



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

Produção de  $\beta$ -glicosidase por cultivo em estado sólido do fungo  
termofílico *Thermomyces lanuginosus*

Vinicius Godoy Camargo



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

Produção de  $\beta$ -glicosidase por cultivo em estado sólido do fungo  
termofílico *Thermomyces lanuginosus*

Vinicius Godoy Camargo

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de  
Biotecnologia - Faculdade de Ciências Biológicas e  
Ambientais - Universidade Federal da Grande Dourados,  
sob orientação do Prof<sup>o</sup>.Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados MS  
Abril -2013



Dedico esta monografia a todos meus amigos e familiares, mas em especial aos meus avós Américo e Maria por sempre acreditarem em mim e por terem me acolhido desde sempre. Hoje realizo um sonho meu, sempre me espelhando naqueles que me ensinaram e educaram. Sei que todos estão feliz por me verem vencer mais esta etapa.

*"Concentre todos os seus pensamentos no trabalho que irá desempenhar. Os raios de sol não queimam enquanto não se concentram sobre um foco."*

*Alexander Graham Bell*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Agradeço aos meus avós Américo e Maria, que sempre me aconselham e estiveram comigo.

Agradeço aos meus pais e irmãos, por me apoiarem em minhas decisões.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, por ter me orientado em meu Trabalho de Conclusão de Curso e pela oportunidade de aprender com ele.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcelo Fossa da Paz, primeiramente pela amizade e por ter aceitado participar da minha banca examinadora do meu Trabalho de Conclusão de curso.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Jane de Jesus, por aceitar participar da banca examinadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço a Taiza por ter sido minha companheira dentro e fora da universidade, e ter me dado todo o carinho nas horas difíceis.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dra. Claudia Roberta Damiani, pela amizade, carinho e conselhos.

Agradeço a mestre em Bioprospecção, Maria Alice Silvestre, por tudo que me ensinou, e por tudo que fez por mim durante a realização do meu trabalho, e pelo companheirismo.

Agradeço a todo o Grupo de Enzimologia e Processos Fermentativos: Ana Paula, Nayara, Flávia, Marília, Gabriela, Ândrea, Ana Carolina, Rodrigo e Marta pelo companheirismo durante a rotina de laboratório.

Agradeço a Taísa Godoy por ser além de colega de trabalho, uma amiga especial.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, por sua disponibilidade.

Agradeço aos professores do Curso de Biotecnologia e Ciências Biológicas que ajudaram a construir o conhecimento que levarei comigo por toda a vida.

Agradeço a todos os meus verdadeiros amigos por sempre estarem junto de mim nos momentos de alegria e tristeza, sempre me dando forças para não desistir.

Muito obrigado a todos vocês!

## ÍNDICE

1. RESUMO .....	8
2. INTRODUÇÃO.....	9
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Microrganismo utilizado.....	12
4.2 Determinação da temperatura ótima de crescimento.....	13
4.3 Obtenção do inóculo.....	13
4.4 Avaliação dos parâmetros de cultivo.....	14
4.5 Extração da enzima.....	15
4.6 Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidases.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
5.1 Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo .....	16
5.2 Seleção do substrato para produção de enzima .....	16
5.3 Umidade inicial do substrato para a produção enzimática .....	18
5.4 Efeito do pH na produção de enzima.....	19
5.5 Tempo de cultivo para a produção de enzima .....	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	21
7. REFERÊNCIAS .....	22

## 1. RESUMO

Dentro da grande família das celulasas, as  $\beta$ -glicosidases são importantes enzimas que contribuem para a hidrólise enzimática da celulose. Os parâmetros de cultivo em estado sólido para a maior produção enzimática por parte do fungo *Thermomyces lanuginosus*, foram estudados no presente trabalho. Temperatura, substrato, umidade, pH da solução nutriente e tempo de crescimento, foram os parâmetros avaliados. O fungo apresentou crescimento em 50°C. Dentre os substratos utilizados, o cultivo em farelo de trigo apresentou maior produção de  $\beta$ -glicosidase, cerca de 1,73 U/mL (17,3 U/g). Dentre as umidades avaliadas, foi encontrado 75% como umidade relativa ideal. Ao cultivar o fungo em diferentes valores de pH, pode-se perceber que o mesmo mostrou-se mais eficiente em pH 3,0. A maior produção de enzima foi obtida após 120 horas de cultivo nas condições previamente estabelecidas. Os resultados obtidos permitem inferir que a linhagem fúngica testada possui potencial para a produção de  $\beta$ -glicosidase utilizando subproduto agroindustrial como substrato em cultivo em estado sólido.

