



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – DCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQUIM
MESTRADO EM QUÍMICA

CÍNTIA ALBERNAZ DAS NEVES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE β -
GLICOSIDASE PELO *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 SOB
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA PALMA FORRAGEIRA**

ILHÉUS-BA

2019

CÍNTIA ALBERNAZ DAS NEVES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE β -
GLICOSIDASE PELO *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 SOB
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA PALMA FORRAGEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC - como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Recursos Naturais e Tecnologia

Orientadora: Prof.^a Dra. Julieta Rangel de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizama Aguiar de Oliveira

ILHÉUS-BA

2019

N513

Neves, Cíntia Albernaz das.

Produção e caracterização bioquímica de β -glicosidase pelo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 sob fermentação em estado sólido da palma forrageira / Cíntia Albernaz das Neves. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.

67f. : il.

Orientadora: Julieta Rangel de Oliveira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQUIM.

Inclui referências.

Palma forrageira. 2. Glicosídeos. 3. Enzimas de fungos. 4. *Penicillium*. I. Título.

CDD 633.39098142

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conduzir-me e dar-me forças para alcançar meus objetivos.

A minha mãe Maria que é minha fortaleza, pelo amor incondicional e companheirismo.
A meus irmãos Silvoney e Fabio, por mostrar-me que sempre posso contar com seu apoio.

Aos Familiares que acreditam e torcem pelo meu sucesso, em especial ao meu saudoso pai Joel, que de onde ele esteja sei que torce e acredita em mim.

Aos amigos que compartilharam comigo as alegrias e angustias dessa caminhada. Aos meus colegas e amigos do laboratório (LaBioCat) em especial, Francielle, Edvan, Glêydison, Nájila, Nadabe, Ozana e Polly pelo auxílio e incentivo.

As professoras Julieta Rangel de Oliveira e Elizama Aguiar de Oliveira pela orientação, co-orientação e oportunidade.

Ao professor Marcelo pelas contribuições e sugestões que foram de elevada importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do PPGQUIM, a UESC (PPGQUIM) pelo apoio e a CAPES pela bolsa de mestrado.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite;

A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

Neves, C. A. **Produção e caracterização bioquímica de β -glicosidase pelo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 sob fermentação em estado sólido da palma forrageira.** 2019. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2019.

RESUMO

As β -glicosidases formam um grupo de enzimas de ampla ocorrência na natureza desempenhando funções diversas e cruciais nas vias biológicas dos seres vivos. A principal função das β -glicosidases é catalisar a hidrólise de ligações β -glicosídicas. Associada à sua função, diversas aplicações em processos industriais, principalmente para as β -glicosidases de origem microbiana, foram desenvolvidas. Neste estudo, foi investigada a produção de β -glicosidase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por meio da fermentação em estado sólido utilizando apenas a planta palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) e água como alternativa aos meios de cultura comerciais. Os parâmetros, temperatura de incubação e umidade inicial, foram otimizados utilizando o delineamento composto central rotacional. Nas condições otimizadas, a atividade enzimática de β -glicosidases foi $935 \pm 21,7$ IU g⁻¹ com 96 h de fermentação, umidade inicial 56% e temperatura a 23 °C. O extrato enzimático bruto contendo β -glicosidase foi utilizado para avaliar os efeitos da temperatura, pH, adição de íons metálicos, NaCl, solventes e compostos orgânicos na atividade de β -glicosidase, além de ser avaliada a estabilidade frente a temperatura, pH e NaCl. Os resultados encontrados indicam maior atividade reacional e estabilidade em pH 5,0 a 52 °C. A adição dos íons Na⁺, Fe²⁺ e Mg²⁺ e dos compostos EDTA, Triton X-100, lactose e do solvente diclorometano melhoraram a atividade de β -glicosidase, enquanto as espécies, Ca²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ e o SDS inibiu a atividade enzimática. Além disso, a β -glicosidase apresentou boa halotolerância, mantendo 139,93% e 95,3% da atividade residual na presença de 0,5 e 2,0 mol L⁻¹ de NaCl, respectivamente, demonstrando também haloestabilidade, mantendo 94,28% de atividade residual após 24 h de incubação com adição de NaCl (2,0 mol L⁻¹).

