsorvidos nessa faixa de pH conforme mostrado nos géis (Figura 13). Em pH 6,0 20 mM, houve adsorção praticamente total das enzimas (Figuras 12 e 13).

Para o teste de eluição foram preparados tubos contendo a Q-Sepharose® Fast Flow já adaptada, juntamente com a amostra e as proteínas eluídas com soluções com concentrações de NaCl de 0,04 a 2 M que foram adicionadas aos tubos, agitados e dispostos para decantação. O sobrenadante foi reservado para realização de atividades enzimáticas e análises em gel SDS-PAGE 10%. Dados expostos na Figura 12 (a) e (b).

Figura 12 - Perfis de atividades de β-glicosidase (a) e β-xilosidase (b) do R. *emersonii* S10 dos eluatos obtidos de tubos com a resina Q-Sepharose® Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH (faixa de pH de 3 a 8,5).

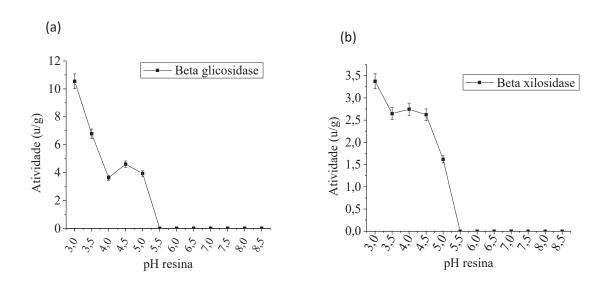
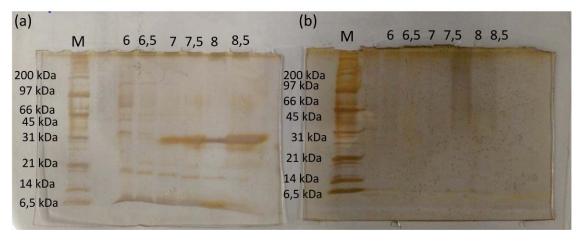


Figura 13 - Perfis eletroforéticos dos eluatos obtidos de minicolunas de resina Q-Sepharose® Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH (faixa de pH de 6 a 8,5). M - Marcador de massa molecular; (a) β -glicosidase; (b) β -xilosidase.

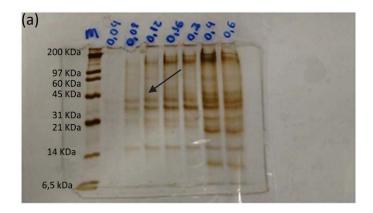


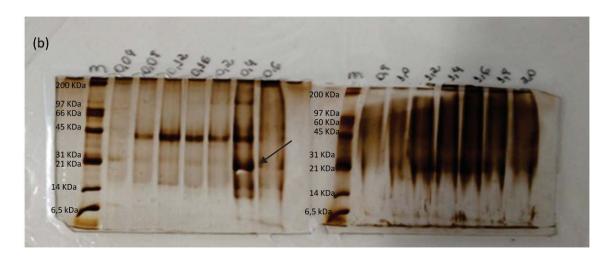
Fonte: Autoria Própria

A eluição da β-glicosidase (Figura 14 a) começou a partir da concentração de 0,08 M de NaCl. A de β-xilosidase, a partir de 0,4 M de NaCl,

conforme Figura 14 (b). Pelas figuras é possível observar também que ao passo que se aumenta a concentração de NaCl, mais contaminantes são eluídos. Os parâmetros para a purificação foram assim definidos:- Tampão A: Bis Tris pH 6,0, 20 mM; - Tampão B: Bis Tris pH 6,0, 20 mM + NaCl 1 M.

Figura 14 - Perfis eletroforéticos 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 massa molecular; (a) β-glicosidase; (b) β-xilosidase.





Fonte: Autoria Própria

3.1.2. Purificação da β-glicosidase e β-xilosidase do fungo Rasamsonia emersonii S10.

Definidas as condições para purificação, seguiram-se os experimentos cromatográficos por troca aniônica em sistema FPLC (Äkta Purifier) (item 3.1.1).

Para ambas as enzimas foram injetadas amostras de 1 mL na coluna de troca aniônica, seguida de lavagem com 5 volumes de coluna (VC) com tampão A. Após isso, iniciou-se o gradiente de NaCl com o tampão B. O fracionamento de B deu-se como o seguinte: 0% de B 1 VC; 5% de B 1 VC; 8% de B 3 VC; 15% de B 1 VC e 100% de B 1 VC. As Figuras 15 e 16 mostram que ambas as proteínas eluíram logo antes de picos cromatográficos.

A tabela de purificação foi construída apontando as medidas de atividades da β-glicosidase e de proteínas totais tanto do extrato bruto quanto do purificado. Também se encontram expostos na tabela grau de pureza e rendimento do processo que foi realizado em apenas uma etapa de purificação (Tabela 1).

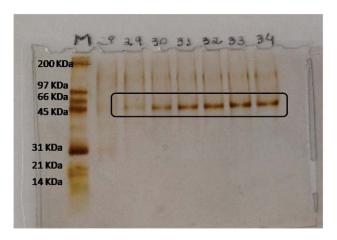
A metodologia aplicada no presente trabalho atingiu como saldo final, fator de purificação de 11 e rendimento de 96%. O processo foi iniciado com o extrato enzimático bruto, resultando na solução da enzima purificada. É importante ressaltar que são poucos os relatos na literatura demonstrando a purificação de enzimas nativas (não recombinantes) com alto rendimento, similar ao demonstrado neste trabalho. Isso reforça a relevância desta metodologia para a purificação desta enzima

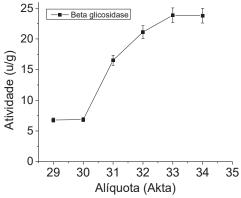
Dados da literatura mostram a purificação de β-glicosidase do fungo termofílico *Talaromyces thermophilus*, realizada em quatro etapas que apresentou um rendimento de 25,40%, menor que o apresentado por este trabalho, fator de purificação de 12 e valores de proteína total e atividade específica de 0,7 mg e 1429 u.mg⁻¹ (MALLEK-FAKHFAKH et al., 2016). Em estudo com o fungo *Stachybotrys microspora*, a purificação da β-glicosidase ocorreu após duas etapas, alcançando um rendimento, também inferior ao deste trabalho, de 75% e fator de purificação de 16, sendo que os valores de proteína total e atividade específica foram de 6 mg e 20 u.mg⁻¹ (SAIBI et al., 2011).

Figura 15 - Picos de atividades enzimáticas no cromatograma e bandas eletroforéticas das frações com atividades de β-glicosidase em cromatografia por troca aniônica usando coluna Resource Q 6mL (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.



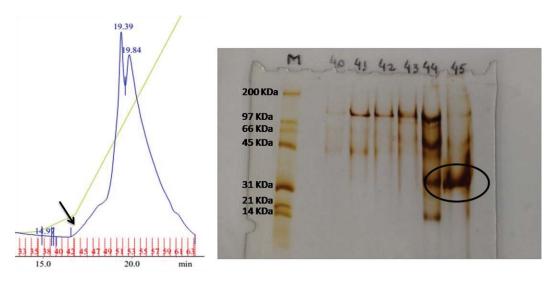
(b)





Fonte: Autoria Própria

Figura 16 - Bandas eletroforéticas das frações com atividade de β-xilosidase em cromatografia por troca aniônica usando coluna Resource Q 6mL (GE Healthcare) (fluxo 3 ml/min) e análise em gel SDS-PAGE 10% das frações eluídas.



Fonte: Autoria Própria

Tabela 1 - Etapa da purificação da β-glicosidase do fungo *R. emersonii* S10.

	U.mL ⁻¹	mg	U.mg ⁻¹	mL	R (%)	F.P.
Extrato Bruto	4,01	0,512	7,83	1,0	100	1
Eluato da coluna Resource Q	3,85	0,043	89,53	1,0	96	11

U.mL⁻¹ = Atividade β-glicosidase; mg = Proteína Total; U.mg⁻¹ = Atividade Específica, mL = Volume; R = Rendimento; F.P. = Fator de Purificação.

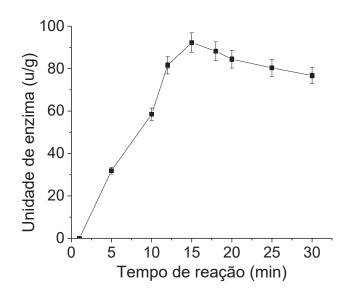
3.2. Determinação do tempo de reação da β-glicosidase

A partir deste ponto do trabalho, os experimentos foram realizados apenas com a β-glicosidase purificada. Isso se deu porque se julgou necessária a repetição de algumas provas para confirmação de alguns parâmetros na metodologia a ser aplicada com a β-xilosidase.

Assim sendo, foi dado seguimento aos ensaios com a β-glicosidase pura e estudos dos parâmetros que interferem na atividade da enzima. Foi primeiramente realizado um teste para verificação de qual seria o melhor tempo de reação.

De acordo com a Figura 17, um tempo reacional de 15 minutos foi o mais adequado. A forma bruta da mesma enzima foi testada em tempo de reação de 10 minutos (ROSA, 2014). Tempo de reação de 15 minutos para a β-glicosidase também foi reportado nos estudos com os fungos *Stachybotrys, microspora* e *Talaromyces thermophilus* (SAIBI et al., 2011; MALLEK-FAKHFAKH et al., 2016). Alguns dados da literatura relatam tempos de reação para a β-glicosidase que foram superiores ao mostrado no presente trabalho, variando entre 20 e 30 minutos (BAI et al., 2013; KAUR et al., 2007; ZHU et al., 2010; CHEN et al., 2010).

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 *R. emersonii* S10. Substrato: pNPG 5 mM. Teste realizado a 70 °C e pH 3,5.



3.3. Caracterização bioquímica da β-glicosidase de *R. emersonii* S10

3.3.1. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima

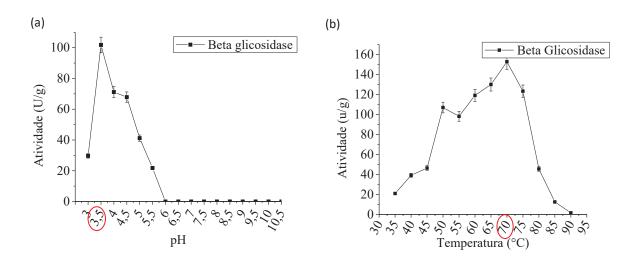
A β-glicosidase em sua forma purificada apresentou maior atividade em pH 3,5 e em temperatura de 70 °C (Figura 18 a e b). Em sua forma bruta, a maior atividade foi em pH 4,0 e na temperatura de 65 °C (Cap 2, item 3.3). Essa variação no efeito do pH e T °C sobre a atividade da enzima pura e na forma bruta provavelmente deve-se a interferência de compostos presentes no extrato enzimático testado e que podem exercer efeito de tamponamento.

Uma característica importante a ser destacada para a enzima pura é a variação na atividade observada em meios reacionais com pH 3,0 e 4,0, com relação àquela em pH 3,5, com aumento muito rápido entre pH 3,0 e 3,5 e queda muito abrupta entre 3,5 e 4,0.

Sabe-se que variações no pH podem conferir comportamentos diferentes entre proteínas de uma mesma classe. Em trabalhos de Ahmed et al., (2017) e Bhatia et al., (2002) são relatados vários dados com β-glicosidases

microbianas com valores bastante variados de pH e temperatura de maior atividade para β-glicosidases de diferentes origens. Para fungos termófilos, a faixa de pH ótimo para atividade β-glicosidase se situou entre 4,0 e 6,0, e de temperatura entre 40 e 50 °C. O pH ótimo aparente na região ácida parece ser uma característica geral das glicosidases de fungos, como se pode observar em estudos com Fusarium oxysporum (CHRISTAKOPOULUS et al., 1994) e C. thermophilum var coprophilum (VENTURI et al., 2002). Estas informações são corroboradas pelo trabalho com o fungo *T. clypeatus*, cuja β-glicosidase apresentou pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 45 °C (PAL et al., 2010), mesmos valores encontrados no estudo realizado por Saibi et al., (2011) com o fungo Stachybotrys microspora. β-glicosidases do fungo termofílico T. thermophilus, apresentou pH ótimo de 5, sendo que nos pH 4 e 7 ainda havia 80% da atividade catalítica (MALLEK-FAKHFAKH; BELGHITH, 2016). Em espécies do gênero Aspergilus, particularmente, observa-se que as temperaturas ótimas das β-glicosidases variam entre 50 e 70 °C, enquanto que os valores de pH se situam entre 4,0 e 5,5 (WATANABE et al., 1992; IWASHITA et al., 2002; JAGER, 2001). Talaromyces (Rasamsonia) emersonii, no estudo de Murray (2004) apresentou enzima com temperatura ótima de 71,5 °C e pH 4, similar ao encontrado no presente trabalho, corroborando o caráter termofílico desse gênero.

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.



3.3.2. Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato.

De acordo com a Figura 19 (a) a enzima manteve 100% de sua atividade em uma ampla faixa de pH (5,0 a 8,5). Após incubação em pH 9,0 a enzima ainda detinha 20% de atividade residual. As temperaturas de estabilidade da β-glicosidase purificada, quando em ausência de substrato, foram entre 45 a 70 °C por uma hora com praticamente 100% da atividade inicial. A 75 °C, a enzima ainda mantinha 80% de sua capacidade catalítica. As β-glicosidases fúngicas têm apresentado estabilidade em faixas mais estritas de pH. Em trabalho com β-glicosidase do fungo T. clypeatus, Ghorai et al., (2010) obtiveram valores de estabilidade entre pH 6,0 e 7,0, com 95% da manutenção da atividade residual, resultado similar ao publicado por Kaur et al., (2007) em que G-glicosidase do fungo G-glicosidase G-glicosidase do fungo G-glicosidase G-glicosi

5,0 e 6,0, porém valores dentro de faixas menos amplas do que a alcançada em nosso estudo.

Kalogeris et al., (2003) em estudos com o fungo do gênero *Thermoascus* obtiveram valores de estabilidade térmica, da mesma enzima, a 70 °C durante 24 h. A β-glicosidase do fungo termofílico *Talaromyces thermophilus* mantevese estável com 80% da atividade residual entre 55 e 70 °C e quanto à estabilidade em pH, a atividade residual foi de 95% entre pH 4 e 10. Estes resultados diferem daqueles encontrados em alguns trabalhos, conforme relatou Kaur et al., (2007) em que a temperatura estável da enzima de *Melanocarpus sp* foi de 50 °C, sendo que acima dos 70 °C restava apenas 25% da atividade residual. Em outros trabalhos, entre as temperaturas de 40 e 60 °C, a atividade catalítica da enzima estava em média em 70% (PAL et al., 2010), ou se se mantinha estável durante 1 hora a 50 °C e 60 °C (ZANOELO, 2004; PERALTA, 1997). Em estudo com 3 fungos do gênero *Aspergilus*, foi observada estabilidade das β-glicosidases durante duas horas em que em temperaturas de até 60 °C, mantiveram 87, 53 e 64% de atividade, mas após duas horas a 70 °C foram inativadas (JÄGER et al., 2001).

Conforme visto no Capitulo II, item 3.4, os valores de atividade residual para a estabilidade enzimática, em ausência de substrato, referentes à enzima bruta foram pouco expressivos situando-se entre pH 4,5 e 5,5 e temperaturas entre 35 e 65 °C. Nota-se que, após a purificação, houve variação nessas faixas de estabilidade da enzima em relação ao pH do meio, que passou a se encontrar em faixa mais neutra (5,5 a 8,5). Já a faixa de temperatura na qual a enzima foi estável aumentou em 15 °C e apresentou valores de atividade residual também muito mais robustos, em torno dos 100%.

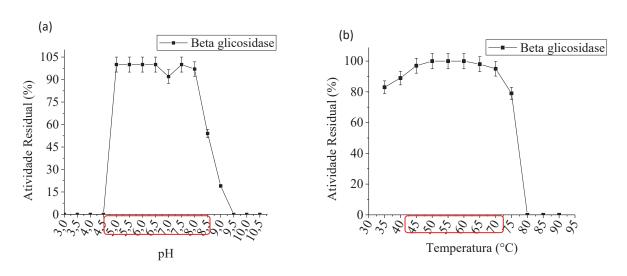
Segundo trabalhos encontrados na literatura, fungos de ambiente de solo que tiveram um contato inicial (*priming*) com condições de temperatura mais suaves do que as quais foram posteriormente expostos, apresentaram melhores desempenhos (ANDRADE-LINARES et al., 2016). Isso pode explicar em partes os resultados encontrados, já que o microrganismo do estudo é proveniente de amostras de solo, onde as temperaturas eram mais brandas do que as aplicadas nos ensaios ao longo do trabalho.

O "priming" está relacionado a estressores ou estímulos transitórios que não estarão permanentemente presentes. Portanto, isso acarreta mudanças

fisiológicas e não genéticas do indivíduo após a exposição a um estímulo ou a um estressor moderado (HILKER et al., 2016).

Enzimas que são estáveis em amplas faixas de pH, assim como de temperatura são interessantes sob o ponto de vista da aplicação industrial pois facilita o processo de aplicação e estocagem dentro da indústria.

Figura 19 - Efeitos do pH apos 24 horas de incubação (a) e da temperatura durante uma hora de incubação (b) sobre a estabilidade da β-glicosidase purificada, quando em ausência de substrato.



3.3.3. Estudo dos efeitos de íons, composto orgánicos e inibidores sobre a atividade da enzima

Entre os parâmetros avaliados na determinação do mecanismo da ação da β-glicosidase, foi observado o efeito de íons metálicos, inibidores e compostos orgânicos sobre a atividade enzimática. Os efeitos desses agentes sobre a atividade enzimática nos permitem analisar de forma específica as condições nas quais a enzima atingiria seu desempenho máximo em processos determinados, através da adição de compostos que estimulem a atividade catalítica da proteína ou através da supressão de reativos que seriam inibitórios

a essa catálise. As interferências de alguns desses compostos sobre a atividade da β-glicosidase são mostradas na Tabela 2.

A β-glicosidase purificada foi suscetível à maior parte dos íons metálicos, compostos orgânicos e inibidores testados. A atividade enzimática foi inibida na presença da maioria dos compostos, em especial de Ag⁺ (10 mM) e Cu⁺² (10 mM) que inibiram a enzima em 95 % e 100%, respectivamente, e Cd⁺², Hg⁺², K⁺ que inibiram cerca de 75 % da atividade enzimática (Tabela 2). Esses fatos são observados na literatura em muitas enzimas estudadas, quando estão associadas com metais pesados (PERALTA et al., 1997; LUSTERIO et al., 1992; OH et al., 1999). Inibição forte por Ag⁺, Hg²⁺ e Cu²⁺ na atividade enzimática foi relatada para várias β-glicosidases (SOUZA et al., 2010).

Alguns íons metálicos podem reagir reversivelmente com enzimas formando complexos que são mais ativos. Segundo Scopes (1994), o sítio ativo de uma enzima possui grupos aminoácidos que podem reagir com compostos metálicos resultando em alteração da atividade catalítica. Sendo que alguns íons podem ocasionar a oxidação de grupos presentes na cadeia lateral dos aminoácidos resultando em uma diminuição drástica de atividade. O Hg²⁺, por exemplo, é reconhecido como agente oxidante de grupos sulfidrila (-SH) e a inibição pode indicar o envolvimento desses grupamentos com o sítio catalítico enzimático (LUSTERIO et al., 1992; OH et al., 1999).

O EDTA é um reagente com capacidade de quelar íons metálicos e é empregado em diversos testes bioquímicos, porém, caso a enzima dependa desses íons, a presença de EDTA no meio de reação pode quelar o íon envolvido na atividade com forte redução da catálise. Outra de suas funções é a de diminuir a ação de proteases, mais especificamente, metaloproteases em extratos brutos, cuja remoção de íon divalente interfere diretamente na catálise (ZHU et al., 2010). Foi observado que apenas 39% da atividade da enzima foi mantida em presença do EDTA e isso poderia sugerir que a mesma pudesse se tratar de uma metaloenzima. No entanto, a análise dos efeitos dos íons metálicos testados sobre a atividade da β-glicosidase não indicou nenhum metal como ativador da enzima.