**Palavras chave:** Enzimas microbianas, celulasas, resíduos agroindustriais



## 2. INTRODUÇÃO

A constante luta por um desenvolvimento sustentável para suprir as demandas populacionais, tais como, alimentação, combustíveis, roupas, produtos e bebidas, só será possível com o aproveitamento racional dos recursos naturais existentes em nosso planeta. Todos os dias, toneladas de resíduos agroindustriais são produzidos, e estes podem servir de matéria prima para bioprocessos que utilizam microrganismos produtores de enzimas. Estes resíduos podem ser utilizados como fontes de carbono para o cultivo de fungos, pois possuem em sua estrutura, polímeros como a celulose, amido, e hemicelulose (VILLAS-BÔAS e ESPOSITO, 2000). A obtenção de açúcares fermentescíveis depende fundamentalmente da hidrólise enzimática destes polímeros. A hidrólise enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de pelo menos três enzimas diferentes: as endoglucanases (EC 3.2.1.4) , exoglucanases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidases (PARRY et al., 2001).

Existe uma grande tendência de se aplicar processos como a cultivo em estado sólido (CES) para a propagação de bioprocessos como: biodegradação, biorremediação de compostos tóxicos, enriquecimento nutricional de resíduos agroindustriais e a consecução de produtos com altos valores agregados. O cultivo em estado sólido se define como o crescimento microbiano em condições controladas em material sólido com baixa atividade de água (água livre) (COUTO e SANROMÁN, 2005). Porém, é necessário que o resíduo sólido utilizado tenha umidade suficiente para favorecer o crescimento do microrganismo (PANDEY, 2003).

A produção de enzimas utilizando a CES torna-se viável devido a uma gama de vantagens tais como: utilização de resíduos industriais como substrato, o que reduz o custo do produto final; as condições de crescimento são semelhantes ao habitat natural dos fungos, logo, resulta em uma melhor adaptação e conseqüentemente maior produção ; menor risco de contaminação bacteriana, devido a baixa atividade de água; permite maior aeração devido ao espaçamento dos grânulos dos resíduos sólidos; a concentração dos produtos formados são maiores pois são extraídos com pequenas quantidades de água, resultando na elevada concentração de enzimas (BIANCHI et al., 2001).

Dentro do contexto apresentado, o objetivo foi avaliar os parâmetros de cultivo em estado sólido do fungo termofílico *Thermomyces laguninosos*, utilizando subprodutos da agroindústria como substratos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente existe uma grande tendência de se usar fontes alternativas para a obtenção de energia renovável e sabe-se que as matérias lignocelulósicas possuem um potencial energético promissor para o desenvolvimento de combustíveis não fósseis, como o etanol. Estes compostos lignocelulósicos muitas vezes são oriundos de processos agroindustriais, e muitas vezes, tidos como resíduos, por isso possuem baixo valor agregado (CASTRO, 2010). As celulases são enzimas importantes para a bioconversão destes materiais celulósicos em açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustível (BHATTI et al., 2013). Estes resíduos apresentam grandes quantidades de polímeros de elevado peso molecular, como: celulose, amido, hemicelulose, pectina e lignina (VILLAS-BÔAS e ESPOSITO, 2000). A celulose é um polímero formado por várias moléculas de glicose, unidas por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas. Assim, é possível reduzir este composto a sua menor unidade, glicose, a partir da hidrólise enzimática. Este polímero é um dos compostos mais abundantes encontrados na natureza e faz parte da estrutura da parede celular vegetal e é considerado uma fonte de energia renovável. No entanto, a interação desta molécula com a lignina, hemicelulose e pectina, dificultam o acesso a ela, e nesse âmbito, os fungos decompositores de matéria vegetal surgem como alternativa para a liberação da celulose presente na parede celular (JABBOUR et al., 2012). Para se chegar à glicose o processo de hidrólise envolve a ação coordenada de enzimas do complexo celulolítico, são elas: endoglucanases (EC 3.2.1.4); exoglucanases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) (OGEDA e PETRI 2010).

Estudos apontam que as endoglucanases e exoglucanases são enzimas capazes de hidrolisar material celulósico para a formação de celobiose. Por outro lado a grande contribuição das  $\beta$ -glicosidases na hidrólise de material celulósico é justamente a ação sobre a celobiose, que é um forte inibidor das atividades catalíticas das endoglucanases e exoglucanases (BHATIA et al., 2002). Desse modo, é importante ressaltar que o processo de hidrólise enzimática de material celulósico acontece pela ação sinérgica destas três enzimas. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) atuam de forma aleatória na molécula de celulose, clivando as ligações glicosídicas, e liberando oligossacarídeos de diferentes tamanhos. É possível evidenciar a sua atividade catalítica, pois a hidrólise das ligações glicosídicas reduz o peso molecular dos oligossacarídeos tornando assim o meio menos

