



Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais



**PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE POR CULTIVO EM ESTADO
SÓLIDO DE FUNGO FILAMENTOSO *Lichtheimia corymbifera***

Marcos Paulo Vieira de Paula

Trabalho de Conclusão de curso apresentado a
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais –
Universidade da Grande Dourados

Dourados
Mato Grosso do Sul – Brasil
2016



Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais



**PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE POR CULTIVO EM ESTADO
SÓLIDO DE FUNGO FILAMENTOSO *Lichtheimia corymbifera***

Marcos Paulo Vieira de Paula

Trabalho de Conclusão de curso apresentado a
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais –
Universidade Federal da Grande Dourados, sob orientação
do Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

Dourados
Mato Grosso do Sul – Brasil
2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitário, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo, paciência e apoio durante essa jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Aos meus amigos que me acompanharam até aqui, em especial ao Sergio Carlos Lopes Venturoli e Rodrigo Prudente Scalabrini. Ao meu parceiro de laboratório Tobias Pereira de Moraes, que me ajudou na realização deste trabalho.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

(Winston Churchill)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. OBJETIVO.....	11
3 METODOLOGIA.....	11
3.1 MICRORGANISMO UTILIZADO.....	11
3.2 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	11
3.3 EXTRAÇÃO DA ENZIMA.....	11
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
6. REFERÊNCIAS.....	16

RESUMO

As β -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de celobiose, sendo descritas diversas aplicações biotecnológicas para esse biocatalizador. O presente estudo teve como objetivo a produção em estado sólido da enzima β -glicosidase pelo fungo filamentosso *Lichtheimia corymbifera* isolado na região de Dourados - MS. O cultivo foi efetuado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5g de substratos umedecidos com solução nutriente. Alguns parâmetros de cultivo foram variados como: diferentes resíduos agroindustriais, a umidade inicial do meio e o tempo de cultivo. O fungo *L. corymbifera* teve sua melhor produção enzimática, cerca de 39 U/g, com a utilização do farelo de trigo como substrato, contendo 75% de umidade, mantido por 144 horas a 30°C. Considerando o reduzido número de trabalhos de produção de β -glicosidase por essa espécie fúngica, novos ensaios serão realizados visando a caracterização bioquímica dessa enzima.

Palavras-chave: biocatalisadores, enzimas industriais, fungos filamentosos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de β -glicosidase em diferentes substratos em cultivo em estado sólido pelo isolado, em 96 horas de cultivo, contendo 65% de umidade a 30°C para o fungo *Lichtheimia corymbifera*.....12

Tabela 2: Produção de β -glicosidase de diferentes linhagens fúngicas e em diferentes condições de cultivo.....14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Variações dos parâmetros de cultivo em estado sólido pelo <i>L. corymbifera</i> em farelo de trigo.....	13
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CES: Cultivo em Estado Sólido

DNS: 3,5-ácido dinitrosalisílico

pNPβG: substrato sintético para dosagem de β-glicosidasas

1. INTRODUÇÃO

Devido a grande geração de produtos pela agroindústria, elevadas quantidades de resíduos são produzidas, podendo afetar o meio ambiente. Por ser uma fonte renovável abundante, resíduos compostos de lignina, celulose e hemicelulose, podem ser utilizados como substratos para produzir enzimas, por cultivo em estado sólido (CES) de fungos filamentosos (SØRENSEN et al., 2013).

A celulose corresponde a mais da metade do carbono orgânico da Terra, sendo assim o polímero mais numeroso na biosfera. Seu processamento pode produzir desde papel a biocombustíveis, diminuindo a necessidade da utilização dos combustíveis fósseis e outros produtos (WANG et al., 2011).

Para a produção de biocombustíveis a celulose precisa ser hidrolisada à monômeros de glicose. O processo da hidrólise enzimática ocorre por no mínimo três enzimas distintas: endoglucanase, que hidrolisa as cadeias de celulose na parte interna, tendo como resultado uma rápida diminuição no grau de polimerização; exoglucanase, que elimina unidades de celobiose da extremidade da molécula; β -glicosidase, que hidrolisa celobiose e outras celodextrinas à glicose. A celobiose inibe as atividades das endoglucanases e exoglucanases, dessa forma, a β -glicosidase impede o acúmulo deste dissacarídeo no meio de reação, desempenhando um papel fundamental na degradação enzimática da celulose (OGEDA et al., 2010).