No trabalho de Pal et al., (2010) foram reportados testes da β -glicosidase do fungo *Termitomyces clypeatus*, em que o EDTA e os efeitos de íons metálicos foram observados na enzima tanto em sua forma bruta quanto

na pura. Os resultados com a enzima pura foram similares aos apresentados pelo presente trabalho, com influência negativa do EDTA, que agiu reduzindo a atividade enzimática em torno de 40%, e dos íons metálicos que também interferiram no poder catalítico da enzima.

Tabela 2 - Efeito de íons e agentes caotrópicos sobre a atividade da β-glicosidase de R. emersonii S10. A atividade foi realizada utilizando como mistura reacional 40 μL de solução tampão acetato de sódio 0,1 M pH 3,5, 50 μL de pNPG a 5 mM e 10 μL de solução (enzima + íon de interesse) a 70 °C, durante 15 min. Valores em % indicam a força catalítica restante quando comparados à enzima pura (100%). *BME - β -Mercaptoetanol.

lons metálicos (mg/mL)	Atividade Residual (%)	Desvio	lons metálicos (mg/mL)	Atividade Residual (%)	Desvio	Compostos orgânicos e inibidores	Atividade Residual (%)	Desvio
			Enz.	Pura ±0,01 1	00%			
Ag ⁺ (2)	34	±0,01	Hg ²⁺ (2)	22	±0,05	Glicose (5)	65	±0,02
Ag ⁺ (10)	5	±0,01	Hg ²⁺ (10)	22	±0,03	Glicose (8)	72	±0,18
Ca ²⁺ (2)	27	±0,02	K ⁺ (2)	24	±0,01	SDS (2)	28	±0,02
Ca ²⁺ (10)	43	±0,01	K ⁺ (10)	27	±0,01	SDS (10)	26	±0,03
Cd ²⁺ (2)	22	±0,02	Mg ²⁺ (2)	27	±0,01	TRITON	61	±0,00
Cd ²⁺ (10)	22	±0,02	Mg ²⁺ (10)	46	±0,01	TWEEN 20	56	±0,01
Co ²⁺ (2)	27	±0,01	Mn ²⁺ (2)	45	±0,03	TWEEN 80	58	±0,02
Co ²⁺ (10)	38	±0,01	Mn ²⁺ (10)	74	±0,04	BME*	27	±0,01
Cu ²⁺ (2)	12	±0,04	DMSO	27	±0,05	EDTA	39	±0,02
Cu ²⁺ (10)	0	±0,01				PMSF	48	±0,04
Fe ²⁺ (2)	24	±0,02				Fenil (1)	40	±0,08
Fe ²⁺ (10)	51	±0,00				Fenil (5)	30	±0,11
						[

3.4. Atividade da β-glicosidases sobre o substrato pNPG, pNPG+Glicose, Celobiose e pNPGalactose em diferentes concentrações e parâmetros cinéticos.

A Figura 20 apresenta os dados coletados sobre a atividade da β -glicosidase em diferentes concentrações dos substratos pNPG, pNPG+inibidor (Glicose 8 mM), celobiose e pNPGalactose. A enzima purificada não apresentou atividade sobre a celobiose, ou seja, não hidrolisa a ligação β 1-4 da celobiose.

Após a seleção da quantidade de substrato no meio reacional, a metodologia de Michaelis-Menten foi empregada para obtenção dos dados cinéticos.

De acordo com Michaelis-Menten as reações catalisadas por enzimas são saturáveis, e a sua velocidade de catálise não indicaria uma resposta linear face ao aumento de substrato. À medida que a concentração de substrato aumenta, a enzima satura-se e a velocidade atingiria o valor máximo V_{max} , no qual todos os centros ativos estão ocupados (saturados) com substrato, ou seja, não existe enzima livre para ligar mais substrato e a concentração de complexo ES é igual à concentração de enzima.

As glicosidases podem ser divididas em três grupos com base na especificidade do substrato:

(1) As aril-glicosidases, que hidrolisam exclusivamente grupamentos aril-glicosidicos ou que apresentam uma grande preferência por eles; (2) As celobiases, que hidrolizam celobiose e pequenos oligossacarídeos, e, finalmente; (3) As glicosidases de especificidade ampla, que atuam em ambos os substratos (aril-glicosídeos, celobiose e oligossacarídeos), sendo estes últimos o grupo mais comumente observado em microrganismos celulolíticos (PATCHETT et al., 1987).

Os resultados apresentados abaixo indicam que a atividade enzimática da β -glicosidase não depende apenas da existência de ligações O-glicosídicas, mas também da posição do monossacarídeo, a posição da ligação e o comprimento da cadeia a ser hidrolisada. A hidrólise de pNPG demonstra alta especificidade por ligações β -glicosídicas e a atividade nos sustratos 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo indicam a alta especificidade da enzima

quanto à configuração anomérica das ligações glicosídicas a serem hidrolisadas (FLORINDO, 2015).

As β-glicosidases são inibidas por açúcares no estado de transição do mecanismo de catálise, substratos análogos aos glicosídeos ou agliconas livres de seus substratos. As enzimas reportadas na literatura têm geralmente constantes de inibição em torno de 100 a 200 mM (CAIRNS; ESEN, 2010), ou seja, a glicose é um fraco inibidor dessa enzima. Já para a enzima estudada neste trabalho, a glicose (8 mM) se mostrou como um forte inibidor, resultado mais parecido ao encontrado no trabalho de Mallek-Fakhfakh (2016), em que a enzima foi afetada em 70% de perda de atividade catalítica em presença de glicose 20 mM.

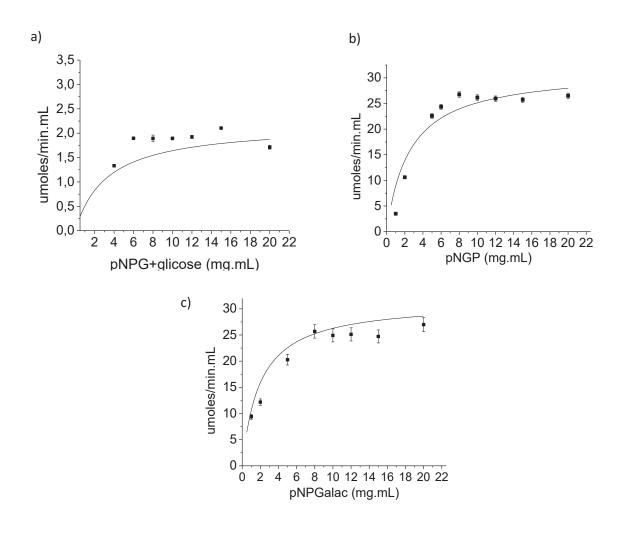
De acordo com os resultados abaixo expostos (Figura 20 a) e tomando por base os valores de V_{max} e K_m , quando o substrato pNPG foi utilizado, na ausência e na presença de inibidor (glicose) o parâmetro cinético afetado foi a constante K_m , o que é típico de uma inibição competitiva, que ocorre quando o inibidor apresenta estrutura química semelhante à do substrato, podendo ocupar o sítio ativo de forma não produtiva. Resultado similar foi mostrado no trabalho de Bonfá (2018), em que o K_m também foi afetado apresentando valores de 0,52 mmol L⁻¹ e 3,27 mmol L⁻¹ na ausência e na presença de glicose, respectivamente.

As figuras 20 (b) e (c), [pNPG] e [pNPGal], mostram perfil similar, com valores de K_m de 1,95 µmol/min e 2,54 µmol/min, e valores de V_{max} de 31,53 mg/mL e 31,42 mg/mL, respectivamente. Já no trabalho de Souza e colaboradores (2010), o mesmo padrão de similaridade entre esses dois substratos não foi encontrado, sendo que o K_m foi de 0,16 mM e 3,91 mM e o V_{max} de 8,53 U/mg e 18,1U/mg, respectivamente. O valor de K_m está relacionado à afinidade da enzima pelo substrato. Assim, quanto menor for este valor, maior será a especificidade. Em relação ao V_{max} , quanto mais alto seu valor, mais alta é a velocidade da reação, ou seja, quanto de produto a enzima consegue converter do substrato por minuto. Esse valor é dependente da quantidade de enzima no meio e se a mesma está purificada ou não.

Na literatura são encontrados valores muito distintos de parâmetros cinéticos das atividades das β-glicosidases (BAI et al., 2013; KAUR et al., 2007; SINGHANIA et al., 2013). Em trabalhos em que foi utilizado o pNPG como

substrato, a enzima na forma pura do fungo *Aspergilus oryzae*, apresentou K_m = 0,035 mM e V_{max} = 1,72 μmol/min.mL⁻¹ (ZHU et al., 2010), já Santos e colaboradores (2016) reportaram trabalho com a β-glicosidase de *Trichoderma harzianum* com 0,97 mM e 29,3 μmol/min.mL⁻¹ de K_m e V_{max} , respectivamente. Florindo (2015), trabalhando com o fungo *Trichoderma harzianum*, obteve valores de K_m de 0,32 mM e V_{max} de 0,37 μmol. A enzima do fungo termofílico *Talaromyces thermophilus*, apresentou valores de K_m e V_{max} de 0,25 mM e 228,7 μmol, respectivamente (MALLEK-FAKHFAKH et al., 2016).

Figura 20 - Curva de Michaelis-Menten da β -glicosidase purificada utilizando como substratos (a) pNPG+glicose (8 mM), (b) pNPG, (c) pNPGalactose



Os valores obtidos através do ajuste da curva foram os seguintes:

Tabela 3 - Valores obtidos através do ajuste da curva

	V _{max} (mg/mL ⁻¹)	K _m (μmol/min)	<i>k</i> _{cat} (s ⁻¹)	$k_{\rm cat}/K_{\rm m}~({\rm mM}^{-1}{\rm s}^{-1})$
pNPG	31,53±3,54	1,95±0,47	163,36±0,005	83,77±1
pNPG+Inibidor	2,18±0,45	3,28±0,72	11,29±0,003	3,44±0,9
pNPgalactose	31,42±3,92	2,54±0,51	102,79±0,003	40,46±1,1

3.5. Estudos termodinâmicos com a enzima purificada

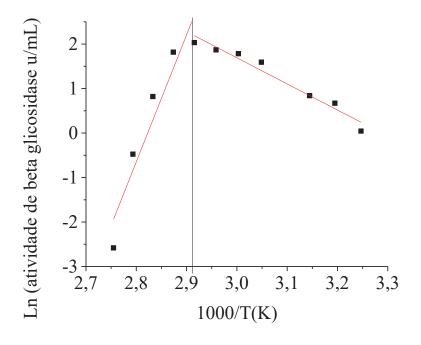
A comparação entre os dados cinéticos entre diferentes celulases é normalmente difícil de ser feita por existirem muitas variáveis envolvidas no processo. A análise cinética dos mecanismos de desativação enzimática é de primordial importância, permitindo um melhor controle sobre o uso do biocatalisador. As proteínas termofílicas compartilham estruturas tridimensionais semelhantes com os seus homólogos mesófilos, porém uma grande diferença entre ambos advém do fato de que as proteínas dos termófilos apresentam menor tendência à desnaturação por possuírem mais interações (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações dissulfeto, ligações de metal). A estabilidade cinética de uma enzima é muitas vezes expressa como tempo de meio de vida (t_{1/2}) à temperatura definida. O tempo aparente de meia-vida da enzima, definida como o tempo em que a atividade residual atinge 50%, foi estimado pela relação de $0,693/k_d$. Δ_G das proteínas termofílicas são 5-20 KJ/mol mais altas do que as de proteínas mesofílicas, já que devem equilibrar as demandas conflitantes entre flexibilidade molecular (para catálise eficiente) e estabilidade (que requer interações extras e rigidez). Dessa forma, compreender o mecanismo de inativação enzimática e a reversibilidade ou irreversibilidade das reações envolvidas auxilia na caracterização da estabilidade enzimática, permitindo um controle melhor sobre o processo de desativação, abordagens de estabilização e propriedades catalíticas (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008).

Com os testes de termodinâmica, desnaturação térmica irreversível e de acordo com a curva de Arrhenius representada pela Figura 21, tornou-se possível determinar a temperatura ótima de 70 °C, assim como a sua energia

de ativação E_a que apresentou um valor positivo de 48,83 kJ/mol (R= 0,9836), ou seja, as reações de catálise suprimem a desativação enzimática até o ponto de temperatura ótima. Esse resultado indica que a quantidade de energia necessária para que ocorra a formação do complexo enzimático de hidrólise da beta glicosidase, é relativamente baixa, tornando sua capacidade hidrolítica eficaz.

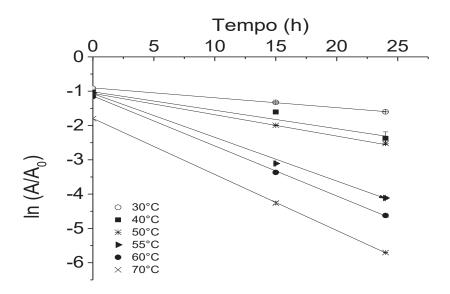
O efeito da temperatura na taxa de reação da β -glicosidase do fungo Rasamsonia emersonii S10 apresentou valor de Q_{10} = 1,15 aos 70 °C. O coeficiente térmico (Q_{10}) é um parâmetro cinético que infere se as reações catalíticas são controladas pela temperatura, ou por outros fatores. Geralmente, as reações enzimáticas mostram que o valor de Q_{10} varia entre 1 e 2. Um desvio destes valores indica um envolvimento de outros valores além da temperatura no controle da taxa de reação. Além disso, os valores de Q_{10} não parecem diferir significativamente entre as classes de enzimas, mesmo as termofílicas (ELIAS et al., 2014). Esse parâmetro faz referência ao quanto a velocidade de reação acelera em resposta à elevação de 10 °C.

Figura 21 - Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da β-glicosidase purificada do fungo R. emersonii S10.



O resultado do estudo de estabilidade térmica enzimática a seguir expõe intervalo abrangente de temperatura, em que foram testados diferentes intervalos de tempo, entre 0 e 24 horas de incubação. A partir do gráfico abaixo (Figura 22), foi possível a obtenção dos dados expostos na Tabela 4.

Figura 22 - Gráfico de primeira ordem da desnaturação térmica irreversível da beta glicosidase purificada do *R. emersonii* S10.



Entre as informações trazidas pela tabela 4 temos os valores de meia vida. Os resultados cinéticos apresentados na Tabela 4 mostram que o $t_{1/2}$ diminuiu progressivamente atrelado ao aumento da taxa específica de primeira-ordem da inativação térmica da β -glicosidase (k_d), com o aumento gradativo da temperatura, o que significa que a desnaturação irreversível é cada vez mais expressiva. No presente trabalho, o menor valor de k_d foi obtido para a temperatura de 30 °C (0,0283 h⁻¹) e o maior valor aos 70 °C (0,0980 h⁻¹), com tempos de meia vida ($t_{1/2}$) de 24,48 e 7,07 horas, respectivamente. Na literatura encontramos no trabalho de Souza et al., (2010) tempo de meia vida de 44 min a 55 °C com o fungo Humicola~insolens. Já Choi et al., (2011), apresenta enzima do fungo Phoma~sp. com o tempo de meia vida de 197 min a

50 °C. A meia vida da β-glicosidase do fungo *Stachybotrys microspora* foi de 23 h a 50 °C (SAIBI et al., 2011) e a do fungo *Talaromyces thermophilus* foi de 9 h a 60 °C, resultado similar ao apresentado no presente trabalho (MALLEK-FAKHFAKH et al., 2016).

O tempo de redução decimal (valor D) se refere ao tempo necessário para a redução de 90% na atividade enzimática inicial e é outro parâmetro que pode ser utilizado para averiguar a resistência da enzima à inativação térmica e fornecer informações essenciais para a utilização industrial. Pode ser observado na Tabela 4 que na faixa estável de temperatura da enzima (50 a 70 °C), a mesma apresentou boa estabilidade, uma vez que são necessárias 43,61 horas e 23,50 horas para redução de sua atividade a 10% do valor inicial nas temperaturas de 50 e 70 °C, respectivamente.

A energia de ativação da desnaturação térmica (E_d) da enzima pura foi estimado em um gráfico de Arrhenius (Figura 23) de ln(kd) vs 1/T de (Tabela 4) e a E_d foi de 31,67 kJ.mol⁻¹, o que significa dizer que são necessários 31,67 kJ. mol⁻¹ de energia para que ocorra a desnaturação da enzima.

As diferenças entre os dados de $E_{\rm d}$ encontrados na literatura variam muito, provavelmente devido a diferenças na fonte e na pureza das enzimas juntamente com os tipos de substratos utilizados. A estabilidade de uma proteína em determinada temperatura corresponde ao resultado do equilíbrio entre forças estabilizadoras e desestabilizadoras, que são influenciadas por interações hidrofóbicas e eletrostáticas, ligação de hidrogênio e de disulfeto e pelo grau de dobramento da molécula (ORTEGA et al., 2004).

A Tabela 4, como já mencionado, também traz os valores dos demais parâmetiros aferidos: entropia, entalpia e energia livre de Gibbs. A entalpia (ΔH_{d}) corresponde ao calor envolvido nas transformações à pressão contante, representa no processo de desnaturação, o quanto de ligações não covalentes foram quebradas. O número de ligações não covalentes em uma proteína é diretamente proporcional aos valores de ΔH_{d} . Neste trabalho, a 70 °C que foi a temperatura ótima da enzima, o valor de entalpia foi de 28,82 kJ.mol, indicando elevada quantidade de ligações como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals, os tipos de ligação que estabilizam o dobramento protéico (GOMES et al., 2007).

A entropia (ΔS) de um sistema aumenta com o aumento da temperatura, indicando que as moléculas estão mais agitadas e que há menos ordem, além de ocorrer a quebra de números consideráveis de ligações mais fracas. A perda da capacidade de grupos polares de acomodar moleculas de água e os grupos apolares expostos no desdobramento protéico faz com que a desordem do sistema aumente (JORDAN, 1996). Os valores de ΔS_d foram positivos em todas as temperaturas em que a glicosidase do R. emersonii S10 foi testada e variaram entre 81,34 kJ.mol⁻¹e 84,29 kJ.mol⁻¹, o que sugere um maior estado de desordem no processo de transição (COBOS; ESTRADA, 2003; WEBB, 2013).

A energia livre de Gibbs ($\Delta G_{\rm d}$) é outro importante parâmetro termodinâmico que inclui os dois parâmetros anteriormente citados (entalpia e entropia) e mede a instabilidade do sistema, a tendência à mudança para um estado mais estável da proteína, sendo que quanto maior o seu valor, maior a estabilidade da enzima em função da temperatura (DALAGNOL et al., 2017). A β -glicosidase aqui pesquisada obteve valores positivos de $\Delta G_{\rm d}$ que variaram entre 54,45 kJ.mol⁻¹ e 57,74 kJ.mol⁻¹ nas temperaturas estudadas.

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.

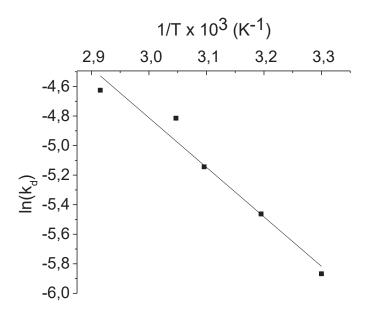


Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos da termoinativação irreversível da β-glicosidase purificada.