viscoso (DESWAL et al., 2011). Com relação às exoglucanases (EC 3.2.1.91), sua atuação se concentra nas extremidades redutoras e não-redutoras das moléculas liberadas pelas endoglucanases, resultando na hidrólise incompleta da celulose, formando celobiose. Por fim, a glicose é obtida a partir da hidrólise da celobiose, realizada pela ação das  $\beta$ -glicosidases (LEITE et al., 2007). É importante lembrar, que a complexa interação entre hemicelulose, lignina e celulose dificulta o processo de hidrólise da celulose. Por esse motivo os processos para a hidrólise de materiais celulósicos necessitam de pré-tratamento, químico, físico ou enzimáticos para a remoção da lignina e maior exposição da celulose e hemicelulose ao ataque das celulasas. Estes processos de pré-tratamento variam desde a moagem dos resíduos para o aumento da exposição da celulose, até o uso de substâncias ácidas e alcalinas e agentes oxidativos e ainda enzimas hemicelulolíticas (OGEDA e PETRI 2010).

Atualmente, as enzimas do complexo celulolítico estão presentes em diferentes processos industriais, da fabricação de bebidas à indústria têxtil, porém, a produção destas enzimas em escala industrial só começou a ser realizada por volta dos anos 80. Sua produção era estritamente direcionada a indústria de ração animal, onde ganhava a função de aditivo alimentar, pois melhorava a digestibilidade dos animais ruminantes. Uma das mais importantes aplicações das enzimas do complexo celulolítico é a hidrólise de biomassa vegetal. Os materiais lignocelulósicos, como já foi dito, possuem grandes quantidades de celulose que podem ser reduzidas a glicose, que é o principal açúcar utilizado na produção de etanol (CASTRO, 2010). O uso de enzimas em processos industriais tem se tornado alvo de muitos estudos, considerando que a maioria dos processos industriais ocorre em altas temperaturas, surge então, a necessidade de se utilizar enzimas termoestáveis, que mantêm a sua atividade catalítica mesmo em elevadas temperaturas (LEITE, et al., 2008).

A alta capacidade dos microrganismos de se adaptarem a ambientes onde a temperatura, pressão e pH ultrapassam os valores considerados normais para outros seres vivos ganha atenção de várias pesquisas e estudos, pois existe uma grande relação entre as condições de vida do microrganismo e a produção de enzimas com maior estabilidade (GOMES et al., 2007). Alguns trabalhos apontam que existe uma correlação entre termofilia e microrganismos produtores de enzimas termoestáveis, no entanto, alguns

fungos mesofílicos e psicrófilos também podem produzir enzimas com relativa estabilidade térmica (LEITE et al., 2007). Um bom exemplo de fungo mesofílico produtor de enzimas termoestáveis é o gênero *Aspergillus*, porém algumas espécies como o *Aspergillus fumigatus* crescem em temperaturas acima de 45°C. Por outro lado, o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* aparece como um dos principais microrganismos produtores de  $\beta$ -glicosidases termoestáveis (STUTZENBERGER et al., 1990). É importante mencionar que uma enzima termoestável possui tanto estabilidade cinética quanto dinâmica, e que essa termoestabilidade reflete nas forças de dobramento desta proteína (GOMES et al., 2007).

A produção de enzimas microbianas é mediada pelo cultivo do microrganismo em diferentes condições. Os dois processos utilizados para a obtenção destas enzimas são: o cultivo em estado sólido (CES) e o cultivo submerso (CS). O CES tem apresentado resultados positivos para o crescimento de bactérias e fungos visando a produção de enzimas. Previamente, é necessário a escolha do microrganismo, e um perfeito isolamento do mesmo. Trabalhos anteriores comprovam que frente ao processo de CS o CES apresenta maiores rendimentos em relação à produtividade. Outro importante aspecto é a escolha de um substrato próprio que sirva tanto de fixador para o microrganismo quanto para fonte de carbono (essencial para o microrganismo). A escolha do substrato é de suma importância, pois a partir dele é que se pode ter a especificidade na produção da enzima de interesse. Por exemplo: se a intenção é produzir enzimas hemicelulolíticas, é desejável que o substrato contenha altos teores de hemicelulose. O grande sucesso do CES em relação ao CS é justamente proporcionar ao microrganismo as condições ambientais mais próximas ao habitat natural. Outros fatores como pH, temperatura de incubação, umidade e granulometria do substrato também são de extrema importância. A utilização de resíduos agroindustriais torna este processo, (CES), viável pelo baixo custo e a baixa umidade do meio que desfavorece o crescimento de microrganismos indesejáveis (PANDEY, 2003).