Palavras-chave: Palma forrageira, β -glicosidase halotolerante, celulases, *Penicillium roqueforti*

Neves, C. A. **Production and biochemical characterization of β -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 under solid state fermentation of prickly pear.** 2019. 67 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – State University of Santa Cruz, 2019.

ABSTRACT

β -glucosidases form a group of enzymes of wide occurrence in nature, performing diverse and crucial functions in the biological pathways of living beings. The main function of β -glucosidases is to catalyze the hydrolysis of β -glucosidic bonds. Associated with its function, several applications in industrial processes were developed mainly for β -glucosidases of microbial origin. In this study, the production of β -glucosidase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 was investigated by solid-state fermentation using only the forage plant (*Nopalea cochenillifera*) and water as an alternative to commercial culture media. The parameters, incubation temperature and initial moisture were optimized using the central design of the rotational compound. Under optimized conditions, the enzymatic activity of the β -glucosidases was 935 ± 21.7 IU g⁻¹ with 96 h of fermentation, initial moisture of 56% and temperature at 23 °C. The crude enzyme extract containing β -glucosidase was used to evaluate the effects of temperature, pH, NaCl, solvents and organic compounds on the activity of β -glucosidase, besides the stability against temperature, pH and NaCl. The results indicate higher reaction activity and stability at pH 5.0 and 52 °C. The addition of Na⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ ions, compounds EDTA, Triton X-100, lactose and solvent dichloromethane improved the activity of β -glucosidase, whereas the Ca²⁺, Zn²⁺ and Co²⁺ species inhibited the enzymatic activity. In addition, β -glucosidase presented good halotolerance, maintaining 139.93% and 95.3% of residual activity in the presence of 0.5 and 2.0 mol L⁻¹ of NaCl, respectively, also demonstrating halostability, maintaining residual activity 94.28% after 24 h incubation with addition of NaCl (2.0 mol L⁻¹).

Keywords: Cactus pear, halotolerant β -glucosidase, cellulases, *Penicillium roqueforti*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Estruturas tridimensional de β -glicosidase das famílias 1 (a) e 3 (b), com o sítio localizado em uma fenda no centro da enzima, sendo composto por resíduos catalíticos de ácido carboxílico.....16
- Figura 1.2** - Mecanismos de inversão de β -glicosidase.....18
- Figura 1.3** - Mecanismos de retenção de β -glicosidase.....19
- Figura 1.4** - Ilustrações do fungo *P. roqueforti*. (a) imagem do fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 (b) imagem de colônias sob microscopia óptica 4x; (c) Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior da placa Petri; (d) imagem de conidióforo e conídios corados com solução de algodão azul de lactofenol sob microscopia óptica 40x.....26
- Figura 1.5** - Imagem da planta palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*).....31
- Figura 2.1** - Produção de BGLs em função do tempo a partir da FES de *P. roqueforti* ATCC 10110 em 5 g de palma forrageira com 55% de umidade a 20 °C. As análises foram realizadas em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.....49
- Figura 2.2** - (a) Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura de incubação e umidade inicial no modelo ajustado, (b) gráfico de valores observados em função dos valores preditos, (c) gráfico de superfície de resposta e (d) gráfico contorno construído com base no modelo representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação e umidade inicial, tendo-se como resposta a atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato.51
- Figura 2.3** - (a) Atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato, em vários pHs (a mais alta atividade obtida em pH 5,0 foi tomada como 100%) (b) atividade de BGLs em diferentes temperaturas (a mais alta atividade obtida a 52°C foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.....54
- Figura 2.4** - (a) Perfil de estabilidade ao pH de BGLs e (b) Perfil de estabilidade térmica de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato. Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados. A atividade obtida sem incubação foi tomada como 100%).....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (2^2 DCCR,) com seus níveis reais e codificados (em parênteses) para as variáveis independentes temperatura de incubação (T, °C) e umidade (U, %), e considerando a variável dependente (resposta) como a atividade de BGLs (IU g⁻¹) de *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10⁷ de esporos por grama de substrato.