T (°C)	$K_{o}(h^{-1})$	<i>t</i> _{1/2} (h)	D(h)	ΔH_d	ΔG_d	ΔS_{d}	E _d
				(kJ.mol ⁻¹)	(kJ.mol ⁻¹)	$(J.mol^{-1}.K^{-1})$	(kJ.mol ⁻¹)
30	0,0283	24,48	81,37	29,16	54,45	83,46	31,67
40	0,0424	13,12	54,31	29,07	54,53	81,34	
50	0,0528	16,34	43,61	28,99	56,78	86,04	
55	0,0731	9,48	31,50	28,95	56,13	82,88	
60	0,0811	8,54	28,39	28,91	56,66	83,33	
70	0,0980	7,07	23,50	28,82	57,74	84,29	

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base no exposto:

- As enzimas β -glicosidase e β -xilosidase foram purificadas através de cromatografia de troca aniônica; processo de purificação da β -glicosidase atingiu rendimento de 96% e fator de purificação de 11;
- A β-glicosidase purificada apresentou temperatura ótima de 70 °C e foi estável entre 45 e 75 °C com praticamente 100% de atividade residual. O pH ótimo foi de 3,5 e a faixa estável compreende pH de 5 a 8,5;
- Houve inibição da β-glicosidase entre 70 a 100% da atividade catalítica em decorrência do uso de íons metálicos;
- Resultados da termodinâmica confirmaram o caráter termofílico da enzima com temperatura ótima a 70 °C, em que apresentou meia vida de 7 horas e D de 23,50 horas;
- Os parâmetros cinéticos k_m e V_{max} foram parecidos para os substratos pNPG e pNPGal, sendo de 1,95 e 2,54 µmol/min.mL⁻1 e 31,53 e 31,42 mg/mL⁻¹, respectivamente;

- Através de uma perspectiva biotecnológica, a alta eficiência catalítica para o substrato natural utilizado, associada à termoestabilidade elevada, torna esta enzima muito atrativa para aplicações industriais.

Após o exposto, os próximos passos se darão visando à produção de artigos. Para tanto, o objetivo será compreender melhor os mecanismos de ação da β-glicosidase do fungo *Rasamsonia emersonii* S10. Assim, serão realizadas novas purificações da enzima até a obtenção de um volume que possibilite a concentração da enzima a 10 mM. Após este ponto:

- será realizada caracterização biofisicoquimica;
- estudo da estrutura secundária da proteína, bem como o estudo da composição de misturas quirais;
- estudo do processo de desenovelamento térmico da enzima e da temperatura de *melting*;
- estudos das variações de entalpia na desnaturação.

Todos estes testes serão conduzidos a partir das técinicas de Dicroísmo Circular.

REFERÊNCIAS

ABDEL-NABY, M. A.; IBRAHIM, M. H.; EL-REFAI, H. A. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus pumilus* FH9 keratinase conjugated with activated pectin. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 238-245, 2016.

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Effect of nutritional and environmental factors on cellulases activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 70, p. 142-148, 2011.

ACTON, Q. A. Issues in biochemistry and biomaterials. Editi ed. [s.l.] **Scholarly Editions**, 2012.

AHMED, A.; NASIM, F.; BATOOL, K.; BIBI, A. Microbial β-Glucosidase: Sources, Production and Applications. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 31–46, 2017.

ANDRADE-LINARES, D. R.; VERESOGLOU, S. D.; RILLIG, M. C. Temperature priming and memory in soil filamentous fungi. **Fungal Ecology**, v. 21, p. 10–15, 2016.

- BAI, H.; WANG, H.; SUN, J.; IRFAN, M.; HAN, M.; HUANG, W.; HAN, X.; YANG, Q. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 528–540, 2013.
- BOKHARI, S.; LATIF, F.; RAJOKA, M. Purification and characterization of xylanases from *Thermomyces lanuginosus* and its mutant derivative possessing novel kinetic and thermodynamic properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 493-502, 2009.
- BONFÁ, C.,E. Purificação parcial e caracterização bioquímica de uma isoforma de β-glicosidase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7. **Dissertação de Mestrado**, São José do Rio Preto, 2016.
- CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 3389–3405, 2010.
- CHIDI, S. et al. Production, purification and characterization of celullase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 21, p. 3939-3948, 2008.
- CHOI, J. Y.; PARK, A. R.; KIM, Y. J.; KIM, J. J.; CHA, C. J.; YOON, J. J.Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase produced by *Phoma sp.* KCTC11825BP isolated from rotten mandarin peel. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 503–508, 2011.
- COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 810–818, 2003.
- DAROIT, D. J. Caracterização de uma Beta-glicosidase de *Monascus* purpureus. **Dissertação de Mestrado** em Microbiologia Agricola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia. (125p), 2007.
- DALAGNOL, L. M. G.; SILVEIRA, V. C. C.; SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80–87, 2017.
- DECKER, C.H.; VISSER, J.; SCHREIER, P. β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases andtheir differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acidtolerance. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 55, p.157–163, 2001.
- ELIAS, M.; WIECZOREK, G.; ROSENNE, S.; TAWFIK, D. S. The universality of enzymatic rate—temperature dependency. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, p.1–7, 2014.
- FLORINDO, R. N. β-glucosidases of GH 1 and GH 3 families: Structural, biochemistry characterization and transglycosylation structural mechanisms.

- **Tese (Doutorado em Biotecnologia)**-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- GHORAI, S.; CHOWDHURY, S.; PAL, S.; BANIK, S.P.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Enhanced activity and stability of cellobiase (β-glucosidase: EC 3.2.1.21) produced in the presence of 2-deoxy-d-glucose from the fungus *Termitomyces clypeatus*. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 8, p. 1015–1022, 2010.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA-SILVA, R. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.
- HILKER, M. et al. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. **Biological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1118–1133, 2016.
- IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1019-1032, 2008.
- JÄGER, S.; BRUMBAUER, A.; FEHÉR, RÉCZEY, E.; KISS, L. Production and characterization of β-glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 455-461, 2001.
- JORDAN, M. A. Bioprocess engineering principles. **Minerals Engineering**, v. 9, n. 1, p. 133–135, 1996.
- KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOUS, A.; VLAC HOU, KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus Thermoascus aurantiacus under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.
- KAUR, J.; CHADHA, B. S; KUMAR, B. A; SAINI, H. S. Purification and characterization of β-glucosidase from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 260–270, 2007.
- KETUDAT C, J. R.; ESEN, A. β-Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010.
- LIN, B.J.; PILLAY, S. S. Purification and biochemical characteristics of β -d-glucosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 30, p. 81-87, 1999.
- LUSTERIO, D. D.; SUIZO, F. G.; LABUNOS, N. M.; VALLEDOR, M. N.; UEDA, S.; KAWAI, S.; KOIKE, K.; SHIKATA, S. Alkali-resistant, alkaline endo-1,4-b-glucanase produced by *Bacillus sp.* PKM-5430. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 56, p. 1671–1672, 1992.
- MALLEK-FAKHFAKH, H.; BELGHITH, H. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β-glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and

- enzymatic synthesisof cello-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 419, p. 41–50, 2016.
- MURRAY, P.; ARO, N.; COLLINS, C.; GRASSICK, A.; PENTTILA, M.; SOLOHEIMO, M.; TUOHY, M. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. **Protein Expression and Purification**, v. 38, p. 248-257, 2004.
- NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Purification and characterization of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58 **Journal Biotechnology**, v. 123, p. 304-313, 2006.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6 Ed. São Paulo: **Art Med**, 2014.
- OAKLEY, B.R.; KIRSCH, D.R.; MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.105, n.2, p.361-3, 1980.
- OH, K. B.; HAMADA, K.; SAITO, M.; LEE, H. J.; MATSUOKA, H. Isolation and properties of an extracellular β-Glucosidase from a filamentous fungus *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. **Bioscience**, **Biotechnology**, and **Biochemistry**, v. 3, p. 281-287, 1999.
- ORTEGA, N.; DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and termal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209–217, 2004.
- PAL, S.; BANIK, S. P.; GHORAI, S.; CHOWDHURY, S.; KHOWALA, S. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2412–2420, 2010.
- PATCHETT, M. L.; DANIEL, R. M.; MORGAN, H. W. Purification and properties of a stable β -glucosidase from an extremely thermophilic anaerobic bacterium. **The Biochemical Journal**, v. 243, p. 779–787, 1987.
- PRAJAPATI, B. P.; SURYAWANSHI, R. K.; AGRAWAL, S.; GHOSH, M.; KANGO, N. Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. **Bioresource Technology**, v. 250, p.733–740, 2018.
- PERALTA, R. M., KADOWAKI, M. K., TERENZI, H. F., JORGEA, J. A. highly thermostable β-glucosidase activity from the thermophilic fungus *H. grisea var. thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letter**, v.146, p. 291-295, 1997.
- PESSOA, A.; KILIKIAN, B. Purificação de produtos biotecnológicos. São Paulo: **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 440, 2005.

- POZZO, T.; PASTEN, J. L.; KARLSSON, E. N.; LOGAN, D. T. Structural and Functional Analyses of β-Glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: A Thermostable Three-Domain Representative of Glycoside Hydrolase 3. **Journal of Molecular Biology**, v. 397, p. 724–739, 2010.
- QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 143–159, 2001.
- RAWAT, R.; KUMAR, S.; CHADHA, B. S.; KUMAR, D.; OBEROI, H. S. An acidothermophilic functionally active novel GH12 family endoglucanase from *Aspergillus nige* HO:purification, characterization and molecular interaction studies. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 107, p.103–117, 2015.
- ROSA, I. Z. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto. 2014.
- SAIBI, W.; GARGOURI, A. Purification and biochemical characterization of an atypical -glucosidase from *Stachybotrys microspora*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p.107–115, 2011.
- SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N.F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.
- SCOPES, R.K. Protein Purification principles and practice. 3. ed. New York: Springer, p. 380, 1994.
- SOUZA, F. H. M.; NASCIMENTO, C. V.; ROSA, J. C.; MASUI, D. C.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 272–278, 2010.
- VENTURI, L. L.; POLIZELI, M. L.; TERENZI, H. F.; FURRIEL, R. P. M.; JORGE, J. A. Extracellular β-d-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties. **Journal Basic Microbiology**, v. 42, p. 55-66, 2002.
- WILLIAMS, A.; FRASCA, V. Ion-Exchange Chromatography. **Current in Protein Science**, John Wiley & Sons, Ltd., p. 821-823. 2001.
- WOLOSOWSKA, S.; SYNOWIECKI, J. Thermostable β -glucosidase with a broad substrate specifity suitable for processing of lactose-containing products. **Food Chemistry**, v. 85, p. 181–187, 2004.

- WONG, P.; SRITIPPAYAWANB, S.; SUWANNAKHONC, N.; TAPPROM, A.; DEOISARES, R.; SANGUANSERMS, T. Q-Sepharose micro-column chromatography: A simple screening method for identifying beta thalassemia traits and hemoglobin E carriers. **Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 16–17, p. 1288–1291, 2016.
- ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. D. E. L.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. Beta-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. FEMS Microbiology Letter, v. 2, p. 137-143, 2004.
- ZHU, F. M.; DU, B.; GAO, H. S.; LIU, C. J.; LI, J. Purification and characterization of an intracellular β-glucosidase from the protoplast fusant of *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 626–632, 2010.
- YANG, S.; JIANG, Z.; YAN, Q.; ZHU, H. Characterization of a thermostable extracellular β-glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. **Journal Agric Food Chemistry**, v. 56, p. 602-608, 2008.

CAPITULO IV:

Trabalho realizado na Universidad Castilla-La-Mancha durante o estágio sanduíche entre Setembro de 2016 a Julho de 2017: Study of probiotic and biotechnological potential of non-saccharomyces yeasts from brazilian ecosystems.

E em co-autoria: Selection of potential non-*Sacharomyces* probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach.

STUDY OF PROBIOTIC AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF NON-SACCHAROMYCES YEASTS FROM BRAZILIAN ECOSYSTEMS

Isabel Zaparoli Rosa^{1*}, María Arévalo-Villena², Eleni Gomes¹, Ana Briones Pérez²

1. Microbiology Department.

Rua Cristóvão Colombo, 2265

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Ibilce

Bairro: Jardim Nazareth, 15054-000 - São José do Rio Preto, São Paulo - Brazil

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Isabel Zaparoli Rosa: belzaparoli@hotmail.com

Eleni Gomes: eleni@ibilce.unesp.br

2. Food Science and Technology Department.

Av. Camilo José Cela S/N

Edificio Marie Curie, 13071 Ciudad Real, Spain

Castilla-La Mancha University - UCLM

María Arévalo Villena: maria.Arevalo@uclm.es

Ana Briones Pérez: ana.Briones@uclm.es

Corresponding author: * Isabel Zaparoli Rosa: belzaparoli@hotmail.com

ABSTRACT

In order to obtain yeast strains no-saccharomyces with probiotic and biotechnological, strains were isolated from Brazilian biomes and identified in species and later differentiated at the level of strains. The 51 isolated strains were classified into 11 different species and within these species, some with diverse strains. Based on the differentiations using primers R3 and M13, 19 different strains were chosen to carry the work forward. Analyzes of resistance to gastrointestinal conditions showed the strains of the species Meyerozyma caribbica and Duitina rugosa as the most promising. In the self-aggregation tests it is possible to observe that almost all the strains studied presented a selfaggregation capacity superior to the positive controls, mainly two strains of the genus Rhodotorula that appear with a percentage auto-aggregation of more than 55%. Isolates were also examined for cell surface hydrophobicity property, and the results found in this work we have the yeasts Rhodotorula mucilaginosa, Meyerozyma caribbica and Diutina rugosa which presented a percentage of hydrophobicity above 30%. Among the desirable properties in a potential probiotic microorganism is the ability of adhesion to intestinal cells. From the results obtained, we can confirm the relationship between the presence of biofilm and a higher percentage of hydrophobicity. Of all strains of interest tested in the antimicrobial activity test only Duitina rugosa showed a formation of an inhibition halo against the contaminant *Dekkera bruxellensis*. In the fermentation experiment, seven types of sugars were used: glucose, lactose, galactose, cellobiose, arabinose, xylose and maltose, and of the total of 19 strains tested, only five of them did not show capacity to assimilate any of the seven sugars tested under aerobic and all strains tested showed assimilation of at least one of the sugars under anaerobic conditions. Another test carried out was the production of enzymes, seven tested in the whole, but positive results only for the enzymes amylase, pectinase and protease. And finally, in the melatonin test three strains were superior in relation to the others, which were Hanseniaspora opuntiae, Pichia kluyveri and Duitina rugosa. From all these results we can conclude that there are several species of yeast nosaccharomyces that present characteristics and good potential for industrial applications, especially in food industry.

HIGHLIGHTS

Search for new strains of non-Saccharomyces yeasts with probiotic and biotechnological potential.

KEYWORDS

Non-Saccharomyces, probiotic yeasts, gastrointestinal resistence, melatonin, enzymes, antimicrobian activity.

1. INTRODUCTION

In the last years, increasing attention has been devoted to the development of functional foods containing probiotic microorganisms for health promotion and disease prevention in the host (FADDA et al., 2017).

The definition of the term probiotics is found and detailed in numerous papers (MOSLEHI-JENABIAN, 2010; FAO/WHO, 2011; ANADÓN et al., 2016; HOLZAPFEL et al., 1998). According to the FAO (Food Agricultural Organization) and ISAPP (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics), the term is defined as microorganisms which, when administered in appropriate amounts, for example, inserted in foods or in a specific diet, confer benefits to your host (GARCIA-HERNANDEZ et al., 2012; ALVAREZ-CALATAYUD et al., 2016).

The yeasts of the genera *Sacchamoryces* are the most important representatives among probiotics, especially *S. boulardii*, but some authors have suggested the use of other yeast species or genera based essentially on their ability to survive during the passage through the human gastro-intestinal tract, their tolerance to low pH and bile salts, and their capability to control pathogenic microorganisms (MOSLEHI-JENEBIAN et al., 2010).

The impact of yeast on the production, quality and safety of food and drink is closely linked to its ecology and biological activities. With the recent advances in the understanding of the taxonomy, ecology, physiology, biochemistry and molecular biology of yeasts, consequently an increase in interest in the presence of these organisms in new products developed, so as the food industry develops the yeasts present new challenges for its control and exploration. One issue that needs to be looked at is food safety and the link between diet and health, so there is a growing interest in the use of yeasts as new probiotic and biocontrol agents and in the fortification of food nutrients (FLEET, 2007).

The relationship between yeasts and biotechnology is of immense importance, both in relation to the past and to future prospects. Their role in traditional food fermentation is unmatched in biotechnological relevance, with other mycoorganisms. The use of yeasts in biotechnological processes is increasing due to a number of properties, one of which is the fact that most

species of yeasts are not pathogenic to humans and animals, and thus have been more experienced and exploited, as well as their metabolic diversity and the fact that they are able to assimilate several organic compounds, guaranteeing great manipulation capacity for the production of enzymes (JOHNSON, 2013; SANTOS et al., 2012). Microbiological research focuses primarily on the pathogenic potential of microorganisms, while neglecting their positive role. Recent scientific advances have revealed the preponderant role of our own microbiota, skin, intestine and other mucous membranes (BOURDICHON et al., 2012).

In the last century Saccharomyces cerevisae played a prominent role in the biochemistry of sugar metabolism and purchased the most exploited organism in the world of industrial bioprocesses (WALKER, 2010). However other species have a fantastic yet poorly studied potential in biotechnology. There are more than 700 species of yeast that can play this role. An additional stimulus for the research of non-Saccharomyces yeasts has occurred in the last 15 years from its application as a host in the production of heterologous proteins (H. VAN DIJKEN, 2002). The genera Candida, Debariomyces, Hanseniaspora, Hansenula, Sporobolomyces, Kloeckera. Pichia, Metschnikowia. Saccharomyces, Bullera, Torulaspora, Rodotorula and Zygosacharomyces stand out as potential for the production of various enzymes such as cellulases, pectinases, lipases, proteases, xylanase and others. (CRUZ et al., 2009).

Fermentation is one of the oldest forms of food processing and preservation in the world. Since very early times, humans have been exploiting yeasts and their metabolic products (MOSLEHI-JENABIAN, 2010). The term fermentation was defined by Louis Pasteur as "La vie sans l'air" (life without air). From the biochemical point of view, fermentation is a metabolic process of deriving energy from organic compounds without the involvement of exogenous oxidizing agent. Thus fermentation plays different roles in food processing (BOURDICHON et al., 2012).

In recent years, the enzyme industry has grown considerably in the animal feed, fine chemicals and pharmaceuticals sectors, as well as in the biofuels and personal care industry. The main microorganisms producing enzymes are bacteria and filamentous fungi, the yeasts have a smaller number of representatives, these being mainly ascomycetes (JOHNSON, 2013).

When it comes to the production of enzymes by yeast, we find some essential advantages. The use of genetic manipulation, simple and effective sorting by adjusting cultivation conditions, short fermentation cycles, use of low cost fermentation media and the wide range of enzymes that can be produced and which are capable of catalyzing the same flexibility in the choice of strains and conditions of use (FARIAS; VITAL, 2008).

Another biotechnology point that has been explored in recent years is the use and presence of melatonin in food in the daily diet, such as fruits, olive oil, cow's milk, wine, beers; it is an amphiphilic molecule capable of reaching all compartments of the organism, traversing cell membranes, organelles, including mitochondria. Melatonin acts as a free radical neutralizer and stimulates the function of antioxidant enzymes, as well as the reduction of molecular damage in cells, the reduction of the generation of oxidizing products and the oxidative destruction of lipids and other molecules. In addition, the metabolites that are formed in reactions with antioxidants are also free radical neutralizers (REITER et al., 2007). Melatonin is an indolamine that is closely related to tryptamine and tryptophan. Like the biogenic amines, melatonins are formed from the metabolism of plants and microorganisms. However, there is a large difference between melatonin and the remainder of the biogenic amines, and the fact that no adverse effects from melatonin present in foods are described (RODRIGUEZ-NARANJO et al., 2012). These compounds are formed during the metabolism of plants, microorganisms and animals which occurs mainly by decarboxylation of an amonoacid or by amination and transamination of aldehydes and ketones (ASKAR; TREPTOW, 1986).

In the present study the probiotic and biotechnological potential of a collection of strains of yeasts, isolated from flower and fruit species from several Brazilian ecosystems, were investigated. Survival to GIT conditions and adhesion to human intestinal cells was evaluated in vitro. In addition, the ability to assimilate different sugars, antimicrobial capacity and production of enzymes with biotechnological potential were also measured. Finally, a test of melatonin production was also carried out by some of the selected strains.