A hidrólise enzimática da celulose conta com algumas vantagens perante a hidrólise química, porque acontece em condições moderadas de temperatura e pH, ocasionando assim reduções no consumo de energia, corrosão dos equipamentos e ainda eliminando as etapas de neutralização. Outra importante vantagem do uso das enzimas, é que pela sua especificidade, a catálise enzimática impede a formação de subprodutos indesejáveis usualmente constatados em reações de catálise química (OLIVEIRA et al., 2015).

Apesar das vantagens destacadas anteriormente, o alto custo da enzima continua sendo um dos aspectos preocupantes e limitativos da aplicação desses biocatalisadores em larga escala. Mesmo assim, o interesse na utilização de biocatalisadores em processos industriais tem aumentado significativamente nos últimos anos. Nesse sentido, diversos esforços estão sendo realizados para reduzir o custo de produção dessas enzimas (SILVA et al., 2013).

A β -glicosidase tem a possibilidade de hidrolisar diversos substratos glicosídicos, graças a isso, torna-se apropriada para vários processos industriais,

incluindo a hidrólise enzimática de celulose, a fim de obter açúcares fermentáveis, visando a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica (GARCIA et al., 2015).

No processo de vinificação a β -glicosidase propicia a liberação de compostos aromáticos a partir dos seus precursores glicosídeos. Esses compostos liberados são chamados de terpenos. Alguns deles são: α -terpineol, citronelol, geraniol, linalool, nerol. Esses compostos, quando glicosilados, possuem baixa volatilidade e pouco contribuem para a composição do aroma do vinho. Por conter baixa estabilidade ao processo de vinificação as β -glicosidases endógena da uva não são tão eficientes. Dessa forma a utilização de enzimas microbianas que resistem aos requisitos do processo é uma alternativa para enriquecer o aroma dos vinhos (SANTOS et al., 2016).

As β -glicosidases podem ainda ser utilizadas para produção de alimentos funcionais a base de soja. Essas enzimas hidrolisam as isoflavonas da soja transformando-as em agliconas (isoflavonas desglicosiladas). As agliconas são mais facilmente absorvidas pelo trato intestinal humano. Uma dieta de alta ingestão de isoflavonas previne diversas doenças crônicas, tais como alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, sintomas da menopausa entre outras (SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2011).

O leque de alternativas de uso que a β -glicosidase dispõe para aplicação industrial, motiva a busca contínua por novas fontes microbianas capazes de produzir enzimas com alta estabilidade estrutural, em meio de baixo valor econômico (PEREIRA et al., 2015).

Embora o CES possua diversas semelhanças com o ambiente apropriado para o desenvolvimento dos microrganismos, principalmente os fungos filamentosos, há também desvantagens para serem superadas, como: A dificuldade de acesso ao substrato e baixa homogeneidade do meio, promovem uma dificuldade de controle dos parâmetros de cultivo (pH, temperatura, de umidade, e outros), o que dificulta a ampliação de escala desse tipo de bioprocessos (OLIVEIRA et al., 2016).

Considerando o conteúdo exposto anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes parâmetros de cultivo para produção de β -glicosidase pelo fungo *L. corymbifera* por fermentação em estado sólido.

2. OBJETIVO

Com o presente trabalho objetivou-se otimizar as condições de cultivo do fungo *L. corymbifera* para a produção de β -glicosidase, utilizando resíduos agroindustriais como substrato por fermentação em estado sólido.

3. METODOLOGIA

3.1 MICRORGANISMO UTILIZADO

O fungo filamentosso *Lichtheimia corymbifera* foi isolado de material vegetal em decomposição (leiras de compostagem), a 28°C e mantido em ágar Sabouraud dextrose a 4°C (MORAIS, 2015). O microrganismo foi identificado pela Coleção Brasileira de Microrganismos do Meio Ambiente e Indústria – CBMAI/Unicamp – Campinas – SP.