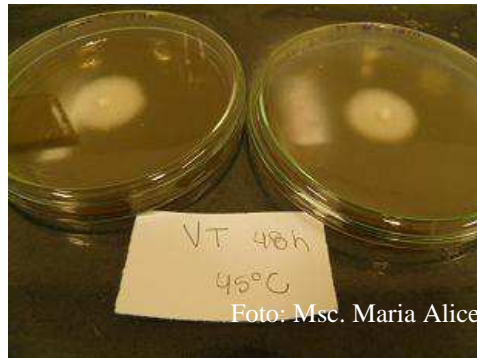
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 *Microrganismo utilizado*

Neste trabalho foi utilizado o fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* isolado de material vegetal de pilhas de compostagem, no município de Dourados (MS), mantido em *Ágar Sabouraud Dextrose* a temperatura de 4°C.

#### 4.2 Determinação da temperatura ótima de crescimento

Para determinar a temperatura ótima de crescimento da linhagem isolada, o fungo foi cultivado em temperaturas que variam de 25°C a 60°C por repique de ponto central em placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura *Sabouraud Dextrose*, e o diâmetro do alo formado pelo micélio foi medido a cada 24 horas por 96 horas (Figura 1).



**Figura 1:** Formação do alo de crescimento em placa de Petri, em 24 horas a 45°C

#### 4.3 Obtenção do inóculo

O microrganismo foi cultivado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL do meio *Ágar Sabouraud Dextrose* inclinado, mantido por 48 horas na temperatura de 50°C (Figura 2). A suspensão do fungo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente para o fornecimento de micronutrientes (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônia) devidamente autoclavada. A inoculação do fungo no substrato se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão para os frascos Erlenmeyers contendo farelo de trigo previamente preparado.



**Figura 2:** Crescimento microbiano em Erlenmeyers contendo meio de cultura inclinado

#### 4.4 Avaliação dos parâmetros de cultivo

A linhagem isolada foi cultivada em diferentes resíduos agroindustriais a fim de estabelecer o substrato ideal para a produção de  $\beta$ -glicosidase por CES (Figura 3). Os resíduos avaliados foram: sabugo de milho, palha de milho, bagaço de cana, casca de arroz, farelo de soja e farelo de trigo. A umidade do substrato foi variada de 50 a 90%, utilizando a solução nutriente anteriormente descrita (Figura 4). Para averiguar o pH ideal de cultivo, foi utilizada solução nutriente com o pH variando de 4,0 a 7,0 para umedecer o substrato (Figura 5). O tempo de cultivo para a maior produção enzimática foi avaliado utilizando as melhores condições avaliadas nas etapas anteriores, e o cultivo ocorreu por 168 horas sendo a produção avaliada a cada 24 horas (Figura 6).



Foto: Msc. Maria Alice

**Figura 3:** Seleção dos Substratos a serem avaliados.



Foto: Msc. Maria Alice

**Figura 4:** Cultivo em estado sólido com 50% de umidade.



Foto: Msc. Maria Alice

**Figura 5:** Variação do pH da solução Nutriente



Foto: Msc. Maria Alice

**Figura 6:** Cultivo do fungo de 0 a 168 h a 50°C

#### 4.5 Extração da enzima

Após a fermentação nos frascos Erlenmeyers, foram adicionados 50 mL de água destilada nos meios cultivados, e mantido em agitação por 1 hora a 120 rpm (Figura 7). Retirado da agitação, o material líquido contido nos frascos Erlenmeyer foi filtrado e centrifugado a 3.000 x g. para a separação dos debrís celulares. O material sobrenadante extraído, foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

#### 4.6 Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidases

A determinação de atividade  $\beta$ -glicosidases foi dada pela adição de 50  $\mu$ L do extrato enzimático bruto em 250  $\mu$ L de solução tampão acetato de sódio 0,1M, com pH 5,0 e 250  $\mu$ L de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo 4mM (pNP $\beta$ G, Sigma), com tempo de reação de 10 minutos a temperatura de 50°C (Figura 8). Para a paralisação da reação foi utilizado 2 mL de carbonato de sódio 2M. O p-nitrofenol liberado foi quantificado com o uso do espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto de reação.

A metodologia utilizada para a realização dos experimentos é uma adaptação de Silva (2008).