2. MATERIALS AND METHODS

The yeast strains were isolated from São José do Rio Preto, Brasil – SP, from different species of fruits and flowers endemics to the region and now maintained in Laboratorio of Biotechnology of yeasts, UCLM culture collection. All strains were sent for species-level molecular differentiation as seen in Table 4. The focus of the isolation of these microorganisms was the collection of no-saccharomyces species. All yeasts were preserved with glycerol (20%), in freezing (80 °C). For use, each one was transferred to YPD agar plates (Yeast Peptone Dextrose), a general medium for yeast growth, and incubated at 30 °C for 48 hours.

Before the tests were started, the strains of the yeasts were submitted to identification at the species level, with the collaboration of the Laboratory of Instrumental Techniques of the University of León.

2.1. Identification of NO-Saccharomyces species by RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA)

After the strains from Brazil were identified at the species level, we proceed to the differentiation at the strain level. The basic rationale for the technique used is that a single 10 bp oligonucleotide is used, which is randomized with the DNA under study. To generate a RAPD fragment it is necessary that the two DNA strands under study have hybridization sites with the oligonucleotide at opposite orientations, close enough (less than 3000 bp) for amplification to occur.

The sequence of the oligonucleotide is random as are the hybridization sites, so the amplified sequence is Unknown. The polymorphism observed among different individuals consists of the presence or absence of amplified DNA fragments.

Thus, yeasts were subjected to the following:

1. Cellular lysate

In a microtube is incorporated a small portion of fresh colony of the yeast to identify. 10 μ L of a 10 mg/mL zymoliasis solution (20 T) in sorbitol (1.2 M) and sodium phosphate (40 mM) buffer, pH = 7, is added and incubated at 37 °C for 30 min, 95 °C for 5 min, and lastly the temperature is lowered to 4 °C until the tubes are collected. Immediately and after removing each microtube from the thermocycler, 90 μ L of cold Milli – Q water was added and it was kept at 4 °C. From this solution of 100 μ L of cell lysate, 1 μ L is required to perform the 10 μ L final volume PCR.

2. RAPDs Amplification

First, the R3 primer was used according to the conditions established by Corte et al., (2005). With respect to the quantities of reagents used, in order to minimize the expense thereof and improve the efficiency of PCR, it was found that an ideal proportion would be shown in Table 1.

Table 1. Quantity of the reagents for the RAPDs with the R3 primer

Reactive (stock concentration)	Volume reaction X1	Final Concentration
Reaction buffer without MgCl ₂ (10X)	1	1X
MgCl ₂ 50 mM	0.7	3,5 mM
dNTPs (10 mM)	0.2	0,2 mM
Primer R3(10 μM)	2.7	2,7 uM
BSA (100X)	0.1	1X
Amplitaq (5U/ μL)	0.1	0.5 U
Cellular lysate	1	-
H ₂ O	4.2	Until completed
Final volume	10 μΙ	

Secondly, to verify the results obtained with R3 primer, this time the M13 primer was used, the mixing conditions were performed according to Padilla et al., (2014) and the appropriate thermocycler conditions were adequate as shown in Table 2.

Table 2. Thermocycler conditions for M13 primer

Cicles	T °C	Time
1	94 °C	5 min
2	94 °C	1 min
	45 °C	1 min
	72 °C	1 min
35	94 °C	40 sec
	52 °C	1 min
	72 °C	3 min
2	72 °C	10 min
Cooling	4 °C	∞

3. Agarose gel electrophoresis

For the separation of DNA molecules, horizontal agarose gel electrophoresis (2% w/v) was performed.

2.2. Probiotic evaluation

2.2.1. In vitro resistance to gastro-intestinal conditions

The study's strains were grown separately in YPD broth at 30 °C/24 h. Cells were harvested by centrifugation (5000 rpm for 5 min at room temperature) and washed twice with PBS. Subsequently, a concentration of 10⁸ cfu/ml was resuspended in a solution which simulated gastric conditions (3 mg/ml pepsin and PBS pH 2) and were then incubated at 37 °C for 3 hours. After this time, an aliquot of 10 ul of the previous solution was inoculated in quadruplicate in the wells of a microtiter plate, where previously a mixture which simulates bowel conditions consisting of YPD broth (pH 8), 1.0 mg/ml of pancreatin and 0.5% bile salts (all sterilized by filtration) was added. White (standard) was composed of the gastric solution and the mix.The microtiter plate was placed in an automatic microplate spectrophotometer (ELx808 [™] Absorbance Microscope Reader) where every 30 min on 600 nm optical density reading was performed under similar conditions to that of the gut, ie, 37 °C for 22 h, thus obtaining the kinetics of growth of the samples.

This process satisfies the conditions of time and composition corresponding to a human digestive process (25 hours: three hours under stomach conditions + 22 hours under intestinal conditions). In each assay, and working with the positive controls, "whites" were used as well as a negative control (*Torulaspora delbrueckii*).

2.2.2. Autoagregation assays

Autoaggregation assays were performed according to the methodology described by Bautista-Gallego et al., (2012) with slight modifications. The strains of study were propagated separately, in 12 mL of YPD broth at 30 °C/24 h. The cells were harvested by centrifugation (5000 rpm for 5 min, at room temperature). The resulting biomass was resuspended in 12 ml of sterile saline and divided into two equal volumes in order to make duplicates of each sample. Both tubes were incubated at rest at 30 °C for 30 min. After this time and not moving, 1.0 ml aliquots were taken from the top of each tube and transfered to cuvettes where a measurement of the absorbance at 600 nm (Jasco V-530 spectrophotometer) was performed at times 0 and 30 minutes.

The auto-aggregation percentage was calculated as follows:

$$[1-(A_F/A_0)] \times 100\%$$

 A_F is the OD₆₀₀ at 30 min and A_0 is the OD₆₀₀ at inoculation time.

2.2.3. Cell Surface hydrophobicity

Hydrofobicity assays were performed according to the methodology described by Bautista-Gallego et al., (2012) with modifications. The strains of study were propagated separately in sufficient volume of YPD broth at 30 °C/24 h. Each sample was made in duplicate, so that the preculture was homogeneously distributed in two test tubes each with 10 ml. The pellet was recovered by centrifugation (5000 rpm for 5 min at room temperature) and washed with saline solution, then 10 mL of KNO₃ (0.1 M) was added (mixing the pool for 20 seconds). Taking an aliquot of the KNO₃ solution as blanked, the absorbance of each sample was read at 600 nm (Jasco V-530)

spectrophotometer). Previously, the samples were standardized (with appropriate dilutions) within an absorbance range of 0.90 to 1.01. After this step, 3 ml of toluene and xilene was added to all samples and allowed to stand for 60 min at 37 °C. Finally, and without moving, the absorbance of the aqueous fraction was measured at 600nm. The hydrophobicity percentage was calculated as follows:

$$[1-(A_F/A_0)] \times 100\%$$

Where A_F is the OD_{600} at 60 min and A_0 is the OD_{600} at inoculation time.

2.2.4. Biofilm Formation

The method followed is described by Speranza et al., (2011), with some modifications. For the monitoring of biofilm formation, a sample aliquot was inoculated into 45 mL of YPD in falcon flasks containing a sterile slide. This step is performed to obtain an initial population of 10⁶ cels/mL. After that there was incubation at 37 °C for 24 hours. After this time, each slide was washed with sterile water and introduced into a new falcon with 45 mL of sterile saline solution, an then was sonicated (ULTRASONIC PROCESSOR, QSONICA) for 3 minutes at 20% power and without pulses, in order to suspend the biofilm adhered to the walls of the slide in the medium. Subsequently, the cultures were made on the surface of the YPD medium, from different serial dilutions, in order to study the viability. Plates were incubated at 30 °C for 8 h. The results were expressed as log CFU/cm².

2.2.5. Silmulation of the transit. Effect on viability and biofilm formation

To simulate salivary conditions, yeasts were suspended in a sterile electrolyte solution (pH 6.5) containing 0.22 g l⁻¹ CaCl₂ (C. Erba, Milan, Italy), 6.2 g l⁻¹NaCl (C. Erba), 2.2 g l⁻¹KCl (J.T. Baker, Milan, Italy), 1.2 g l⁻¹ NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 100 mg l⁻¹ lysozyme (Sigma-Aldrich) (RUSSO et al., 2012), and incubated at 37 °C for 5 min (VIZOSO PINTO et al., 2006). Simulated

gastric juice (SGJ) was a saline solution (0.9% NaCl) buffered to pH 2.0 containing 3 g l⁻¹ of pepsin (porcine gastric mucosal, Sigma-Aldrich) (PRIYA et al., 2011). To simulate gastric conditions, yeasts were suspended in SGJ and incubated at 37 °C for 120 min (KOS et al., 2000) in an orbital shaker (~ 200 rpm) (PIZZOLITTO et al., 2012). Simulated intestinal fluid (SIF) was prepared by using 1 g l⁻¹ of pancreatin (porcine pancreas, Sigma-Aldrich) and 3 g l⁻¹ of bile extract (bile extract porcine, Sigma-Aldrich) in a simulated intestinal solution at pH 8, containing 6.5 g l⁻¹ NaCl, 0.835 g l⁻¹ KCl, 0.22 g l⁻¹ CaCl₂, 1.386 g l⁻¹ NaHCO₃) (PRIYA et al., 2011). Yeasts were suspended in SIF and incubated at 37 °C for 240 min (KOS et al., 2000) in an orbital shaker (~ 200 rpm) (PIZZOLITTO et al., 2012). The sequential assay was performed as reported by Armando et al., (2012), modified as follows. After exposure to salivary conditions, cells were harvested by centrifugation at 13,500 x g, 15 min at 25 °C, resuspended in SGJ and incubated at 37 °C for 120 min with shaking (~ 200 rpm). Then, cells were centrifuged at 13,500 x g/15 min at 25 °C, suspended in SIF and incubated at 37 °C for 240 min with shaking (~ 200 rpm). Following the sequence, the capacity of forming the biofilm was evaluated according to section 2.2.4.

2.2.6. Statistical analysis

Data analysis was performed in Excel 2013 software (Microsoft Corporation) and SPSS (IBM SPSS Stadistics 20) software. For the study of significant differences between the variables (p <0.05), the Duncan test was used. On the other hand, to allow the correlation between variables and to select those samples that meet the desired requirements, Principal Component Analysis (PCA) was used.

2.3. Antimicrobial activity

The strains were tested for antimicrobial activity against strains *Zygosaccharomyces* and *Dekkera bruxelensis* using the agar spot method described by Schillinger and Lücke (1989) with some modifications. Fresh cultures of zugo and dekkera were inoculated and whole surface of YEPD agar plates incubated for 24 h at 30 °C. Meanwhile, each strain to be tested was

grown in liquid YEPD medium at 30 °C for the same 24 h. After the incubation periods, the strains in liquid medium were inoculated (5 μ L) at 5 different sites of the plate already containing the yeast indicator. After 24 h of incubation at 30 °C it was observed whether there was occurrence of inhibition halos.

2.4. Screening of sugar fermentation

2.4.1. Under anaerobiosis

The assay was performed in quadruplicate on flat bottom Elisa plates. The pre-inoculation of the strains was done in 5 mL of YEPD medium (2% peptone, 1% yeast extract and 2% glucose) for 24 h at 30 °C and shaking at 150 rpm. After the cultures were grown, the pre-inoculum sugar was depleted in saline for 6 hours at 28 °C. After this time, 10⁶ cells/mL were transferred to 3 mL of saline (0.9%). Apart from that, 80 µL of solution of each of the sugars to be tested were separately added to each well of the plate, with the sugars being the only source of carbon. In addition to the sugar solution, 40 µL of bromocresol solution (0.17 g/L) was added. That done, the plate was taken to an incubator and held at 70 °C until the set volume was reduced (during approximately 15 hours). Now on the already reduced volume plate, 120 µl of each strain were inoculated and all were sealed with vaseline and incubated at 30 °C. Daily the color of the reaction was observed in order to verify or not, the turning of the coloration from blue to white. For the positive control glucose solution inoculated with Saccharomyces was used, since the negative control was saline solution without any inoculum.

2.4.2. Under aerobiosis

The same procedure was followed for the aerobiose assay, except that the bromocresol solution was not used and vaseline was not added in the wells.In this case, the assimilation verification of the sugars was performed through daily readings on microplate spectrophotometer (ELx808 ™ Absorbance Microscope Reader) during 5 days.

2.5. Enzymatic assays

2.5.1. β-glucosidase

For determination of β -glucosidase activity, 0.05 mL of the enzyme extract was added to the mixture of 0.25 mL of acetate buffer solution (0.1 M, pH 5.0) and 0.25 mL of 4-nitrophenol- β -D-glucopyranoside (4 mM) (PNPG, Sigma) (COSTON; LOOMIS, 1969). The reaction was maintained at 30 °C for 10 minutes, and then interrupted with the addition of 2.0 mL of Na₂CO₃ solution (2 M). The released nitrophenol was quantified by spectrophotometry at 410 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to release 1.0 µmol of nitrophenol per minute of reaction using a standard straight line obtained with nitrophenol solution at various concentrations.

2.5.2. β-xylosidase

 β -xylosidase activity was evaluated by the same procedure as described for β -glycosidase, except for substituting 4-nitrophenol- β -D-xylopyranoside (4 mM) (PNPX, Sigma) for the substrate and according to the method described by Kirikyali and Connerton, (2014).

2.5.3. Amilase

For the determination of amylases, 250 µl of a solution containing 1% starch in 0.5 M phosphate buffer and pH 7.0 were added to 250 µl of sample. The mixture was incubated for 60 minutes at 30 °C. Reducing sugars were then determined by the dinitrosalicyclic acid (DNS) technique. The reading was performed at 570 nm using glucose as standard (MILLER, 1959). One unit of enzyme activity corresponds to the amount of enzyme capable of releasing 0.1 mg/mL of reducing sugars under the conditions of the proposed method.

2.5.4. Pectinase

Polygalacturonase (PG) activity was evaluated in a mixture containing 0.8 mL of 0.2 M acetate buffer pH 5.0 containing 1% pectin (Kelco-Limeira) and 0.2 mL of crude enzymatic solution. The liberated reducing sugar (D-

galacturonic acid), after incubation of the reaction mixture at 30 °C for 10 min, was quantified by the DNS (3.5 dinitrosalicylic acid) method proposed by Miller (1959). One PG unit was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 mole of galacturonic acid per minute under the reaction conditions.

2.5.5. Protease

Protease activity was determined by the Azocasein technique proposed by Leightonet et al. (1973). In 250 μ L of a 1% solution of azocasein in phosphate buffer pH 8.0 and 0.2 M, 150 μ L of supernatant was added and incubated at 30 °C for 30 minutes. The reaction was Interrupted with 1.0 mL of 10% trichloroacetic acid. After centrifugation of the sample at 10,000 rpm for 10 minutes, 1.4 mL of a NaOH solution was added to 1.2 mL of the obtained supernatant. The reading was carried out at 440 nm. One unit of enzyme activity is the amount of enzyme that produces the change in one unit of reading per minute under the conditions of the proposed method.

2.6. Melatonin detección

The assay was carried out according to the methodology described in the Elisa Rat Melatonin (MT) Kit. Supernatants were collected from centrifugation of fresh pre-inoculums. On the plate contained in the kit, the number of wells to be used was selected (dupicata test); 50 μl of the supernatant, 50 μl of HRP-conjugate and then 50 μl of antibody were added to each well, the mixture was homogenized and maintained for one hour at 37 °C. After the incubation period, each well was aspirated with the aid of a pipette and tip and then taken three times with 200 μL Wash Buffer, allowing the solution to rest for ten seconds between each wash. After washing, make sure there is no buffer presence in the wells. The next step was to add 50 μL of substrate A and 50 μL of B in each well, then homogenizing. It was incubated at 37 °C for 15 minutes in the absence of light and without temperature fluctuations. At the end of the incubation period, the stop solution was added (50 μL) in each well, being lightly homogenized. The white was defined as a empty well . The optical density was determined after 10 minutes at 450 nm, and the results were analyzed

according to a curve made in the Curve Expert 1.3 program from the standards present in the Elisa Rat Melatonin (MT) Kit.

2.7. Statistical analysis

Data analysis was performed in Excel 2013 software (Microsoft Corporation) and SPSS (IBM SPSS Stadistics 20) software. For the study of significant differences between the variables (p <0.05), the Duncan test was used. On the other hand, to allow the correlation between variables and to select those samples that meet the desired requirements, Principal Component Analysis (PCA) was used.

In vitro resistance to gastrointestinal conditions was performed from the calculation of three parameters that provide valuable information for each strain.

These are:

- ODmax: Corresponds to the last measured absorbance. This parameter is relevant to find out how much growth can be in the colon.
- \bullet RATE (µmax): growth rate of the microorganism. It corresponds to the slope of the curve in the exponential phase.
- Generation time (N): time taken to duplicate the number of cells.
 (material y métodos).

3. RESULTS AND DISCUSSION

As mentioned in item 2, the strains come from isolates made from flowers and endemic fruits of the northwest region of the state of São Paulo, Brazil. According to Skinner et al., (1980), the natural microbiota of yeasts of fruits in general is composed of the genus Rhodotorula, Sporobolomyces, Cryptococcus, Torulopsis, Candida. Pichia. Hansenula. Kloeckera. Hanseniaspora and rarely Saccharomyces and by Schizosaccharomycesstrains. In relation to flowers, the most commonly Aerobasidium, Sporobolomyces, reported genera are Cryptococcus, Rhodotorula and Candida, as well as Debaryomyces, Wickerhamomyces, Metschnikowia, Starmerella and Hanseniaspora (LI et al., 1995; GLUSHAKOVA et al., 2014) what is convenient, since the focus of the work was precisely the search and study of non-saccharomyces strains.

Isolation was performed according to the procedure described by Da Silva (1992). The collected material was transferred directly to penicillin flasks containing 6,0 mL of YPD nutrient medium (Yeast Peptone Dextrose) at low pH, which were taken to the laboratory and kept in an oven at 30° C for 24 hours. After this period, samples were transferred, through exhaustion splines, to Petri plates containing YPD nutrient medium. The plates were incubated at 30 °C until the appearance of the colonies, which were differentiated by macro and microscopic characteristics and re-inoculated, by means of strips of depletion, in selection medium until obtaining pure cultures (PARKER et al., 2004).

The species identification carried out in partnership with the Laboratory of Instrumental Techniques of the University of León was carried out in the following way. First, DNA was isolated from each culture and then the region of interest (D1 / D2 or ITS) was amplified. Subsequently, the amplicon was purified and finally sequenced. In this way, the species identified and the number to which these strains correspond from the original numbering are in the table below.

Table 3. Strain differentiation at species level.

Identification	Insulation number
Meyerozyma	1, 4, 5, 6, 30, 31, 36
guilliermondii*	
Rhodotorula dairenensis	2
Rhodotorula mucilaginosa	7, 11, 13, 14, 16, 32, 49
Torulaspora delbrueckii	3
Candida quercitrusa	8, 17, 37, 48
Diutina rugosa	9, 12, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 33, 34, 40, 42,
	44, 45
Hanseniaspora opuntiae	18, 38, 39
Hanseniaspora thailandica	51
Pichia kluyveri	26
Meyerozyma caribbica	27, 29, 35, 47, 50
Candida oleophila	28

3.1. Identification of NO-Saccharomyces species by RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA)

Following the identification of the species, what followed was the differentiation of the strains and for this purpose, two primers, R3 and M13 The

groundwork for the technique is that it uses a single 10 bp oligonucleotide, which randomizes with the DNA under study. In order to generate a RAPD fragment it is necessary that the two DNA strands under study have hybridization sites with the oligonucleotide in opposite orientations, sufficiently close (less than 3000 bp) to allow amplification.

The sequence of the oligonucleotide is random as are the hybridization sites, so the amplified sequence is unknown. The polymorphism observed among different individuals consists of the presence or absence of amplified DNA fragments. The sequence of the oligonucleotide is random as are the hybridization sites, so the amplified sequence is unknown. The polymorphism observed among different individuals consists of the presence or absence of amplified DNA fragments.

Table 4. Result of the amplification using primers M13, R3.