3.2 PROCESSO DE CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

A produção da enzima foi efetuada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g de substratos umedecidos com solução nutriente. A solução nutriente foi composta de sulfato de amônia 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% e nitrato de amônia 0,1% (m/v). O material foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos. O processo fermentativo ocorreu a 30 °C. Alguns parâmetros como o substrato, a umidade e o tempo de cultivo foram variados para a determinação das condições ótimas de crescimento e produção enzimática. Para obter os resultados esperados, primeiramente variou-se o substrato, selecionando-o, variou-se a porcentagem de umidade que por fim alternou-se o tempo de cultivo. Os resultados representam a média das duplicatas do cultivo.

3.3 EXTRAÇÃO DA ENZIMA

A extração da enzima a partir do substrato fermentado foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, posteriormente agitado a 100 rpm por 1 h. A amostra foi filtrada e centrifugada a 3000 x g por 5 min. O sobrenadante foi considerado o extrato enzimático e foi utilizado nos ensaios subsequentes (GARCIA et al., 2015).

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE NOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50 μ L do filtrado enzimático, 250 μ l de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 e 250 μ L de p-nitrofenil β -D-

glicopiranosídeo, 4mM (pNPβG, Sigma), reagindo por 10 minutos a 50°C. A reação enzimática foi paralisada com 2 ml de carbonato de sódio 2M. O p-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 μmol de p-nitrofenol por minuto de reação (GARCIA et al., 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Lichtheimia corymbifera* teve sua melhor produção de β-glicosidase, 11,6 U/g de substrato seco, com a utilização do farelo de trigo como substrato. Quando cultivado em farelo de soja, apresentou uma atividade de 3,1 U/g de substrato seco. Os outros substratos não apresentaram um resultado satisfatório para a produção da enzima (Tabela 1).

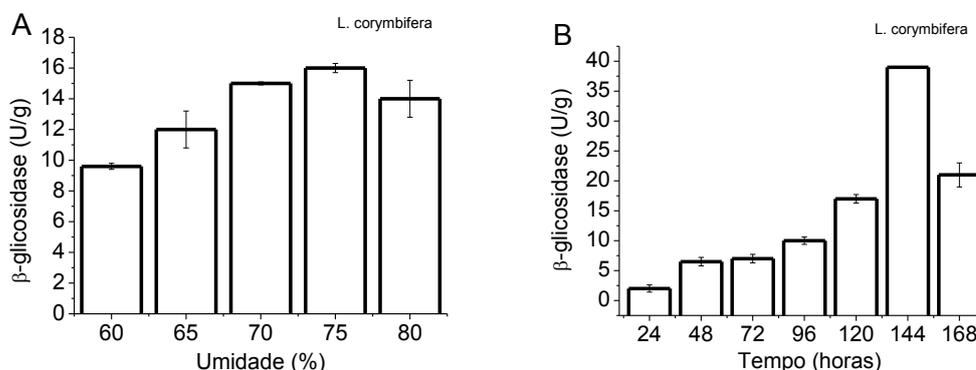
Tabela 1: Produção de β-glicosidase em diferentes substratos em cultivo em estado sólido pelo fungo *L. corymbifera*, em 96 horas de cultivo, contendo 65% de umidade a 30°C.

Substratos	β-glicosidase
Farelo de trigo	11,6 ± 0,8
Farelo de soja	3,1 ± 0,7
Palha de milho	0
Sabugo de milho	0
Casca de arroz	0
Bagaço de cana-de-açúcar	0

O farelo de trigo é descrito na literatura como um dos resíduos mais utilizados para produzir uma ampla variedade de enzimas celulolíticas (GARCIA et al., 2015; HU et al., 2011). Embora o bagaço de cana-de-açúcar seja um dos substratos que apresente os maiores teores de celulose, sua utilização como fonte de carbono é dificultada pela presença da lignina (SANTOS et al., 2012).

Após identificar qual seria o melhor substrato para a produção da enzima β-glicosidase pelo microrganismo, foram feitos novos ensaios variando o tempo de cultivo e umidade inicial do meio, a fim de otimizar a produção da enzima pelo fungo *L. corymbifera* (Figura 1).