Foto: Msc. Maria alicia

**Figura 7:** Extração de enzima pela adição de 50 mL de água destilada



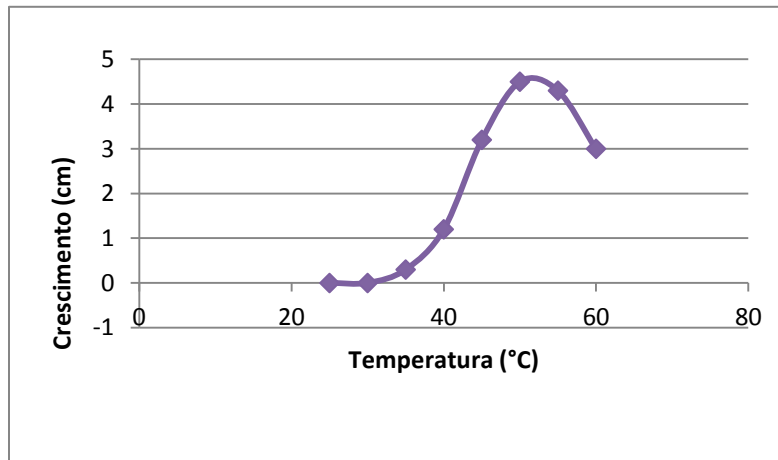
Foto: Vinicius G. Camargo

**Figura 8:** Leitura da atividade enzimática em espectrofotometria a 410nm

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo

Nas temperaturas de 25 e 30°C, o microrganismo não apresentou crescimento durante todo o período de incubação. A partir de 35°C foi possível observar desenvolvimento micelial, no entanto, o crescimento ótimo foi atingido por volta dos 50°C (Figura 9). Segundo Gomes et al. (2007), a temperatura é o principal fator influente no funcionamento e metabolismo destes organismos e a existência de locais termicamente estáveis, possibilitou o aparecimento de espécies que requerem temperaturas maiores do que as consideradas padrões. Da-Silva et al. (2005), obtiveram resultados similares quando cultivaram uma linhagem de *Thermoascus aurantiacus*, obtendo como temperatura ótima de crescimento 50°C. Pandey, (2003) afirma que a temperatura está intimamente relacionada com o crescimento microbiano, formação e germinação de esporos e produção enzimática. Para o caso de microrganismos termofílicos estima-se que a temperatura ótima de crescimento seja entre 40° e 50°C (GOMES et al., 2007).



**Figura 9:** Desenvolvimento micelial em função do tempo de cultivo por repique de ponto central em placa de Petri, em meio Ágar *Sabouraud Dextrose*.

### 5.2 Seleção do substrato para produção de enzima

O fungo apresentou crescimento em todos os substratos, porém apenas em farelo de trigo o microrganismo apresentou produção significativa de  $\beta$ -glicosidase. Leite et al.



(2008), quando cultivaram o fungo *Thermoascus aurantiacus* em condições similares de cultivo, obtiveram uma produção de aproximadamente 5,8 U/mL (ou 58 U/g). A tabela 1 mostra a produção enzimática obtida no cultivo do fungo em cada substrato.

A seleção de um substrato para a CES é de suma importância para o processo, visto que, o sucesso do cultivo depende fundamentalmente da composição e natureza do substrato (COUTO e SANROMÁN, 2005). Bhargav et al. (2008), afirmam que o farelo de trigo é um dos resíduos mais utilizados no CES e que pode ser melhor explorado, os autores ainda revelam que a transferência de calor é extremamente importante para o crescimento do fungo, e o farelo de trigo facilita este processo devido a aeração dos grânulos desse substrato.

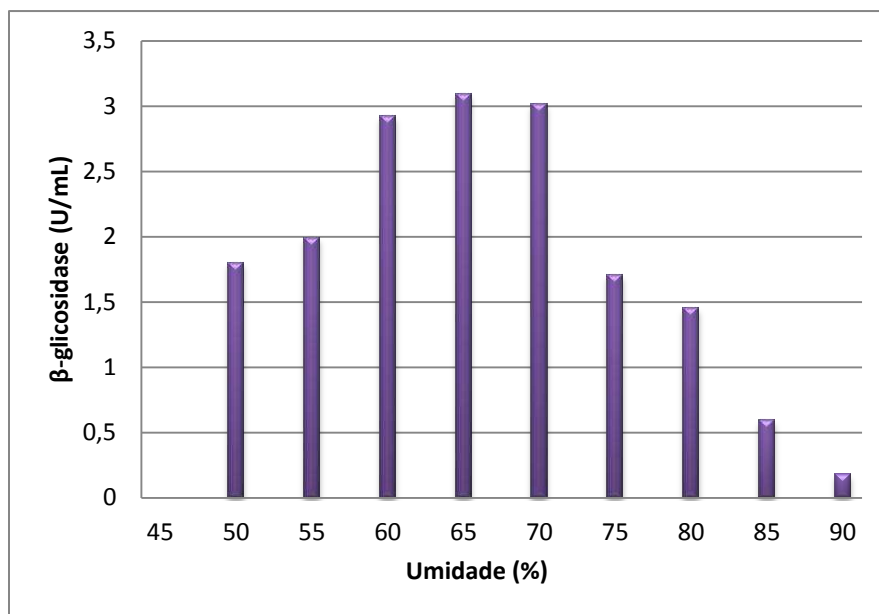
**Tabela 1:** Produção de  $\beta$ -glicosidase pelo cultivo do fungo em diferentes substratos, sob temperatura de 50°C, 72h de crescimento e pH 4,5.