Strains	Insulation number
Diutina rugosa	9, 12, 15, 20, 21, 24, 25, 33, 34
•	22
	23
	40 , 44
	42
	45
Rhodotorula mucilaginosa	7, <mark>11</mark> , 13, 14, 16
_	32
	49
Candida quercitrusa	8, 17, 37, <mark>48</mark>
Hanseniaspora opuntiae	18
	38, <mark>39</mark>
Meyerozyma caribbica	27, 29, <mark>35</mark>
	47, <mark>50</mark>
Rhodotorula dairenensis	2
Torulospora delbrueckii	3
Pichia kluyveri	26
Candida oleophila	28
Hanseniaspora thailandica	51

^{*}In red are those selected within a same group of equal strains.

Therefore, taking into account the species identified at the species level and that were unique within the group of isolates, and then adding the differentiated strains level through the primes assays, we had a total of 19 yeast

to carry out the project. Of which: 2, 3, 11, 12, 18, 22, 23, 26, 28, 32, 35, 39, 40, 42,45, 48, 49, 50 and 51.

Figure 1 shows an example of the PCR profiles and agglomerates of the strains which were subjected to the assay. Over the past few years, PCR-based molecular methods have proved useful and safe for identification and characterization of yeasts (FADDA et al., 2013). Our results confirmed this since, through this analysis, we obtained good discrimination among species of the same genus at the level of strains.

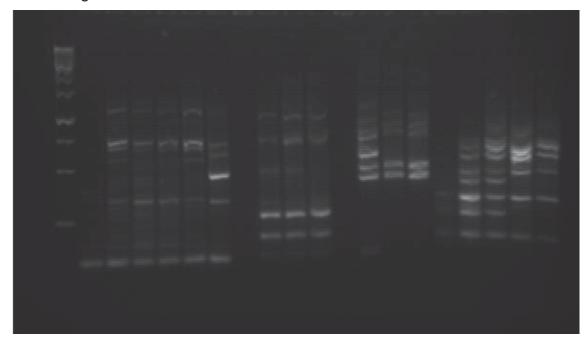


Figure 1. PCR profile of *Rhodotorula mucilaginosa* →7, 11, 13, 14, 16, 32, 49; Candida quercitusa →8, 17, 37, 48; Hanseniaspora opuntiae →18, 38, 39and Meyerozyma caribbica→27, 29, 35, 47, 50.

3.2. Probiotic evaluation

In addition to the 19 selected strains, in all the tests carried out in this phase of the work, positive controls were used, a commercial probiotic (control 1+) corresponding to *Saccharomyces boulardii* and a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (2 + control), belonging to the *Saccharomyces* yeast collection of the study group of yeast biotechnology of the UCLM, already used in previous studies where it presented probiotic characteristics (ARÉVALO-VILLENA et al., 2016).

3.2.1. In vitro resistance to gastro-intestinal conditions

The results were analyzed according to the kinetic parameters (item 2.7). After the sequential gastrointestinal process, two graphs of the growth kinetics of each yeast were obtained.

After the Anova and Duncan tests (with a significance level of 0.05) were performed in order to verify the significant differences among the study strains, it was verified that for the parameter rate, the strains with the best results were 45, 19, 40, 35, 12, 23, 34 and 32 so that there were no significant differences between them. However, for the ODmax parameter the strains that stood out were 39, 35, 40, 19, 12 and 45. Thus, comparing the data obtained from the analysis of both parameters, we can consider the strains 35 and 40 as the most promising.

3.2.2. Auto-aggregation assays

The process of auto-aggregation depends on several factors to occur. Physicochemical properties of cells, presence of Ca²⁺, mannose, genes encoding adhesion proteins, are some examples. The phenomenon often occurs when there is a lack of sugar in the medium after the exponential or stationary phase of cell growth. The autoaggression is mediated by molecules present on the cell surface, thus the composition of the wall directly affects, since the proportion of components can vary between one strain and another (GOSSENS; WILLAERT, 2010; GIL-RODRIGUEZ et al., 2015). Many of the studies with probiotic microorganisms were carried out with bacteria, however the search for yeasts for study object within the area has been increasing. Among the reasons, yeast cells are larger and heavier than bacteria and therefore they precipitate faster and in greater proportion.

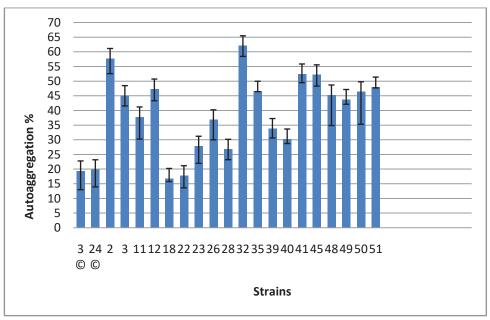


Figure 2. Autoaggregation capability.

As detailed in Figure 2, it is possible to observe that almost all the strains studied presented a auto-aggregation capacity superior to the positive controls, mainly two strains of the genus *Rhodotorula*, 32 and 2 (*Rhodotorula mucilaginosa* and *Rhodotorula dairenensis*, respectively) that appear with a percentage auto-aggregation of more than 55%. In the work of Gil-Rodrigues (2015), *Torulospora delbrueckii* obtained a value of 23.4% during the first hours of experiment, while in our study, a strain of the same species (number 3 in the figure 2) presented values of 45% of auto-aggregation. High percentages of auto aggregation mean that after the 30 minutes that were at rest the results of absorbance of the samples presented values lower than those found at time zero, confirming that the cells flocculated and precipitated.

3.2.1. Cell Surface hydrophobicity

Isolates were also examined for cell surface hydrophobicity property, which is considered another important factor in the adhesion and proliferation of microorganisms in intestinal epithelial cells (GROSSENS; WILLAERT, 2010). Figure 3.

In this experiment the points to be observed come from the addition of xylene, that it is an apolar molecule, so if the cells the cells are hydrophobic, it

retains the xylene and consequently we would have a low absorbance when we quantified the experiment. If they are hydrophilic, they release the xylene and the absorbance we observe when quantifying is high, once the cells are free in the reaction medium. From the probiotic point of view, high hydrophobicity of the cell surface explains why certain strains have a slower elimination kinetics of the gastrointestinal tract and also have different health effects (MARTINS et al., 2009).

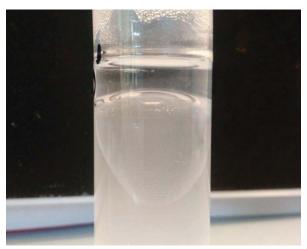


Figure 3. Example of a hydrophobicity process.

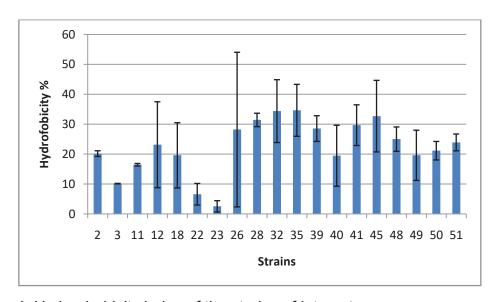


Figure 4. Hydrophobicity index of the strains of interest.

Among best results found in this work (Figure 4) we have the yeasts 32, 35 and 45, (*Rhodotorula mucilaginosa, Meyerozyma caribbica* and *Diutina rugosa*) which presented a percentage of hydrophobicity above 30%, a result

superior to that found in the work of García-Hernández et al., (2012), which in tests with the strain Wickerharomyces anomalus obtained Results of 25% hydrophobicity.

Table 5. Auto-aggregation (% Au) and hydrophobicity (% Hi) of yeast strain. Values expressed as mean and standard deviations.

Strains	Auto-aggregation capacity (% Au)	Hidrofobicity index (% Hi)
3 ©	19,41±6,40	37,15±3,07
24 ©	19,81±5,86	38,78±8,37
2	57,76±5,21	20,18±0,95
3	45,09±3,55	10,15±0,09
11	37,82±7,59	16,45±0,43
12	47,34±4,01	23,14±14,43
18	16,85±1,09	19,60±10,90
22	17,78±5,86	6,60±3,61
23	27,83±6,84	2,55±1,90
26	36,84±3,57	28,21±25,83
28	26,79±3,65	31,43±2,24
32	62,08±0,16	34,38±10,49
35	46,59±3,24	34,63±8,68
39	33,87±1,58	28,54±4,29
40	30,30±2,98	19,46±10,19
41	52,47±3,86	29,68±6,80
45	52,18±10,44	32,70±11,95
48	45,31±1,65	25,01±4,07
49	43,77±11,09	19,61±8,39
50	46,40±0,32	21,15±3,09
51	48,00±3,38	23,92±2,80

3.2.2. Biofilm Formation

Among the desirable properties in a potential probiotic microorganism is the ability of adhesion to intestinal cells which in turn provides advantages in colonization of the gastrointestinal tract (GIT).

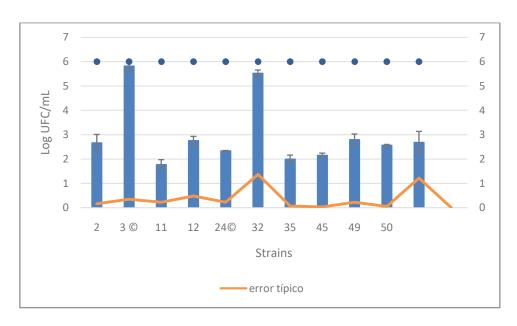


Figure 5 - Capacity of biofilm formation by strains. Strais 3 and 24 are positives controls.

Among the 20 strains tested, the biofilm formation was observed in the strains 2, 11, 12, 32, 35, 45, 49, 50 (Figure 5).

The capacity of biofilm formation is a feature of great importance, once it has been formed in the gastrointestinal tract, biofilm has the ability to protect mucosal surface. Flocculation frequently occurs after sugar depletion during exponential or late stationary growth phases. Some studies propose that the capacity of biofilm formation increases when there is increased hydrophobicity and when there is depletion of sugars (ZARA et al., 2004; GROSSENS; WILLAERT, 2010). From the results obtained, we can confirm the relationship between the presence of biofilm and a higher percentage of hydrophobicity, as seen in the Figure 5 and Table 5 with the strains 12, 35, 32, 45.

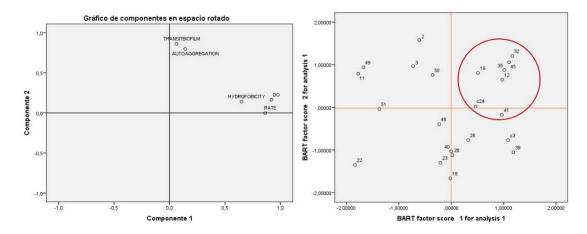


Figure 6. Analysis of the main components. Tests taken into account in this analysis: viability in the stomach and intestine, auto-aggregation, hydrophobicity and biofilm formation.

The analysis of the main components, which took into account the results of the behavior of the strains in the stomach/intestine tests, the autoaggregation and hydrophobicity capacities and the biofilm formation, gives us an overview of the best strains within these analyzed parameters. Thus, by Figure 6, in the upper right quadrant we have such strains encompassed.

3.2.3. Silmulation of the transit. Effect on viability and biofilm formation

For the complete intestinal transit test, strains were used that presented positive results for the biofilm formation experiment (item 3.2.2). In addition, a positive control (strain 3C) was used as observed in Figure 7.

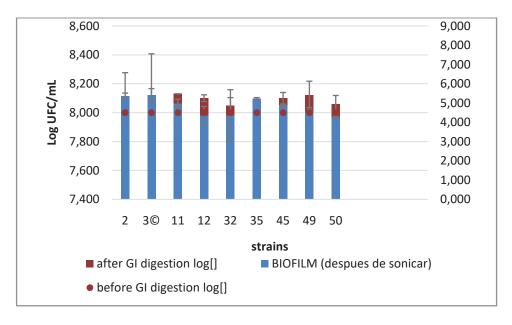


Figure 7. Analysis of complete intestinal transit. The strain classified as 3C in the graph is the positive control.

The results obtained after the evaluation of tolerance to acidic conditions, pepsin and bile salts in terms of the number of strains capable of surviving were

similar. According to the work of Gil-Rodriguez et al., (2015), most of the strains that resist the complete passage through the gastrointestinal tract belong to the species *Saccharomyces cerevisae*, but positive results have also been observed in other genera such as *Schizosaccharomyces*, *Pichia, Torulospora, Metschnikowia, Wickerhamomyces* and *Candida*. This makes it clear that more genera besides *Saccharomyces*, have a favorable probiotic potential.

When a particular yeast exhibits the ability to survive during passage through every human gastrointestinal tract (GIT) and adhere to intestinal cells, all its potential beneficial effects can also be achieved directly in the host, thus increasing the impact on human health.

3.3. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity tests were performed with all 19 strains. The tests were done using two species of contaminants, *Dekkera bruxellensis* and *Zygosaccharomyces*. Of all strains of interest tested, only strain 12 (*Duitina rugosa*) showed a formation of an inhibition halo. Figure 8.

Strains with antimicrobial activity against pathogens may be useful to ensure the hygienic quality of products to which they may be part as aggregated microorganisms. (FADDA et al., 2017). This ability to combat pathogens is an interesting technological feature, especially from the biotechnological point of view, since microorganisms could be used as biological control, food preservation, among other applications (ANTUNES; AGUIAR, 2012).

Very commonly deterioration in foods and beverages is observed and this is the result of microbial activity. The proliferation of microorganisms occurs when there is contact with the components of the products and depending on composition, storage conditions and temperature of them. Yeasts are organisms that sometimes have a greater resistance to more extreme conditions like variations of pH and presence of preservatives in the products, when compared to the bacteria for example. Thus, yeast contamination is observed in the food and beverage industry and this fact has led to a constant search for methods and protocols to address the problem. Much has been used of chemical additives to control the growth of organisms, but recently and

increasingly, other microorganisms have been used as a form of biological control (SUAREZ et al., 2007; VILLALBA et al., 2015; PORTUGAL et al., 2015).

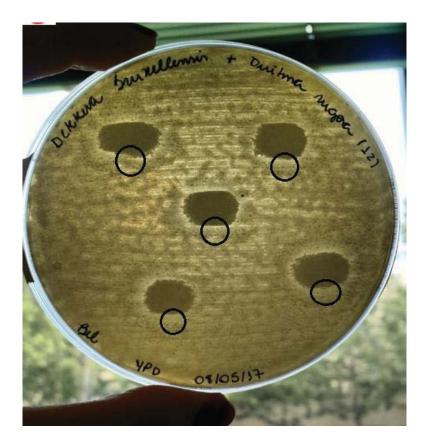


Figure 8 - Assay of antimicrobial capacity. *Dekkera bruxellensis* used as contaminant and *Duitina rugosa* (strain 12) as antimicrobial yeast.

3.2. Screening of sugar fermentation

The fermentative processes in which the yeasts participate have sugars among their components and the ability of the strains to assimilate high numbers of these compounds makes the yeast to be able to colonize several ecological niches (SANTOS, 2012).

3.2.1. Under anaerobiosis

Table 6 - Assimilation of sugars under anaerobic conditions.

	Glucose	Lactose	Galactose	Celobiose	Arabinose	Xylose	Maltose
Yeasts			Days			•	
2	1	-	-	-	-	-	6
3	1	-	4	-	-	-	-
11	2	-	4	-	-	-	-
12	2	5	3	5	4	5	6
18	-	-	3	2	-	-	4
22	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-
26	2	-	-	-	-	-	-
28	2	-	3	-	-	5	2
32	2	-	3	3	5	-	6
35	3	-	-	4	-	-	6*
39	-	-	-	-	-	-	-
40	2	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-
45	3	4	3	4	4	6*	-
48	2	-	3	-	-	-	3
49	3	-	5	-	-	-	-
50	2	-	3	4	4	6*	4
51	-	-	-	-	-	-	-

The color of the experiment was observed daily and for six days. The reagent used for indication of reaction was bromocresol blue. In case of a positive reaction, the staining of the whole was modified from blue to transparent, depending on the degree of assimilation presented by the strain. In case of a negative result, the set's heat remained the same, ie blue. In Figure 9 we have exposed the qualitative result of a group of strains tested in this test, where the reagent color change is evident. Already by the Table 6, it is possible to verify the days, in the case of positive results, in which the turns occurred in the coloration for each sugar experienced for each yeast.

In the assimilation experiment, seven types of sugars were used: glucose, lactose, galactose, cellobiose, arabinose, xylose and maltose under anaerobic conditions, and of the total of 19 strains tested, only five of them did not show capacity to assimilate any of the seven sugars tested. In Table 6 in red we have the strains with positive result, in which some assimilated more

and other less types of sugars. The best performance was seen with strain 12 (*Duitina rugosa*) capable of assimilating all sugars; followed by strains 32 (*Rhodotorula mucilaginosa*), 45 (*Duitina rugosa*) and 50 (*Meyerozyma caribbica*), which assimilated more than 5 each. According to the literature, the species *Duitina rugosa* is classified as unable to assimilate sucrose, maltose, cellobiose, lactose and arabinose, a result that differs from that presented in the present work. *Rhodotorula mucilaginosa* is described as presenting variable assimilation of some sugars, for example, glucose, maltose, cellobiose and arabinose, our results were positive for all these sugars, but negative for xylose, sugar whose assimilation by this species is described in the literature as positive (KURTZMAN; FELL, 1999).

In the work of Alves-Araujo et al., (2007), *Torulospora delbrueckii* was reported as an individual with very reduced growth capacity under anaerobic conditions, the opposite was verified in the present work, where the *T. delbrueckii* strain (3) totally assimilated the glucose in the first day and galactose on the fourth day. According to studies by Michel et al., (2016), strains of *T. delbrueckii* were only able to metabolize glucose, fructose and sucrose, another distinct result from that seen with strain 3, because in addition to glucose, the yeast also assimilated in anaerobiosis, the galactose.



Figure 9 - Example of evolution of one of the tests of assimilation of sugars under anaerobic conditions in six days of testing. Strains of the proof in question: Duitina rugosa (45), Candida quercitrusa (48), Rhodotorula mucilaginosa (49), Meyerozyma caribbica (50) and Hanseniaspora thailandica (51).

3.2.2. Under aerobiosis

In the assimilation assays under aerobic conditions, quantitative analyzes were performed using daily absorbance readings for six consecutive days. The same sugars were tested with the same strains of the anaerobic experiment.

Table 7 - Assimilation of sugars under aerobic conditions.

Yeasts	Aerobiosis	Anaerobiosis
2	glu, ara	glu, mal
3	glu	glu, gal
11	ara, <mark>glu</mark>	<mark>glu</mark> , gal
12	glu, lac	glu, lac, gal, mal, ara,
		cel, xyl
18	ara, <mark>cel</mark>	gal, <mark>cel</mark> , mal
22	gal, lac, mal	-
23	lac, gal	-
26	xyl, gal	glu
28	gal	glu, <mark>gal</mark> , mal, xyl
32	mal, xyl	glu, gal, cel, ara, <mark>mal</mark>
35	xyl, <mark>mal</mark> , gal	glu, cel, <mark>mal</mark>
39	lac	-
40	mal	glu
41	xyl, gal, lac, mal	-
45	xyl, mal	glu, gal, lac, cel, ara, <mark>xyl</mark>
48	xyl, mal, gal	glu, <mark>gal, mal</mark>
49	<mark>gal</mark> , ara, xyl	glu, <mark>gal</mark>
50	xyl, gal	glu, <mark>gal</mark> , mal, cel, ara,
	-	xyl
51	gal, mal	-

Ara-arabinose, cel-clobiose, gal-galactose, glu-glucose, lac-lactose, mal-maltose, xyl-xylose.

Different from that observed in the experiment performed under anaerobic conditions, in the tests in aerobiose all the strains tested showed assimilation of at least one of the sugars, this because some yeasts are not able to ferment sugars, being obligatorily aerobic. By making a parallel between the two experiments, in Table 7 we have in red the coincident sugars for both tests. Table 7 also shows that some strains are marked as potent assimilators, where the quantitative results were above the absorbance of 1:2 (*Rhodotorula dairenensis*), 3 (*Torulospora delbruekii*), 11 (*Rhodotorula mucilaginosa*), 28

(Candida oleophila), 32 (Rhodotorula mucilaginosa) and 35 (Meyerozyma caribbica).