Figura 1: Variações dos parâmetros de cultivo em estado sólido pelo fungo *L. corymbifera* em farelo de trigo



Nota - A) Produção de β -glicosidase em função da umidade inicial do meio, a 30°C por 96h. **B)** Produção de β -glicosidase em função do tempo de cultivo, a 30°C, contendo 75% de umidade inicial.

Dentre as variações de umidade avaliadas no presente trabalho, a maior produção de β -glicosidase foi obtida em cultivos contendo umidade inicial de 75% (16 U/g de substrato) (Figura 1A). No entanto, considerável produção enzimática foi obtida a 70% e 80% de umidade, sendo respectivamente de 15 U/g e 14 U/g.

Trabalhos anteriores descrevem que umidade inferior a 60% é insuficiente para conseguir uma completa hidratação do substrato. O nível de umidade adequado na fermentação em estado sólido é variável e dependente da natureza do substrato, das necessidades do microrganismo e da expressão de metabólitos desejados (PANDEY et al., 2000; HÖLKER et al., 2004).

Como pode ser observado na figura 1B, maior produção de β -glicosidase pelo microrganismo foi obtida em cultivos de 144h (39 U/g de substrato), mantendo as condições previamente otimizadas no presente trabalho (farelo de trigo contendo 75% de umidade inicial).

A produção de β -glicosidase obtida no presente trabalho é similar e até mesmo superior a descritos por diferentes espécies fúngicas quando cultivadas em resíduos agroindustriais em estado sólido (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de β -glicosidase de diferentes espécies fúngicas e em diferentes condições de cultivo.

Linhagem	Substrato	Atividade β-glicosidase (U/g)	Autor
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de trigo	2,7	Pirota; Delabona; Farinas. (2014)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	21,6	Dhillon et al. (2011)
<i>Trichoderma reesei</i>	Farelo de trigo	4,5	Sukumaran et al. (2009)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Farelo de trigo	13	Leite et al. (2008)
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	Farelo de trigo	39	Este trabalho

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o fungo *L. corymbifera* apresenta potencial para produção de β -glicosidase, quando cultivado em estado sólido em farelo de trigo. Ainda é possível destacar a importância de trabalhos com o presente escopo, que visa otimizar as condições de cultivo para a produção enzimática, considerando o ganho de aproximadamente três vezes na quantidade de enzima obtida após os ajustes de umidade e tempo de cultivo.

REFERÊNCIAS

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**. v. 34, n. 1, p. 1160-1167, 2011.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Formitopsis sp.* RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 10, p. 6065-6072, 2011.

GARCIA, N. F. L. et al. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**. Valparaíso, v. 18, n. 4, p. 314-319, 2015.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

HU, H.L. et al. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 248-252, 2011.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391 – 395, 2008.

MORAIS, T. P. Comparação do perfil catalítico e termodinâmico de diferentes B-glicosidases fúngicas. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção). Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, 2015.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A. P. A. D. et al. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. **African Journal of Biotechnology**. v. 14, n. 14, p. 1215-1223, 2015.

OLIVEIRA, A. P. A. D. et al. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, 2016, 2016.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 69-80, 2000.

PEREIRA J. C. et al. Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 175, n. 2, p. 723-732, 2015.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using enzyme extract and whole solid-state fermentation medium of two newly isolated strains of *Aspergillus oryzae*. **Chemical Engineering**. v. 38, p. 259-264, 2014.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, F. R. S. et al. Production and characterization of β -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. **African Journal of Biotechnology**. v. 15, n. 16, p. 633-641, 2016.

SILVA, C. A. A. et al. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. **Electronic Journal of Biotechnology**. Valparaíso, v. 16, n. 5, p. 9, 2013.

SILVA, L. H.; CELEGHINI, R. M. S.; CHANG, Y. K. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. **Food Chemistry**, v. 128, p. 640-644, 2011.

SOUZA, F. H. M. et al. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated b-glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochemistry**. v. 45, p. 272–278, 2010.

SØRENSEN, A. et al. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**. v. 3, n. 3, p. 612–631. 2013.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. **Renewable Energy**. v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

WANG, H. et al. High-temperature enzymatic breakdown of cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n. 15, p. 5199 –5206. 2011.