SUBSTRATOS	U/mL	U/g
Farelo de trigo	1.73	17.3
Farelo de soja	0.4	4
Bagaço de cana	0	0
Casca de arroz	0	0
Palha de milho	0.36	3.6
Sabugo de milho	0	0

Os resultados obtidos confirmam o potencial para produção de  $\beta$ -glicosidase pelo fungo, quando cultivado em farelo de trigo por cultivo em estado sólido. Leite et al. (2007) afirmam que o farelo de trigo possui uma composição (14% proteína; 27% carboidratos; 5% minerais; 6% gordura; 17% vitamina-B) o que favorece o crescimento microbiano e a produção de enzimas. Zimbardi et al. (2013), apontam o farelo de trigo, como uma excelente fonte de carbono para produção de enzimas celulolíticas devido sua composição e afirma que os compostos nele encontrados favorecem o crescimento do fungo, e consequentemente a maior produção de  $\beta$ -glicosidase. Qian et al. (2012) relatam o crescimento do fungo *Aspergillus niger* AS 3. 4309 em diferentes substratos, porém a maior produção de  $\beta$ -glicosidase, se deu em farelo de trigo.

### 5.3 Umidade inicial do substrato para a produção enzimática

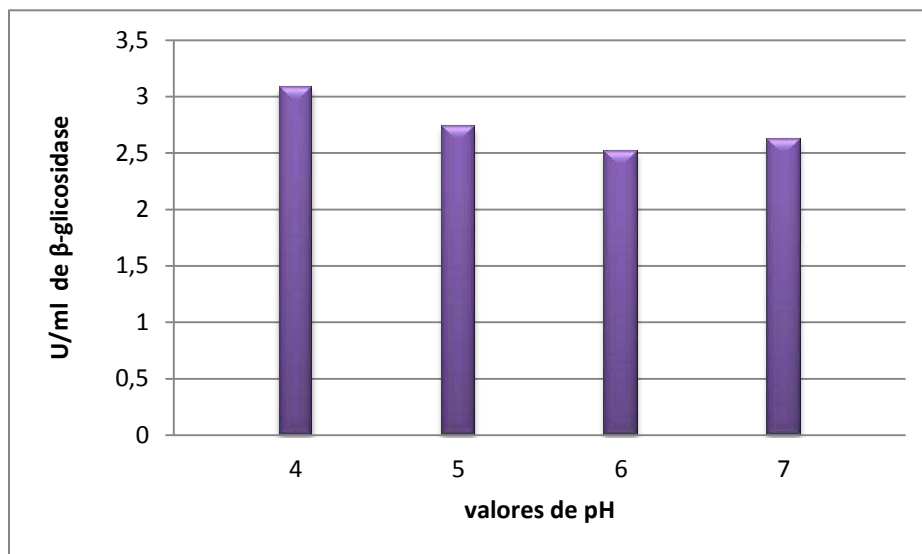
O fungo filamentoso *Thermomyces lanuginosus* foi cultivado em farelo de trigo contendo diferentes valores de umidade (de 50% a 90%). O microrganismo apresentou desenvolvimento micelial em todas as umidades avaliadas. Porém, a produção de  $\beta$ -glicosidase variou de acordo com o percentual de água livre. É possível perceber que em 65% de umidade, o fungo atingiu o maior pico de produção enzimática (Figura 10). Pandey et al. (2000) afirmam que umidade é um dos fatores que favorecem o crescimento e atividade microbiana. Em uma segunda publicação Pandey (2003) concluiu que elevadas taxas de água diminuem a porosidade do substrato, prejudicando o desenvolvimento micelial, e ainda, favorece contaminação por bactérias. Em contrapartida, a baixa umidade do substrato compromete o acesso aos nutrientes, prejudicando também o desenvolvimento do microrganismo. Rodriguez-Zuñiga et al. (2011), obtiveram maior produção de celulases quando cultivaram uma linhagem de *Aspergillus niger* em percentuais de umidade por volta de 70%.