The Crabtree effect describes a phenomenon whereby the respiratory growth of some types of yeasts such as *S. cerevisiae* is inhibited or repressed by the presence of hexoses, in particular glucose. This phenomenon, which depends on the concentration of glucose in the culture medium, determines the type of metabolic pathways that the cell adopts to obtain the ATP that supports its growth and survival. When glucose levels are elevated in the culture medium yeast consumes preferentially this nutritional substrate and only begins to use other sources of carbon, such as ethanol or glycerol when the glucose is depleted. In this way, a change in the slope of the exponential phase of the growth curve of Crabtree-positive yeasts is usually observed due to the lack of glucose in the medium (KURTZMAN; FELL, 1999; GONZALEZ et al., 2013; NELSON; COX, 2014). Although Torulaspora delbrueckii is described as crabtree-positive by several authors, respiration shows a great contribution to the metabolism in this species when compared to *S. cerevisiae* (GONZALEZ et al., 2013).

3.3. Enzymatic assays

During the execution of this work, enzymatic tests were performed for seven enzymes. However positive results only for the enzymes amylase, pectinase and protease. With the other enzymes, none of the strains tested were successful. But studies focused on the enzymatic profile of yeasts isolated from environmental samples, as well as on the present case, of flowers and fruits, demonstrate the capacity of many of these strains to configure as sources of several enzymes with biotechnological potential (FUENTEFRIA; VALENTE, 2004).

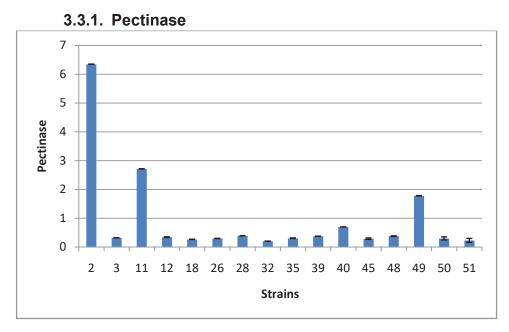


Figure 10 - Quantitative analyzes of the strains on the production of pectinase.

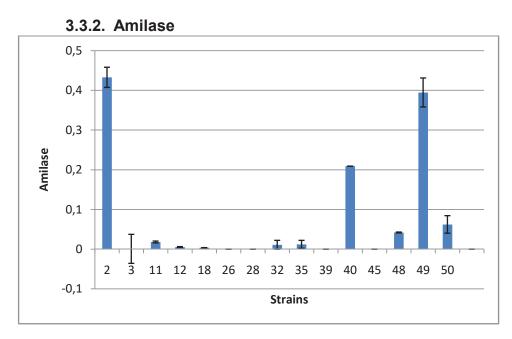


Figure 11 - Quantitative analyzes of strains on amylase production.

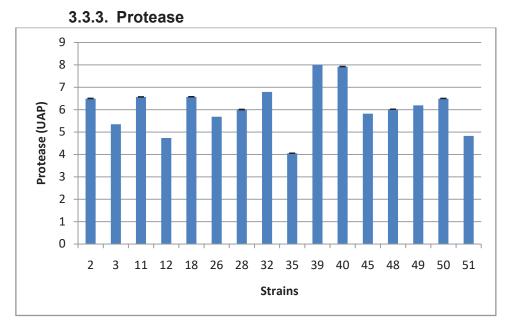


Figure 12 - Quantitative analysis of strains on protease (UAP).

.

There are many genera of yeasts that can offer a diversified enzyme apparatus and bioconversion skills. However each microorganism is unique and can develop a range of adaptations in contact with different substrates or conditions (BASSO et al., 2016), which would explain the absence of some enzymatic activities in the strains of interest of this work. The exchange of carbon and nitrogen sources or the test conditions would probably validate the experiments.

3.4. Melatonin deteccion

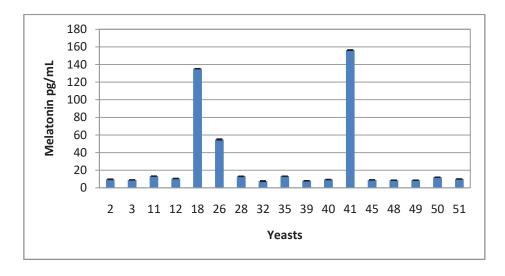


Figure 13 - Assessment of melatonin production by yeast strains.

Acording to the Figure 13 and confirmed in Table 8, in the melatonin detection test, three strains were superior in relation to the others, which were 18 (*Hanseniaspora opuntiae*), 26 (*Pichia kluyveri*) and 41 (*Duitina rugosa*).

Table 8 - Melatonin values detected.

Strains	Melatonin (pg/mL)
2	10±0,24
3	8,95±0,03
11	13,28±0,07
12	10,56±0,10
18	135,28±0,03
26	54,88±0,51
28	13±0,15
32	7,61±0,35
35	13,17±0,06
39	7,93±0,14
40	9,38±0,01
41	156,3±0,29
45	8,98±0,04
48	8,68±0,05
49	8,67±0,05
50	12,02±0,02
51	10±0,08

4. Conclusions

Yeasts offer several advantages compared to lactic bacteria, for example. Their enzymatic profile is more diverse, they appear to have a more versatile effect on the immune system, they provide protection against pathogenic bacteria and toxic compounds by surface binding and appear to be more suitable for nutritional enrichment. It is therefore important to find ways and continue the exploration for yeast strains that are capable of meeting all these characteristics, since some of these properties can not be replaced by other microorganisms (MOSLEHI-JENABIAN et al., 2010).

BIBLIOGRAFIA

ÁLVAREZ-CALATAYUD, G.; MARCOS, A.; MARGOLLES, A. Probióticos, prebióticos y salud: evidencia cientifica. **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 *Saccharomcyes cerevisiae* strains and its relation with ell thickness. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 256-264, 2012.

ASKAR, A.; TREPTOW, H. Biogene amine in Lebensmitteln. Ulmer, Stuttgart Vorkommem, 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.
- FUENTEFRIA, 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 entomorhilic plants of the Moscow region. **Microbiology**, v. 83, p. 125–134, 2014.
- GREPPI, A.; SAUBADE, F.; BOTTA, C.; HUMBLOT, 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 adhesionmechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letter**, v. 32, p. 1571–1585, 2010.
- GONZALEZ, R.; QUIRÓS, M.; MORALES, P. Yeast respiration of sugars by no-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 yeats i 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. Evalutaion of *Saccharomcyes cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1adsortion 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.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Selection of potential non-Sacharomyces probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach



Pilar Fernandez-Pacheco Rodríguez^a, María Arévalo-Villena^{a,*}, Isabel Zaparoli Rosa^b, Ana Briones Pérez^a

- a Food Science and Technology Department. Castilla-La Mancha University. Av. Camilo José Cela S/N. Edificio Marie Curie. Ciudad Real 13071. Spain
- b Microbiology Department, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas Ibilce Bairro: Jardim Nazareth, Rua Cristóvão Colombo, São Paulo 15054-000. Brazil

ARTICLE INFO

Keywords: Non-Saccharomyces Probiotic yeasts Gastrointestinal resistance Auto-aggregation Hydrophobicity Biofilm

ABSTRACT

Due to healthcare is increasing in nowadays, the use of the commercial probiotics is in progress and each day they are more demanded. The challenge of this study is to identify yeast species for using as probiotic organisms. Thus, the research applied a step-by-step approach, to study the probiotic potential of non-*Saccharomyces* yeast strains. The 215 yeasts were isolated from different environments such as wineries, oil mills, brines cheeses, fermented vegetables and distilleries in previous works and were identified to strain level by RAPD-PCR technique resulting 108 different strains. A general screening was carried out to know the probiotic capability of the yeasts, following the next steps: study of the ability to resist and grow of the yeasts when they exposed to simulated *in vitro* digestion conditions and influence of time, temperature, pH and the presence of enzymes on the kinetic growth parameters (lag phase (λ), generation time (G), maximum OD (OD_{max}) and the specific growth rate constant (μ_{max})). The results made possible the selection of the 23% of the strains and they were assayed for knowing their capability of self-aggregation and hydrophobicity. Biofilm formation capacity and viability after simulated sequential salivary-gastric-intestinal digestion were then studied for the 10 best strains. Statistical analyses were applied in each step to make the selection. The final results showed that two yeasts, *H. osmophila* and *P. kudriavzevii*, were the most promising strains.

1. Introduction

The Joint Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation (2001) define probiotics as "live microorganisms, which when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host". However, Hill et al., 2014, published a document on the appropriate use and scope of the term probiotic for clinicians and consumers in differentiating the diverse products on the market. They conclude that this clarification is needed for facilitating the advances in probiotic research and for ensuring that their benefits, will be properly communicated to consumers and patients.

Due to healthcare is increasing in nowadays, the use of the commercial probiotics is in progress and each day are more demanded. Probiotics can be delivered as drugs or through food. However, they must survive the conditions of the upper gastrointestinal tract and then persist in the intestine, to provide beneficial effects to the host. Some of the potential mechanisms by which yeast protect the host against pathogens include immune system stimulation, the induction of growth of

other probiotic organisms, degradation of bacterial toxins by the yeast's proteases and inhibition of pathogen adherence to gastrointestinal epithelial cells (Pérez-Sotelo et al., 2005; Arévalo-Villena, Fernández-Pacheco, Castillo, Bevilacqua, & Briones, 2018).

Most probiotics currently commercialised are of bacterial origin because the majority of yeasts are particularly sensitive to the gastro-intestinal tract conditions (Czerucka & Rampal, 2002). The challenge is identifying yeast species that could be considered probiotic organisms. Some yeasts have shown resistance to the gastrointestinal conditions, which, together with their antibiotic resistance (Blehaut, Massot, Elmer, & Levy, 1989), has made these eukaryotic organisms possible candidates for the development of new probiotics (Kourelis et al., 2010). For instance, the probiotic character of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii, in particular, is well documented (Blehaut, Massot, Elmer, & Levy, 1989; Czerucka & Rampal, 2002; Klein, Elmer, McFarland, Surawicz, & Levy, 1993). Perricone, Bevilacqua, Corbo, and Sinigaglia (2014) showed that this strain is able to survive at pH 2.5 in the presence of bile salts, displays a hydrophobic property and shows biofilm

E-mail addresses: Pilar.Fernandezpacheco@alu.uclm.es (P. Fernandez-Pacheco Rodríguez), Maria.Arevalo@uclm.es (M. Arévalo-Villena), Ana.Briones@uclm.es (A. Briones Pérez).

^{*} Corresponding author.

formation. Some authors have found that other *Saccharomyces* sp. also possess these properties (Pennacchia, Blaiotta, Pepe, & Villani, 2008; Pérez-Sotelo et al., 2005; Pizzolitto et al., 2012; Sourabh, Kanwar, & Sharma, 2012).

Besides Saccharomyces sp., recent studies have demonstrated the existence of other yeast species with probiotic potential, such as Wickerhamomyces anomalus (García-Hernández et al., 2012), Candida krusei, Kluyveromyces marxianus, Candida rugosa and Trichosporon asahii (Pedersen, Owusu-Kwarteng, Thorsen, & Jespersen, 2012) or Pichia kudriavzevii (Chelliah, Ramakrishnan, Prabhu, & Antony, 2016). Psani and Kotzekidou (2006) found that a large majority of Torulaspora delbrueckii and Debaryomyces hansenii strains tolerated high bile salt concentrations and inhibited the growth of several pathogens (Psani & Kotzekidou, 2006). Yeast strains Pichia membranaefaciens and Candida oleophila showed similar characteristics (Silva et al., 2011).

The aim of this research is to study the probiotic potential character of the non-Saccharomyces wild yeast strains isolated from different sources such as wineries, oil mills, brine cheeses, fermented vegetables and distilleries. For that tolerance to gastrointestinal conditions (pH, temperature, enzymes), auto-aggregation, hydrophobicity, biofilm formation and behavior after simulated sequential salivary-gastric-intestinal digestion were analysed. It is noted that each decision was made based on multifactorial statistical assay results.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains

A total of 215 yeasts belonging to various genera, such as Candida (10 species), Debaryomyces (3 species), Hanseniaspora (5 species), Kazachstania (2 species), Kluyveromyces (1 species), Lachancea (2 species), Metschnikowia (1 species), Ogataea (1 species), Pichia (9 species), Rhodotorula (1 species), Torulaspora (1 species), Yarrowia (1 species) and Zygosaccharomyces (3 species) were evaluated. The yeast strains are deposited in the culture collection of the Yeast Biotechnology Laboratory (University of Castilla-La Mancha, Spain) and maintained at -80 °C in a glycerol solution. All the strains were isolated in previous studies from food environment: winery, from white (Airen) or red (Cencibel) musts, at different stages of spontaneous fermentation (beginning or middle); oil mills from two different varieties (Arbequina and Cornicabra) being all of them from olive pastes and pomaces; brine chesses; different stages of vegetable fermentations and distillery plants sweet and fermented piquettes from ethanol production process (Barrajón, Arévalo-Villena, & Briones, 2009; Ortiz, Barrajón, Aalver-Baffi, Arévalo-Villena, & Briones, 2013; Romo Sánchez, Alves Baffi, Arévalo, Úbeda, & Briones, 2010; Úbeda, Maldonado Gil, Chiva, Guillamón, & Briones, 2014). As positive controls, a S. cerevisiae strain UCLM 3 with probiotic characteristics found by Arévalo-Villena et al. (2018) (control 1+) and a commercial probiotic S. cerevisiae var. boulardii strain (control 2+) were used.

For their use and before each assay, the strains were grown in YPD broth (Pronadisa-Conda) and incubated at 30°C for 48 h with a shaking incubator. The cell concentration was determined by enumeration of yeast cells, using a Thoma chamber. The cells were harvested by centrifugation at room temperature (5000 rpm for 5 min). After that, cells were washed with saline solution and the pellet was immediately use for the corresponding assay.

2.2. Differentiation of non-Saccharomyces strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)

Molecular identification included PCR reactions of 5.8S rRNA region gene with ITS1 and ITS2 primers followed by restriction pattern analysis (RFLP) were used to identify of yeasts at specie level. It is well known that some microbial properties are strain-dependent, so, to optimise the work, an initial identification of the 215 yeasts mentioned

above was made at the strain level. A cell pellet of each strain was treated with a zymolyase solution (10 mg/mL zymolyase 20 T in 1.2 M sorbitol buffer, 40 mM sodium phosphate buffer, pH 7). After incubation at 37°C/30 min and 95°C/5 min, a cell lysate was obtained. RAPD-PCR reaction was accomplished using primer R3 (5`ATGCAGCCAC3`) and 1 μ L of DNA in a final volume of 10 μ L, according to the conditions established by Corte et al. (2005), and primer M13 (5`GAGGGTGGCG GTTCT3`), using 1.5 μ L of DNA in a final volume of 15 μ L, under the conditions detailed by Padilla, Manzanares, and Belloch (2014). PCR amplification was performed in a Perkin – Elmer GeneAmp PCR System 2400. The amplified DNA was separated by electrophoresis in 2% w/v agarose gels and visualised by the gel Green (6×).

2.3. Growth kinetics under gastrointestinal conditions: preliminary probiotic screening

All strains were exposed to the gastrointestinal conditions described by Arévalo-Villena et al. (2018). For the gastric conditions, 8 log CFU/mL were inoculated in gastric solution (YPD containing 3 mg/mL pepsin in phosphate buffered saline, pH 2) and maintained at $37^{\circ}\text{C}/3$ h, under static conditions. Then, $10\,\mu\text{L}$ of this solution was transferred to an intestinal solution (YPD containing 0.5% bile salts and 1 mg/mL pancreatin in YPD broth, pH 8) and incubated at $37^{\circ}\text{C}/22$ h. Cell growth in the intestinal solution was evaluated at 600 nm, using an ELX808 Absorbance Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA). Measurements were taken every 20 min for 24 h, with an agitation period of 15 s before reading.

Growth curves were obtained by plotting optical density (OD) *versus* time. Kinetic parameters including lag phase (λ), generation time (G), maximum OD (OD_{max}) and the specific growth rate constant (μ_{max}) were calculated, using the model described by Warringer and Blomberg (2003).

2.4. Auto-aggregation capability

The method proposed by Bautista-Gallego et al. (2013), with slight modifications, was adopted to investigate the auto-aggregation. Briefly, the washed cell pellets from overnight cultures were resuspended in an equal volume of saline solution (0.9% NaCl) and incubated at $37^{\circ}\text{C}/30\,\text{min}$. Absorbance at 600 nm (Jasco V-530 spectrophotometer) of an aliquot taken from the upper suspension, both at time zero (inoculation time) (A₀) and 30 min (A_F) were measured. The auto-aggregation percentage was calculated as follows:

 $[1 - (A_F/A_0] \times 100\%$

2.5. Cell surface hydrophobicity

Hydrophobicity assays were performed according to the method described by Bautista-Gallego et al. (2013), with modifications. Cell biomass was suspended in 10 mL KNO $_3$ (0.1 M) and absorbance at 600 nm was measured (A $_0$). Then, 3 mL toluene and xylene, respectively, were added to independent samples. After incubation at 37°C min/60 min, without shaking, the absorbance of the interphase was measured (A $_F$). The hydrophobicity percentage was calculated as follows:

 $[1 - (A_F/A_0)] \times 100\%$

2.6. Biofilm formation

Biofilm formation was monitored as described by Speranza, Corbo, and Sinigaglia (2011), with modifications. A population of 6 log CFU/mL was inoculated in flasks with YPD and a sterile glass slide, and incubated at 37°C. After 24 h, each slide was aseptically removed, washed with sterile water and introduced into a flask containing 45 mL of

sterile saline solution. The samples were sonicated (Ultrasonic processor, Qsonica) for 3 min at a constant 20% power, to suspend the biofilm adhered to the surface slide. Cell viability was determined after seeding of the cells using an Eddy Jet 2 spiral seeding machine (IUL Instruments). Results were expressed as log CFU/cm².

2.7. Study of viability and biofilm formation of yeasts after sequential simulated digestion

Sequential simulated digestion was performed as reported by Armando et al. (2012), with the modifications proposed by Kos, Šušković, Goreta, and Matošić (2000) and Priya, Vijayalakshmi, and Raichur (2011). For the salivary conditions, a population of 8 log CFU/ mL was suspended in a sterile electrolyte solution containing 0.22 g/L CaCl₂, 6.2 g/L NaCl, 2.2 g/L KCl, 1.2 g/L NaHCO₃ (Sigma-Aldrich) and 100 mg/L lysozyme (pH 6.5), and incubated at 300 rpm/37 °C/5 min. After exposure to salivary conditions, cells were harvested by centrifugation (5000 rpm/25 °C/15 min), suspended in simulated gastric fluid (0.9% NaCl, buffered to pH 2.0 and containing 3 g/L pepsin [porcine gastric mucosal, Sigma-Aldrich]) and then, incubated at 37 °C/ 2 h with shaking (300 rpm). After gastric simulation, cells were harvested by centrifugation (5000 rpm/25 °C/15 min), and suspended in simulated intestinal fluid at 37 °C/4 h at 300 rpm, using an orbital shaker. The intestinal fluid was prepared by adding 1 g/L pancreatin (porcine pancreas, Sigma-Aldrich) and 3 g/L bile extract (porcine bile extract, Sigma-Aldrich) to a solution at pH 8, containing 6.5 g/L NaCl, 0.835 g/L KCl, 0.22 g/L CaCl₂ and 1.386 g/L NaHCO₃.

Before and after sequential simulated digestion, the loss of viability was evaluated by plate counting, and biofilm formation by the procedure described in section 2.6.

Experiments detailed from between Sections 2.3 to 2.7 were carried out by quadruplicate.

2.8. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test were applied to study the significant differences between the parameters found for each strain (p < 0.05). Correlations among the variables were identified by principal component analysis (PCA). All data analysis was performed with Excel 2013 (Microsoft Corporation) and SPSS (IBM SPSS Statistics 20).

3. Results and discussion

3.1. Differentiation of non-Saccharomyces strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)

Molecular techniques have been successfully applied by several authors to identify the yeast biodiversity in diverse environments, not only for species identification, but also for strains identification (Andrighetto, Psomas, Tzanetakis, Suzzi, & Lombardi, 2000; Grando, Ubeda, & Briones, 1994; Guillamón & Barrio, 2017; Suzzi et al., 2000; Úbeda, Maldonado Gil, Chiva, Guillamón, & Briones, 2014), due to the fact that probiotic activity it is associated to strain-level.