.....50

Tabela 2.2 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo reduzido ajustado na otimização da produção de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10⁷ de esporos por grama de substrato.....52

Tabela 2.3 Atividade relativa de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10⁷ de esporos por grama de substrato, no extrato enzimático bruto de esporos por grama de substrato, frente à adição de 10mM em meio reacional de diferentes sais metálicos e compostos orgânicos incubado em pH 5,0 a 52 °C por 30 min.58

Tabela 2.4 - Efeito da adição de diferentes concentrações de solventes orgânicos na atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10⁷ de esporos por grama de substrato. Condições de reação: pH 5,0, 52 °C, 10 min.59

Tabela 2.5 - Efeito da adição de diferentes concentrações de NaCl e estabilidade da atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir de FES em 5,0 g de palma forrageira com 10⁷ de esporos por grama de substrato. Condições de reação: pH 5,0, 52 °C, 10 min.61

LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------|--|
| FES | Fermentação em estado sólido |
| IU g ⁻¹ | Unidade internacional de atividade enzimática por grama de substrato |
| BGLs | β -glicosidases |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| g | Força g |
| BOD | Incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| <i>p</i> -NP β Glc | <i>p</i> -nitrofenil- β -D-glucopiranósido |
| SQ | Soma dos quadrados |
| <i>p</i> -NP | <i>p</i> -nitrofenol |
| ANOVA | Análise de variância |
| R ² | Coefficiente de determinação |
| R ² -adj | Coefficiente de determinação ajustado |
| GL | Grau de liberdade |
| SQ | Soma dos quadrados |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| DMF | Dimetilformamida |

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.2 OBJETIVOS | 13 |
| 1.2.1 Objetivo Geral | 13 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos | 13 |
| 1.3 REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 1.3.1 Características gerais e classificação de β -glicosidases | 14 |
| 1.3.2 Estrutura e mecanismo de hidrólise de β -glicosidases | 15 |
| 1.3.3 Aplicações de β -glicosidases | 20 |
| 1.3.3.1 Hidrólise da celulose | 20 |
| 1.3.3.2 Hidrólise de Isoflavonas e terpenos | 22 |
| 1.3.3.3 Outras aplicações biotecnológicas | 23 |
| 1.3.4 <i>Penicillium roqueforti</i> | 25 |
| 1.3.5 Fermentação em estado sólido | 27 |
| 1.3.6 Palma Forrageira | 29 |
| 1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 32 |
| 1.5 REFERÊNCIAS | 33 |

CAPÍTULO 2

Produção e caracterização bioquímica de β -glicosidase halotolerante de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 sob fermentação em estado sólido