**Figura 10:** Produção de enzimas em função da umidade do meio, sob temperatura de 50°C, 120h de crescimento e pH 4,5

#### 5.4 Efeito do pH na produção de enzima

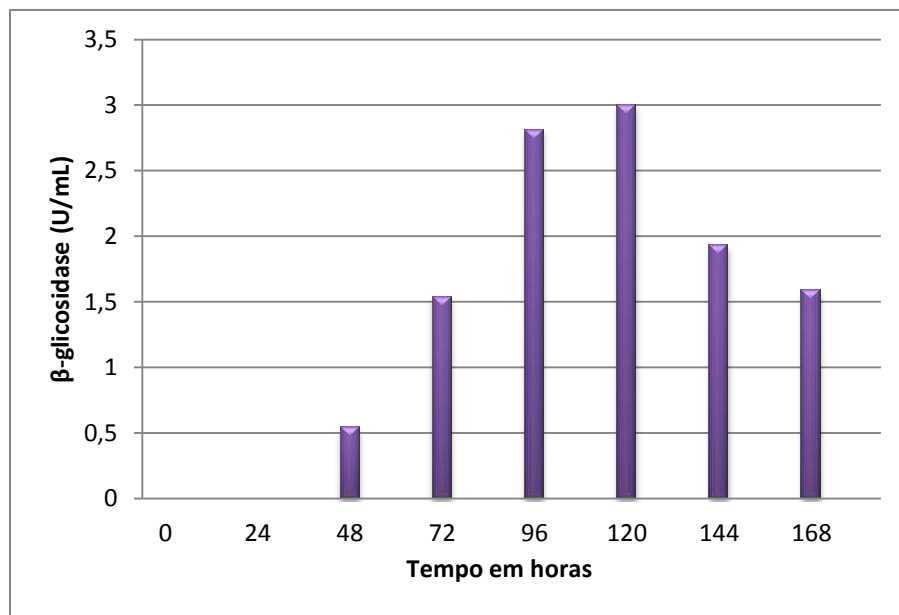
Dentre os valores de pH avaliados, houve produção de  $\beta$ -glicosidase por parte do *T. lanuginosus* em todos os valores, porém é possível observar que o microrganismo utilizado possui tendências de crescimento em meios ácidos, pois apresentou maior produção em pH 4,0 (Figura 11). Alguns estudos mostram a tendência de se usar meios ácidos quando se trata de produção de enzimas por fungos filamentosos. Juhász et al. (2003) no intuito de obter quantidades expressivas de  $\beta$ -glicosidase, utilizaram-se de meios ligeiramente ácidos para realizar seus trabalhos. Deswal et al. (2011) em seu trabalho, afirmam que o pH é um parâmetro importante, pois afeta o desenvolvimento micelial, a produção de enzimas e o transporte de substâncias pela parede celular do microrganismo. Ao cultivar uma linhagem de *Fomitopsis sp.* RCK 2010 em diferentes valores de pH, obtiveram uma queda de produção enzimática a medida que o pH se tornou alcalino. Tal fato comprova a preferência dos fungos, por ambientes mais ácido. Milala et al. (2005) obtiveram o valor 3,0 como pH ótimo para produção de celulases, quando cultivaram uma linhagem de *Aspergillus niger* em palha de milho em cultivo submerso. Tal fato revela uma maior adaptação de fungos em valores de pH ácidos.



**Figura 11:** Produção de  $\beta$ -glicosidase em função do pH inicial do meio, sob temperatura de 50°C, 65% de umidade e 120 h de crescimento

### 5.5 Tempo de cultivo para a produção de enzima

O experimento foi realizado submetendo o fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* ao crescimento de 168 horas no intuito de averiguar o melhor tempo para a produção da enzima de interesse. É possível observar que a curva de produção, atinge seu ápice por volta de 120 horas (Figura 12). Xia e Cen (1999), encontraram resultados similares em seu trabalho, quando cultivaram uma linhagem de *Trichoderma reesei* em CES. Em seu trabalho, após 120 horas de cultivo em estado sólido, o fungo produziu a maior quantidade de celulase. Alguns estudos apontam fungos com maior produção de enzimas em tempos de cultivos maiores. Sales et al. (2010) ao avaliarem parâmetros para a produção de celulasas e xilanases por *Aspergillus aculeatus* e *Aspergillus phoenicis* obtiveram um tempo de cultivo ideal de 168 horas. Por outro lado, Karmakar e Ray (2010) em seus estudos afirmam que a linhagem de *Rhizopus oryzae* cultivada por eles, tem como tempo de cultivo ideal 48 horas para a produção de endoglucanases extracelulares.