In the current study, isolates from the same yeast species showed different genetic polymorphisms that were effectively differentiated by RAPD-PCR. Consequently, the 215 original isolates were differentiated into 108 strains. Table 1 shows the species, number of isolates and number of strains identified by RAPD-PCR, as well as the nomenclature assigned to each strain.

3.2. Survival in simulated gastrointestinal digestion

The 108 non-Saccharomyces strains were evaluated to verify their capacity to survive a simulated gastrointestinal process, and their growth kinetic parameters were obtained. For a microorganism to be

considered as possessing potential probiotic character, it must arrive viable and functional in the large intestine. Hence, for initial discrimination, all yeasts with generation times $\geq 22\,\mathrm{h}$ were discarded (Dunne et al., 2001). Twenty-two hours was chosen as the cut-off value because this is the usual time required for the total gastrointestinal transit. In all, 25 strains (23% of the total) displayed a generation time < 22 h (Table 2). The remaining strains either did not grow at 37°C or did not tolerate acid pHs. Thus, the 25 possible candidate strains were further investigated by additional probiotic tests.

One factor ANOVA and Duncan's test was performed to identify the strains presenting the best experimental results. These tests indicated that for the lag phase (λ) ($\alpha=0.05$; F = 19.22; p = 0.00), the best strain belonged to subset 1, *C. pararugosa* (1231), with λ of 0.15 h. This was followed by subset 2, corresponding to strains belonging to *H. valbyensis* (1094), *K. thermotolerans* (1039), *P. anomala* (1082, 1090), *M. pulcherrima* (1012), *P. kudriavzevii* (1003, 1075), *C. vini* (1063), *Lachancea* sp. (1146) that had λ by 4,40–6, 45 and, also, the commercial probiotic (control 2+). Moreover, in subset 3, strains *H. osmophila* (1056), *K. thermotolerans* (1167), *Lachancea* sp. (1148) and *P. kudriavzevii* (1200) proved relevant, with λ ranging from 6.98 – 7.30 h. All other stains showed λ > 7.30 h.

For the generation and rate parameters ($\alpha=0.05$; F=8.34; p=0.00), the strains that presented the best values, were *K. thermotolerans* (1167), *Lachancea* sp. (1148), *H. osmophila* (1056), *Z. fermentati* (1134), *P. kudriavzevii* (1200), *Z. fermentati* (1142), *Z. bailii* (1213) and *Lachancea* (1146), besides control 1+. Moreover, these strains had higher growth rates than the commercial yeast. Finally, for the parameter OD_{max} , ($\alpha=0.05$; F=9.41; p=0.00) the strains with the best values were *H. osmophila* (1056), *Lachancea* (1148), *T. delbrueckii* (1055), *Z. fermentati* (1134), *Lachancea* (1146), *P. kudriavzevii* (1200), *P. Caribbica* (1135), *P. kudriavzevii* (1003), *K. thermotolerans* (1167), *Z. fermentati* (1187), as well as the controls (Table 2).

Considering the various parameters evaluated, strain *Lachancea* (1146) was the only one within the first two subsets that revealed the best generation, being, therefore, the one with the best kinetic characteristics, followed by *H. osmophila* (1056), *Lachancea* (1148), *K. thermotolerans* (1167) and *P. kudriavzevii* (1200). PCA verified these results (Fig. 1 and Table 3), where the five strains with the better aptitudes were included in the indicated zone. Moreover, these strains performed better than the controls. As expected, the parameters μ_{max} and OD_{max} presented values directly proportional among the best strains.

Other authors showed good results for *W. anomalus* (García-Hernández et al., 2012), *P. kudriavzevii* that tolerated physiological concentrations of bile salts, pepsin and pancreatin (Chelliah, Ramakrishnan, Prabhu, & Antony, 2016) or a large number of *T. delbrueckii* and *D. hansenii* strains tolerated high bile salt concentrations (Psani & Kotzekidou, 2006).

3.3. Auto-aggregation assays

The ability to adhere to epithelial cells and mucosal surfaces and, thereby, decrease or prevent the colonisation of pathogens has been suggested to be an important property of many probiotic strains (Vine et al., 2004). In most instances, aggregation ability was associated with cell adherence properties (Boris, Suárez, & Barbés, 1997). Cell aggregation between microorganisms of the same strain (auto-aggregation) or between different strains (coaggregation) is of considerable importance in several ecological niches. Recent studies have demonstrated that there are many yeast strains with very high auto-aggregation rates (Arévalo-Villena et al., 2018; Binetti, Carrasco, Reinheimer, & Suárez, 2013; Chelliah, Ramakrishnan, Prabhu, & Antony, 2016).

In this research, the controls and the 25 strains identified from the initial screening tests as potential probiotic candidates were tested for their ability to self-aggregate (Table 4). The auto-aggregation percentages were highly variable, ranging from 3.85 – 64.43%. *H. osmophila*

Table 1
Strains of each specie, its nomenclature and source of isolation.

Species	I	St	Nomenclature	Species	I	St	Nomenclature
Candida lactis-condensi	4	2	1113 ^D ,1115 ^D	Kluyveromyces thermotolerans	12	6	1007 ^W ,1039 ^W ,1093 ^D , 1109 ^D ,1167 ^V ,1186 ^W
C. ethanolica	4	3	1099 ^D ,1104 ^D ,1111 ^D	Lachancea sp.	4	2	1146 ^M ,1148 ^M
C. apícola	8	8	1054 ^W ,1064 ^W ,1065 ^W , 1066 ^W ,1067 ^W ,1068 ^W , 1070 ^W ,1071 ^W	L. thermotolerans	1	1	1189 ^M
C. diddensiae	1	1	1154 ^M	Metschnikowia pulcherrima	5	4	1002 ^W ,1004 ^W ,1005 ^W , 1012 ^W
C. pararugosa	5	3	1228 ^c ,1231 ^c ,1237 ^c	Ogataea polymorpha	1	1	1087 ^D
C. sake	1	1	1107 ^D	Pichia anomala	6	3	1082 ^D ,1089 ^D ,1090 ^D
Candida sp.	2	2	1151 ^M ,1152 ^M	P. galeiformes	7	5	$1081 {}^{\mathrm{D}},\!1101 {}^{\mathrm{D}},\!1102 {}^{\mathrm{D}},1110 {}^{\mathrm{D}},\!1112 {}^{\mathrm{D}}$
C. stellata	3	2	1016 ^W ,1003 ^W	P. holstii	6	3	1169 ^M ,1176 ^M ,1188 ^M
C. thermophila	1	1	1179 ^M	P. caribbica	14	3	1135 ^M ,1162 ^M ,1181 ^M
C. vini	1	1	1063 ^W	P. galeiformes	10	1	1081 ^D
Debaryomyces hansenii	8	5	1001 ^c ,1225 ^c ,1235 ^c , 1236 ^c ,1240 ^c	P. kudriavzevii	12	5	1003 ^W ,1075 ^D ,1084 ^D , 1085 ^D ,1200 ^W
D. pseudopolymorphus	1	1	1072 ^W	P. membranaefaciens	8	3	1006 ^W ,1019 ^W ,1091 ^D
D. polymorphus	1	1	1053 ^W	P. mississippiensis	2	1	1091 ^D
Hanseniaspora meyery	1	1	1079 ^D	P. occidentalis	8	4	1203 ^V ,1206 ^V ,1208 ^V , 1212 ^V
H. osmophila	15	5	1056 ^D ,1076 ^D ,1094 ^D ,1117 ^D , 1118 ^D	Rhodotorula mucilaginosa	2	3	1017 ^W ,1047 ^W ,1229 ^C
H. valbyensis	1	1	1077 ^D	Torulaspora delbrueckii	17	4	1018 ^W ,1055 ^W ,1073 ^D , 1192 ^W
H. guillermondii	4	2	1035 ^D ,1199 ^D	Yarrowia lipolitica	2	1	1222 ^C
H. uvarum	8	5	1032 ^D ,1033 ^D ,1034 ^D , 1083 ^D ,1096 ^D	Zygosaccharomyces fermentati	18	7	1061 ^W ,1086 ^D ,1134 ^W , 1142 ^W ,1157 ^W ,1171 ^W , 1187 ^W
Kazachstania exigua	2	1	1220 ^W	Z. bailii	4	3	1098 ^D ,1213 ^V ,1214 ^V
K. unispora	4	1	1216 ^V	Z. florentinus	1	1	1183 ^M

I: number of isolates; St: number of strains.

Table 2 Kinetic parameters obtained for strains with generation times (G) $< 22 \, h$.

Species	Strain nomenclature	λ (h)	μ (1/h)	G (h)	OD _{max} (nm)
Control 1+	3	8.75 ± 1.25 ^{fghi}	0.16 ± 0.05 ^{hijkl}	1.99 ± 0.47 ^a	1.37 ± 0.13^{i}
Control 2+	24	$5.40 \pm 0.73^{\text{bcd}}$	$0.09 \pm 0.03^{\text{bcdef}}$	4.18 ± 2.84^{bc}	$1.05 \pm 0.47^{\text{defghi}}$
P. kudriavzevii	1003	$6.32 \pm 0.16^{\text{bcdef}}$	$0.10 \pm 0.03^{\text{cdefgh}}$	3.26 ± 0.89^{ab}	$1.07 \pm 0.21^{\text{defghi}}$
M. pulcherrima	1012	$5.55 \pm 4.75^{\text{bcd}}$	$0.09 \pm 0.00^{\text{bcdefg}}$	3.23 ± 0.10^{ab}	0.82 ± 0.16^{bcde}
P. membranaefaciens	1019	14.30 ± 1.28^{lm}	0.08 ± 0.02^{abcde}	3.84 ± 1.00^{ab}	0.92 ± 0.28^{bcdef}
K. thermotolerans	1039	5.13 ± 1.04^{bc}	0.10 ± 0.01^{cdefgh}	2.89 ± 0.18^{ab}	1.00 ± 0.17^{cdefgh}
T. delbrueckii	1055	11.68 ± 1.66^{jk}	$0.15 \pm 0.07^{\text{fghijk}}$	2.38 ± 1.07^{ab}	1.31 ± 0.11^{ghi}
H. osmophila	1056	$6.98 \pm 0.35^{\text{cdefg}}$	0.21 ± 0.02^{kl}	1.46 ± 0.17^{a}	1.38 ± 0.04^{i}
C. vini	1063	$6.20 \pm 0.50^{\text{bcde}}$	$0.08 \pm 0.02^{\text{bcde}}$	3.78 ± 0.93^{ab}	0.72 ± 0.30^{bcd}
P. kudriavzevii	1075	$6.15 \pm 0.00^{\text{bcde}}$	$0.11 \pm 0.01^{\text{defghi}}$	2.64 ± 0.20^{ab}	0.97 ± 0.15^{bcdefg}
P. galeiforms	1081	12.02 ± 0.75^{k}	0.04 ± 0.01^{abc}	7.93 ± 2.02^{d}	0.80 ± 0.45^{bcde}
P. anomala	1082	5.15 ± 0.00^{bc}	$0.09 \pm 0.02^{\text{bcdef}}$	3.44 ± 0.53^{ab}	0.93 ± 0.18^{bcdef}
O. polymorpha	1087	8.15 ± 0.00^{efgh}	0.05 ± 0.01^{abcd}	6.43 ± 1.34^{cd}	0.67 ± 0.45^{bc}
P. anomala	1090	$5.30 \pm 3.23^{\text{bcd}}$	0.16 ± 0.04^{ghijk}	1.97 ± 0.53^{a}	0.93 ± 0.29^{bcdef}
H. osmophila	1094	$4.40 \pm 0.50^{\rm b}$	$0.13 \pm 0.04^{\text{efghij}}$	2.59 ± 0.93^{ab}	0.83 ± 0.04^{bcde}
C. sake	1107	9.35 ± 3.01^{ghij}	0.03 ± 0.01^{ab}	$12.64 \pm 5.86^{\rm e}$	0.81 ± 0.44^{bcde}
Z. fermentati	1134	10.88 ± 0.85^{ijk}	0.20 ± 0.01^{kl}	1.51 ± 0.11^{a}	$1.29 \pm 0.03^{\text{fghi}}$
P. caribbica	1135	9.48 ± 0.83^{hij}	$0.15 \pm 0.01^{\text{fghijk}}$	1.97 ± 0.07^{a}	1.16 ± 0.15^{efghi}
Z. fermentati	1142	9.48 ± 0.47^{hij}	0.17 ± 0.02^{ijkl}	1.74 ± 0.16^{a}	0.61 ± 0.04^{b}
Lachancea sp.	1146	$6.45 \pm 0.00^{\text{bcdef}}$	0.17 ± 0.13^{ijkl}	1.74 ± 0.14^{a}	$1.20~\pm~0.04^{\rm fghi}$
Lachancea sp.	1148	$7.30 \pm 0.17^{\text{cdefgh}}$	0.22 ± 0.01^{kl}	1.46 ± 0.45^{a}	1.35 ± 0.07^{hi}
Candida sp.	1151	$15.80 \pm 4.74^{\rm m}$	0.02 ± 0.01^{a}	$18.57 \pm 6.01^{\rm f}$	0.03 ± 0.01^{a}
K. thermotolerans	1167	$7.15 \pm 0.00^{\text{cdefgh}}$	0.23 ± 0.01^{kl}	1.31 ± 0.03^{a}	$1.04 \pm 0.07^{\text{defgh}}$
Z. fermentati	1187	$7.80 \pm 1.76^{\text{defgh}}$	$0.12 \pm 0.02^{\mathrm{defghi}}$	2.67 ± 0.41^{ab}	$1.06~\pm~0.06^{\rm defgh}$
P. kudriavzevii	1200	$7.33 \pm 1.17^{\text{cdefgh}}$	0.19 ± 0.11^{jkl}	2.43 ± 1.80^{ab}	1.12 ± 0.23^{efghi}
Z. bailii	1213	12.81 ± 0.58^{kl}	0.17 ± 0.01^{ijkl}	1.73 ± 0.12^{a}	0.94 ± 0.14^{bcdef}
C. pararugosa	1231	0.15 ± 0.00^{a}	0.04 ± 0.00^{abc}	8.21 ± 0.36^{d}	0.20 ± 0.05^{a}

Indicate in bold those strains that present the best results for at least one of the parameters. Different letter indicate significantly differences between strains for each parameter.

(1056) and *C. pararugosa* (1231) provided the best results, with a self-aggregation of 64.43 and 63.34%, respectively, which were statistically similar ($\alpha=0.05$; F = 17.53; p = 0.00). Thus, ten strains, including 1134, 1090, 1003, 1094, 1213, 1019, 1063, 1039 and 1231 exhibited a higher auto-aggregation than the controls, with values ranging from 26.05 – 64.43%. There were no significant differences among the strains despite the majority of the strains having 5 to 20% auto-aggregation.

Gil-Rodríguez, Carrascosa, and Requena (2015) found that the autoaggregation for one strain of *T. delbrueckii* was 21.4%, a result comparable with our *T. delbrueckii* strain (1055) (19.06%). *S. cerevisiae* obtained from traditional fermented foods of the Western Himalayas (Sourabh, Kanwar, & Sharma, 2011, 2012) showed an auto-aggregation ability of about 67.54% in 20 h. Some studies observed auto-aggregation values of around 70% in 2 h (Binetti, Carrasco, Reinheimer, & Suárez, 2013; Gil-Rodríguez, Carrascosa, & Requena, 2015). In contrast, results of the present study showed certain strains that achieved between 41 and 64% auto-aggregation, at only 30 min of incubation. Auto-aggregation is dependent on the strain and its cell wall composition because this property is mediated by cell-surface molecules, which

C: brine cheese; D: distillery; V: fermented vegetables; M: oil mill; W: Winery.

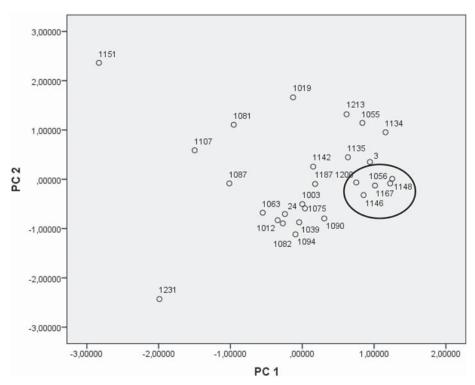


Fig. 1. Principal Component Analysis run on the fitting parameters of Warringer and Blomberg (2003) recovered for all the strains.

Table 3 Contribution of the highly correlated variables and their loadings in principal components 1 and 2.

Principal component	Variance explained (%)	Total variance (%)	Most highly correlated	Loading
1	63.08	63.08	G	-0.89
			λ	-0.05
2	25.84	88.92	G	0.31
			μ	0.02
			OD_{max}	0.04

could explain the differences in the values found among the yeasts. The ability to self-aggregate within 30 min, as demonstrated by certain strains in this study, could be an advantage, considering that during their passage through the gastrointestinal tract they may rapidly adhere to the mucosa before being expelled.

3.4. Cell surface hydrophobicity

The 25 selected strains and the controls were tested for their hydrophobicity, using two solvents, toluene and xylene. These solvents have an apolar character, and the greater the solubility of the cells in these solvents, the greater the degree of hydrophobicity.

For xylene (Table 5), the hydrophobicity values ranged from 3.16-54.16%. The strains that presented the best results were *Z. bailii* (1213) and *C. pararugosa* (1231), with > 50% hydrophobicity. Control 1+ showed 38.74% hydrophobicity, followed by strains *P. kudriavzevii* (1003) and *T. delbrueckii* (1055), possessing about 37% hydrophobicity.

For toluene (Table 5), the results ranged between 3.12 and 35.11%. Five strains (1063, 1094, 1146, 1167 and 1213) showed values higher than control 2+ (32.41%). Yeasts 1056, 1081, 1082, and 1090 showed about 30% hydrophobicity, which was greater than control 1+ (26.68%) although there were not significantly differences. These results are superior to that found for W. Anomalus, of 25% hydrophobicity, using toluene as the solvent (García-Hernández et al., 2012).

Table 4 Auto-aggregation of each strain.

Species	Strain	Auto-aggregation (%)	Species	Strain	Auto-aggregation (%)
Control 1+	3	19.81 ± 5.86 d,e,f,g	H. osmophila	1094	32.05 ± 3.25 g,h,i
Control 2+	4	$19.41 \pm 6.40^{c,d,e,f,g}$	C. sake	1107	15.80 ± 3.85 ^{a,b,c,d,e,f}
P. kudriavzevii	1003	30.36 ± 4.90 g,h,i	Z. fermentati	1134	$26.05 \pm 4.50^{\text{ e,f,g,h}}$
M. pulcherrima	1012	12.77 ± 7.55 ^{a,b,c,d}	P. caribbica	1135	7.34 ± 5.19 ^{a,b,c,d}
P. membranaefaciens	1019	41.38 ± 8.02^{i}	Z. fermentati	1142	4.09 ± 2.83^{a}
K. thermotolerans	1039	43.11 ± 13.57^{i}	Lachancea sp.	1146	$6.06 \pm 1.50^{a,b,c}$
T. delbrueckii	1055	$19.06 \pm 0.10^{b,c,d,e,f,g}$	Lachancea sp.	1148	13.97 ± 5.39 ^{a,b,c,d,e}
H. osmophila	1056	$64.43 \pm 12.70^{\text{ j}}$	Candida sp.	1151	$5.70 \pm 3.63^{a,b}$
C. vini	1063	41.62 ± 2.05^{i}	K. thermotolerans	1167	13.83 ± 9.39 a,b,c,d,e
P. kudriavzevii	1075	4.84 ± 0.85^{a}	Z. fermentati	1187	$9.40 \pm 2.09^{a,b,c,d}$
P. galeiforms	1081	$12.07 \pm 0.00^{a,b,c,d}$	P. kudriavzevii	1200	$27.84 \pm 0.78^{f,g,h}$
P. anomala	1082	$11.05 \pm 9.87^{a,b,c,d}$	Z. bailii	1213	$34.70 \pm 2.53^{h,i}$
O. polymorpha	1087	3.85 ± 0.71^{a}	C. pararugosa	1231	$63.34 \pm 11.18^{\text{ j}}$
P. anomala	1090	$28.12 \pm 5.83^{f,g,h}$			

Different letter indicate significantly differences between strains.

Table 5Hydrophobicity of each strain with xylene and toluene

Species	Strains	Hydrophobicity (%)	
		Xylene	Toluene
Control 1+	3	38.74 ± 8.37 h	26.68 ± 4.86 c,d,e,f,g,h
Control 2+	24	37.15 ± 3.07^{h}	32.41 ± 8.36 g,h
P. kudriavzevii	1003	37.90 ± 0.92^{h}	$10.55 \pm 7.37^{a,b,c}$
M. pulcherrima	1012	$15.22 \pm 4.20^{b,c,d}$	15.05 ± 5.92 a,b,c.d,e,f
P. membranaefaciens	1019	$33.04 \pm 5.57^{g,h}$	15.66 ± 4.37 a,b,c,d,e,f,g
K. thermotolerans	1039	31.12 ± 2.29 f,g,h	25.25 ± 10.85 b,c,d,e,f,g,h
T. delbrueckii	1055	37.41 ± 5.39 h	$19.34 \; \pm \; 2.66^{a, \; b,c,d,e,f,g,h}$
H. osmophila	1056	31.51 ± 7.53 g,h	27.64 ± 12.77 c,d,e,f,g,h
C. vini	1063	$30.81 \pm 1,56$ f,g,h	33.09 ± 19.57 ^h
P. kudriavzevii	1075	$22.09 \pm 3.11^{d,e,f}$	$11.03 \pm 0.52^{a,b,c}$
P. galeiforms	1081	$21.49 \pm 0.97^{\text{d,e}}$	$29.60 \pm 1.80^{d,e,f,g,h}$
P. anomala	1082	$23.84 \pm 1.70^{\text{d,e,f,g}}$	$31.45 \pm 10.37^{e,f,g,h}$
O. polymorpha	1087	$10.55 \pm 2.67^{a,b,c}$	$5.44 \pm 0.60^{a,b}$
P. anomala	1090	$30.47 \pm 3.28^{e,f,g,h}$	31.97 ± 7.44 f,g,h
H. osmophila	1094	32.52 ± 0.03 g,h	32.80 ± 7.50 g,h
C. sake	1107	$6.64 \pm 4.26^{a,b,c}$	13.35 ± 2.63 a,b,c,d
Z. fermentati	1134	$10.33 \pm 0.64^{a,b,c}$	8.02 ± 2.22^{a}
P. caribbica	1135	3.16 ± 2.63^{a}	10.76 ± 9.45 ^{a,b,c}
Z. fermentati	1142	$8.18 \pm 2.62^{a,b,c}$	3.12 ± 2.84 ^a
Lachancea sp.	1146	6.38 ± 1.95 a,b,c	33.24 ± 5.58 h
Lachancea sp.	1148	15.75 ± 4.58 c,d	5.82 ± 0.05^{a}
Candida sp.	1151	$6.01 \pm 2.53^{a,b}$	14.71 ± 4.27 ^{a,b,c,d,e}
K. thermotolerans	1167	10.41 ± 0.95 a,b,c	3.67 ± 15.03 g,h
Z. fermentati	1187	$10.26 \pm 2.56^{a,b,c}$	8.28 ± 1.85^{a}
P. kudriavzevii	1200	32.99 ± 9.92 g,h	11.22 ± 2.03 a,b,c
Z. bailii	1213	54.16 ± 2.23^{i}	$35.11 \pm 12.75^{\text{ h}}$
C. pararugosa	1231	51.09 ± 2.52^{i}	$25.87 \pm 6.36^{c,d,e,f,g,h}$

Different letter indicate significantly differences between strains for each variable

Generally, as proven in the literature and in agreement with our data, more satisfactory hydrophobicity results are obtained, when xylene is employed as the solvent. Xylene is a more effective uncoupling agent than toluene and as such, is also more efficacious in depleting adenosine triphosphate. Xylene and toluene are aromatic hydrocarbons lacking proton-releasing groups. Thus, instead of a protonophoretic mechanism, attachment to specific hydrophobic sites, such as proteins, seems more likely to be responsible for the uncoupling effect of these solvents (Revilla et al., 2007).

The auto-aggregation and hydrophobicity properties are strongly linked to the ability of the microbe to adhere to the intestine. From the probiotic perspective, a high hydrophobicity of the cell surface explains why, among the yeasts, certain strains have relatively slower elimination kinetics from the gastrointestinal tract and exert different health effects. It has been observed that the hydrophobic property could be

responsible for a better ability to colonize the gastrointestinal tract of germ-free mice (Martins et al., 2009).

From Fig. 2, it can be observed that yeasts with > 30% in both properties (hydrophobicity with xilene and auto-aggregation) are 1019, 1039, 1056, 1063, 1094, 1213 and 1231 and so they are suitable candidates.

3.5. Strains selected as best according to the preliminary tests

In order to select the strains that presented the best characteristics up to this point, PCA was applied (Fig. 3 and Table 6). Twenty-seven strains and six discriminating variables (rate, high OD, generation time, lag phase, auto-aggregation and hydrophobicity), were introduced in the analysis. It was noted that the rate and generation time were inversely proportional. Namely, a shorter doubling time resulted in a higher growth rate and, therefore, a more pronounced slope in the exponential phase. Thus, the strains of most interest were closest to the rate parameter. Again, one can see the same tendency between hydrophobicity and self-aggregation, noting greater apolarity of xylene than toluene.

Considering all of the above, the best yeasts were *H. osmophila* (1056 and 1094), *Z. bailii* (1213), *K. thermotolerans* (1039), *P. anomala* (1082, 1090), *P. kudriavzevii* (1003, 1200), *C. vini* (1063) and *P. membranaefaciens* (1019).

3.6. Biofilm formation

Biofilm formation is divided into four stages. In the initial stage, the yeasts adhere to the substrate that forms the base of the biofilm. This is followed by cell co-aggregation and colonisation. Then, the cells grow and proliferate, ultimately forming a basal layer that secures the cells (Ramage, Mowat, Jones, Williams, & López-Ribot, 2009). Generally, adhesion is favoured where the surfaces appear to be rougher, more hydrophobic and possess a coating.

For the 10 strains selected as the best, cell viability was observed after each sample was sonicated, to separate the possible biofilms formed from the slide contained in the Falcon flasks. For all 10 strains, the viable cell count was very high, around 6 log CFU/cm², with 1063 presenting the highest (6.23 \pm 0.17 log CFU/cm²). Strain 1039 had the lowest viability (5.30 \pm 0.17 log CFU/cm²). However, there are no intergroup differences (α = 0.05; p = 0.02; F = 3.26). In comparison to these data, Perricone, Bevilacqua, Corbo, and Sinigaglia (2014) presented relatively lower viabilities (2.96 - 4.63 log CFU/cm²) for yeasts from Altamura sourdough.

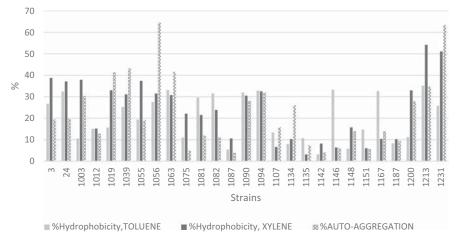


Fig. 2. Auto-aggregation and hydrophobicity percentages for the selected study strains.

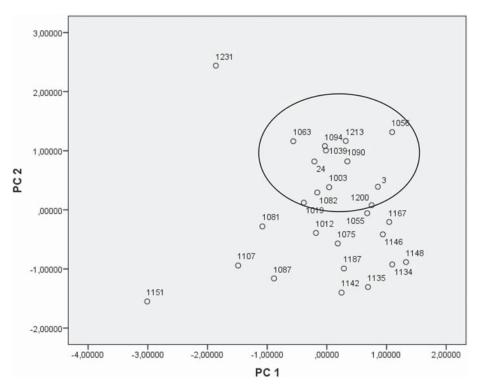


Fig. 3. Principal Component Analysis run on the fitting parameters of Warringer and Blomberg (2003) in addition to the auto-aggregation and hydrophobicity variables for the study strains.

 $\begin{tabular}{ll} \textbf{Table 6} \\ \textbf{Contribution of the highly correlated variables and their loadings in principal components 1 and 2.} \end{tabular}$

Principal component	Variance explained (%)	Total variance (%)	Most highly correlated	Loading
1	37.86	37.86	λ OD _{max} Auto- aggregation Xylene Toluene	-0.14 0.90 -0.01 0.01 0.01
2	30.08	67.94	λ G μ OD _{max} Auto- aggregation Xylene Toluene	-0.53 -0.21 -0.02 -0.02 0.84 0.86 0.70

3.7. Sequential simulated digestion and its effect on viability and biofilm formation

As shown in Fig. 4, Table 7, the cell viability and biofilm formation of the 10 most relevant strains were investigated before and after exposure to sequential simulated digestion conditions (salivary-gastric-intestinal). The initial cell concentration was 8 log CFU/mL. After sequential simulated digestion, some strains, such as *P. kudriavzevii* (1003), *H. osmophila* (1056, 1094) and *P. anomala* (1090) exhibited better viability (> 7 log CFU/ml) than the controls. The remaining seven strains had a viability around 6 log CFU/mL. No significant intergroup differences were observed ($\alpha=0.05;\ p=0.005;\ F=4.90$). Regarding biofilm formation, strains 1003, 1019 and 1094 showed the best results but the values were slightly lower than control 1+ (*S. cerevisiae* strain UCLM 3).

It is noted that in contrast to other strains, the biofilm forming ability of the commercial yeast (S. cerevisiae var. boulardii) was not

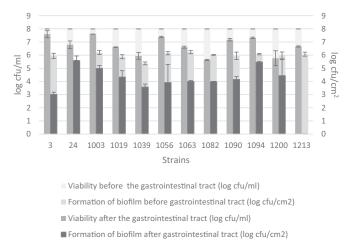


Fig. 4. Viability and biofilm formation before and after gastrointestinal tract by each of the strains selected as best according to gastrointestinal resistance, autoaggregation and hydrophobicity tests.

affected by the digestive conditions. Nevertheless, 1003 and 1094, lost just 19 and 10% biofilm-forming ability, respectively, and two other strains (1019 and 1200) showed a loss of < 30%. Besides control 1+, none of the strains exceeded a viability loss of 40%, except strain 1213, which after simulated digestion, was not able to form a biofilm.

4. Conclusions

In this paper, a step-by-step approach was used to characterise the probiotic potential of certain non-Saccharomyces yeasts isolated from food ecosystems. From 215 isolates, 108 were identified as different strains by RAPD analysis. Some strains were distinguished for their optimal growth parameters, such as Lachancea sp. (1146 and 1148), H. osmophila (1056), K. thermotolerans (1167) and P. kudriavzevii (1200),

Table 7Loss of viability and biofilm formation capability after simulation of gastro-intestinal conditions.

$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	Species	Strain	Loss viability after tract (%)	Loss biofilm formation capability (%)
	Control 2+ P. kudriavzevii P. membranaefaciens K. thermotolerans H. osmophila C. vini P. anomala P. anomala H. osmophila P. kudriavzevii	24 1003 1019 1039 1056 1063 1082 1090 1094 1200	$15 \pm 5.07^{\text{ bcd}}$ $5 \pm 0.10^{\text{ a}}$ $17 \pm 0.42^{\text{ d}}$ $26 \pm 4.72^{\text{ c}}$ $8 \pm 0.96^{\text{ ab}}$ $17 \pm 1.32^{\text{ d}}$ $29 \pm 0.70^{\text{ c}}$ $10 \pm 1.72^{\text{ abcd}}$ $9 \pm 1.04^{\text{ abc}}$ $28 \pm 9.99^{\text{ c}}$	$\begin{array}{l} 0 \pm 0.27^{\ a} \\ 19 \pm 0.22^{\ bc} \\ 26 \pm 0.35^{\ bcd} \\ 33 \pm 0.19^{\ cd} \\ 36 \pm 0.77^{\ cd} \\ 36 \pm 0.12^{\ cd} \\ 34 \pm 0.04^{\ cd} \\ 30 \pm 0.31^{\ bcd} \\ 10 \pm 0.06^{\ ab} \\ 26 \pm 0.79b^{\ cd} \end{array}$

Different letter indicate significantly differences between strains for each variable.

which offered better results than the reference probiotics strains used as the controls. Furthermore, many strains were tolerant to simulated digestive conditions, an essential property for a probiotic. In addition, strain 1056 was noted for its aggregation capacity, followed by *C. pararugosa* (1231), which, in turn, was noted for its hydrophobic capacity. In terms of biofilm formation, *H. osmophila* (1094), 1200, *P. kudriavzevii* (1003) and *P. membranaefaciens* (1019) were the most promising.

These results suggest that various non-Saccharomyces yeast species harbour strains with probiotic potential, although there is no one with optimal results together. Thus, future studies will be done for the final selection that include the GRASS character of the selected strains among others. Moreover, the strains with multifunctional potentials isolated in this study, could be used to produce probiotic products (foods and drugs). This might be a solution to the steadily increasing demands for these products.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Junta de Comunidades de Castilla La-Mancha for funding this research, (Ref: CCM17-PIC-322).

References

- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., & Lombardi, A. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology, 30, 5–9.
- Arévalo-Villena, M., Fernández-Pacheco, P., Castillo, N., Bevilacqua, A., & Briones, A. (2018). Probiotic yeast. Set up of a method for screening. LWT-Food Science & Technology, 89, 657–665.
- Armando, M. R., Pizzolitto, R. P., Dogi, C. A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., ... Cavaglieri, L. R. (2012). Adsorption of ochratoxin a and zearalenone by potential probiotic Saccharomyces cerevisiae strains and its relation with cell wall thickness. Journal of Applied Microbiology, 113, 256–264.
- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., & Briones, A. (2009). Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. Food Control, 20, 778–783.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F. N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. Food Research International, 50, 135–142.
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suárez, V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 434–444.
- Blehaut, H., Massot, J., Elmer, G. W., & Levy, R. H. (1989). Disposition kinetics of Saccharomyces boulardii in man and rat. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 10, 353–364.
- Boris, S., Suárez, J. E., & Barbés, C. (1997). Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri* a vaginal isolate. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 413–420.
- Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Prabhu, P. R., & Antony, U. (2016). Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen idli batter. *Yeast*, 33, 385–401.

- Corte, L., Lattanzi, M., Buzzini, P., Bolano, A., Fatichenti, F., & Cardinali, G. (2005). Use of RAPD and killer toxin sensitivity in Saccharomyces cerevisiae strain typing. Journal of Applied Microbiology, 99, 609–617.
- Czerucka, D., & Rampal, P. (2002). Experimental effects of Saccharomyces boulardii on diarrheal pathogens. Microbes and Infection, 4, 733–739.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., ... Collins, J. K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition, 73*, 386S–392S.
- García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L. R., Rosa, C. A., Nicoli, J. R., Iglesias, A. E., ... Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. Research in Veterinary Science, 93, 798–802.
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: in vitro characterisation of probiotic traits. LWT Food Science and Technology, 64, 1156–1162.
- Grando, M. S., Ubeda, J., & Briones, A. I. (1994). RAPD analysis of wine Saccharomyces cerevisiae strains differentiated by pulsed field gel electrophoresis. Biotechnology Techniques, 8, 557–560.
- Guillamón, J. M., & Barrio, E. (2017). Genetic polymorphism in wine yeasts: Mechanisms and methods for its detection. Frontiers in Microbiology, 8.
- Hill, C., Guarner, F., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 11, 506–514.
- Klein, S. M., Elmer, G. W., McFarland, L. V., Surawicz, C. M., & Levy, R. H. (1993). Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, Saccharomyces boulardii, in healthy human volunteers. Pharmaceutical Research, 10, 1615–1619.
- Kos, B., Šušković, J., Goreta, J., & Matošić, S. (2000). Effect of protectors on the viability of Lactobacillus acidophilus M92 in simulated gastrointestinal conditions. Food Technology and Biotechnology, 38, 121–127.
- Kourelis, A., Kotzamanidis, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Scouras, Z. G., Tzanetakis, N., & Yiangou, M. (2010). Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 13, 93–104.
- Martins, F. S., Silva, A. A., Vieira, A. T., Barbosa, F. H. F., Arantes, R. M. E., Teixeira, M. M., & Nicoli, J. R. (2009). Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. Archives of Microbiology, 191, 623–630.
- Ortiz, M., Barrajón, N., Aalver-Baffi, M., Arévalo-Villena, M., & Briones, A. (2013). Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. LWT- Food Science and Technology, 50, 371–377.
- Padilla, B., Manzanares, P., & Belloch, C. (2014). Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiology*, 38, 160–166.Pedersen, L. L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., & Jespersen, L. (2012). Biodiversity and
- Pedersen, L. L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., & Jespersen, L. (2012). Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a west African spontaneously fermented cereal. International Journal of Food Microbiology, 159, 144–151.
- Pennacchia, C., Blaiotta, G., Pepe, O., & Villani, F. (2008). Isolation of Saccharomyces cerevisiae strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. Journal of Applied Microbiology, 105, 1919–1928.
- Pérez-Sotelo, L. S., Talavera-Rojas, M., Monroy-Salazar, H. G., Lagunas-Bernabé, S., Cuarón-Ibargüengoytia, J. A., Jiménez, R. M. D. O., & Vázquez-Chagoyán, J. C. (2005). In vitro evaluation of the binding capacity of Saccharomyces cerevisiae Sc47 to adhere to the wall of Salmonella spp. Revista Latinoamericana de Microbiologia, 47, 70–75.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. Food Microbiology, 38, 26–35.
- Pizzolitto, R. P., Armando, M. R., Combina, M., Cavaglieri, L. R., Dalcero, A. M., & Salvano, M. A. (2012). 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, 47, 933–941.
- Priya, A. J., Vijayalakshmi, S. P., & Raichur, A. M. (2011). Enhanced survival of probiotic Lactobacillus acidophilus by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 11838–11845.
- Psani, M., & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22, 1329–1336.
- Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & López-Ribot, J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35, 340–355.
- Revilla, A. S., Pestana, C. R., Pardo-Andreu, G. L., Santos, A. C., Uyemura, S. A., Gonzales, M. E., & Curti, C. (2007). Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling. *Toxicology In Vitro*, 21, 782–788.
- Romo Sánchez, S., Alves Baffi, M., Arévalo, M., Úbeda, J., & Briones, A. (2010). Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties. Food Microbiology, 27(4), 87–492.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Malcata, F. X. (2011). Characterization of yeast from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. LWT - Food Science and Technology, 44, 1349–1354.
- Sourabh, A., Kanwar, S. S., & Sharma, O. P. (2011). Screening of indigenous yeast isolates obtained from traditional fermented foods of western Himalayas for probiotic attributes. *Journal of Yeast and Fungi Research*, 2, 117–126.
- Sourabh, A., Kanwar, S. S., & Sharma, O. P. (2012). *In vitro* characterization of *Saccharomyces cerevisiae* HM535662 obtained from an indigenous fermented food

- "Bhaturu" of western Himalayas. African Journal of Biotechnology, 11, 11447–11454. Speranza, B., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2011). Effects of nutritional and environmental conditions on Salmonella sp. biofilm formation. Journal of Food Science, 76, M12-M16.
- M12–M16.
 Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M. T., Caruso, M., Andrighetto, C., & Gardini, F. (2000).
 Phenotypic and genotypic diversity of yeasts isolated from water-buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology, 88*, 117–123.
 Úbeda, J., Maldonado Gil, M., Chiva, R., Guillamón, J. M., & Briones, A. (2014).
- Biodiversity of non-saccharomyces yeasts in distilleries of the La Mancha region (Spain). FEMS Yeast Research, 14(4), 663-673.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., & Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases, 27,* 319–326.

 Warringer, J., & Blomberg, A. (2003). Automated screening in environmental arrays al-
- lows analysis of quantitative phenotypic profiles in Saccharomyces cerevisiae. Yeast, *20*, 53–67.