**Figura 12:** Produção de  $\beta$ -glicosidase em função do tempo (h), sob temperatura de 50°C, 65% de umidade do substrato e pH 4,5.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos do presente trabalho foram alcançados, uma vez que os experimentos realizados possibilitaram estabelecer as melhores condições de cultivo para a linhagem selecionada. Tais condições, dependem de variáveis como pH, composição do substrato, umidade, temperatura e tempo de cultivo que foram avaliadas no decorrer do processo. É possível perceber que ao melhorar as condições de cultivo a produção de enzimas saltou de 1,73 para 3,09 U/ml. Ao finalizar os experimentos conclui-se que a linhagem de fungo utilizada possui maior produção de  $\beta$ -glicosidase em farelo de trigo, e os valores ideais para, temperatura ótima de crescimento, umidade, tempo de cultivo e pH foram, 50°C, 65%, 120 horas e 4,0 respectivamente.

Neste âmbito, pode-se dizer que a linhagem de *Thermomyces lanuginosus* utilizada possui características promissoras para a produção de  $\beta$ -glicosidase devido a termofilia, e a escassez de trabalhos científicos usando esta espécie, possibilitam uma maior exploração da mesma, considerando que existem vários parâmetros a serem avaliados.

## 7. REFERÊNCIAS

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation: An Overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v.22, n.1, p.49-70, 2008.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S.; Microbial  $\beta$ -glucosidase: Cloning properties, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.22, p.375-407, 2002.

BHATTI, H. N.; BATOOL, S.; AFZAL, N. Production and characterization of a novel  $\beta$ -Glucosidase from *Fusarium solani*. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.15, p.140-144, 2013.

BIANCHI, V.L.D.; MORAES, I.O.; CAPABLO, D.M.F. Fermentação em estado sólido. *Biotecnologia industrial. São Paulo, Edgard Blücher*, v.2, p.247-276, 2001.

CASTRO, A.M.; Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v.33, p.181-188, 2010.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, v.22, p.211-219, 2005.

DA-SILVA, R.; LAGO-VANZELA, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, n.3, p.235-241, 2005.

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

GOMES, E.; GUEZ, M. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Microrganismos termófilos, enzimas termoestáveis e produção de enzimas termoestáveis para aplicação industrial - Revisão. *Química Nova*, v.30, n.1, p.136-145, 2007.

JABBOUR, D.; KLIPPEL, B.; ANTRANIKIAN, G. A novel thermostable and glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Fervidobacterium islandicum*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.93, p.1947-1956, 2012.

JUHÁSZ, T.; KOZMA, K.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Production of  $\beta$ -Glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. *Food Technology and Biotechnology*, v.41, n.1, p.49-53, 2003.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Extracellular Endoglucanase Production by *Rhizopus oryzae* in Solid and Liquid State Fermentation of Agro Wastes. *Asian Journal of Biotechnology*, v.2, n.1, p.27-36, 2010.

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

LEITE, R. S. R. ; BOCCHINI, D. A. ; MARTINS, E. S. ; SILVA, D. ; GOMES, E. ; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.137-140, p.281-288, 2007.

MILALA, M. A.; SHUGABA, A.; GIDADO, A.; ENE, A. C.; WAFAR, J. A. Studies on the Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme Production by *Aspergillus niger*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, v.1, n.4, p.325-328, 2005.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova* v.33, p.1549-1558, 2010.

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

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

PARRY, N J.; BEEVER, D.E.; OWEN, E.; VANDERBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J. Biochemical characterization and mechanism of action a termostrable  $\beta$ -glicosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemistry Journal*, v.353, p.117-127, 2001.

QIAN, L.; FU, S.; ZHOU, H.; SUN, J.; WENG, X. Optimization of fermentation parameters for  $\beta$ -glucosidase production by *Aspergillus niger*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v.11, n.5, p.583-591, 2012.

RODRIGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulase por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

SALES, M. R. ; MOURA, R. B. ; PORTO, T. S. ; MACEDO, G. R. ; PORTO, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, p. 1290-1296, 2010.

SILVA, L. A. D. Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis* 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.



STUTZENBERGER, F. Thermostable fungal  $\beta$ -glucosidase. *Letters in Applied Microbiology*, v.11, p.173-178, 1990.

VILLAS-BÔAS, S.G; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço da maçã. *Biotecnologia ciência e desenvolvimento*, v.14, p.38-42, 2000.

XIA, L.; CEN, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from xylose industry. *Process Biochemistry*, v.34, p.909-912, 1999.

ZIMBARDI, A. L. R. L.; SEHN, C.; MELEIRO, L. P.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; NOZAWA, M. S. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Optimization of  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification. *International Journal of Molecular Science*, v.14, p.2875-2902, 2013.