| | |
|---|----|
| 2.1 Introdução | 42 |
| 2.2 Materiais e métodos | 44 |
| 2.2.1 Microrganismo e inóculo | 44 |
| 2.2.2 Substrato | 44 |
| 2.2.3 Fermentação em estado sólido | 44 |
| 2.2.3.1 Perfil fermentativo | 44 |
| 2.2.3.1.1 Obtenção do extrato enzimático bruto | 45 |
| 2.2.3.2 Determinação da atividade enzimática | 45 |
| 2.2.3.3 Planejamento experimental e análise estatística | 46 |
| 2.2.4 Caracterização bioquímica | 46 |
| 2.2.4.1 pH e temperatura ótima | 46 |
| 2.2.4.2 Estabilidade térmica e ao pH | 46 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.3 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos | 47 |
| 2.2.4.4 Efeitos da adição de solventes | 47 |
| 2.2.4.5 Efeito de NaCl na atividade e estabilidade de β -glicosidase | 48 |
| 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 2.3.1 Perfil fermentativo..... | 48 |
| 2.3.2 Otimização da produção de β -glicosidase | 49 |
| 2.3.3 Caracterização bioquímica | 53 |
| 2.3.3.1 pH e temperatura ótima | 53 |
| 2.3.3.2 Estabilidade térmica e ao pH | 55 |
| 2.3.3.3 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos | 57 |
| 2.3.3.4 Efeitos da adição de solventes | 59 |
| 2.3.3.5 Efeito de NaCl na Atividade e Estabilidade de β -glicosidase | 60 |
| 2.4 CONCLUSÃO..... | 62 |
| 2.5 REFERÊNCIAS | 63 |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As β -glicosidases atuam com funções diversificadas em uma grande variedade de organismos como bactérias, fungos, plantas e animais, inclusive nos humanos. Estas enzimas agem principalmente catalisando a hidrólise de aril, amino ou alquil- β -D-glicosídios, glicosídios cianogênicos, oligossacarídeos de cadeia curta e dissacarídeos. As β -glicosidases consistem em um grupo de destaque entre as enzimas glicosídeo hidrolases e vem sendo largamente estudadas devido à possibilidade de utilização em diversos processos biotecnológicos (SALGADO et al., 2018).

Estas enzimas possuem ampla especificidade, expressando sua função dependendo de sua origem, nesse sentido, as β -glicosidases provenientes de fungos filamentosos são as preferidas para produção enzimática para fins biotecnológicos, por apresentar melhor rendimento e estabilidade enzimática, podendo atuar em diferentes setores de produção, como na indústria têxtil, alimentícia, produção de detergente, agricultura, pecuária e setores de bioconversão (LI et al., 2018; SANTA-ROSA et al., 2018).

Entre as possibilidades de aplicação das β -glicosidases, destaca-se a sua utilização no processo de hidrólise enzimática da celulose. Neste processo, os materiais lignocelulósicos são utilizados como matéria prima renovável, abundante e de baixo custo para conversão da celulose em açúcares fermentáveis, que em geral são direcionados a produção de combustíveis, alimentos e compostos químicos (WOJTUSIK et al., 2018; AHMED et al., 2017).

Os materiais lignocelulósicos são majoritariamente compostos por celulose (40–60%), hemicelulose (20-30%) e lignina (15-30%) (ASHA et al., 2016). A celulose é seu principal constituinte, possuindo em sua estrutura várias unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas, a hidrólise destas ligações pode ser catalisada pela atuação de um sistema enzimático altamente específico e de forma sinérgica composto, principalmente por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (PARK et al., 2018). Um dos fatores limitantes para o processo de hidrólise da celulose é a retroalimentação, que leva a inibição das enzimas endoglucanases e exoglucanases pelo seu produto de hidrólise, a celobiose. Porém, a β -glicosidase atua justamente degradando a celobiose, assim a sua atuação pode ser considerada como reguladora do processo de hidrólise da celulose. Nesse sentido, as pesquisas voltadas para encontrar β -

glicosidasas com maior rendimento e estabilidade tem sido o foco de várias pesquisas, visto sua importância para o rendimento da conversão de celulose a açúcar fermentáveis (XIA et al., 2018; AUTA et al. 2017; AHMED et al., 2017).

A indução da expressão destas enzimas em fungos, incluindo as β -glicosidase, pode ocorrer principalmente pela utilização de celobiose e celulose, entre outras fontes de carbono como substrato (SUTO; TOMITA, 2001). Sendo assim, é importante a escolha do meio de cultura, pois o mesmo não serve apenas como suporte, mas também como fonte de nutrientes para o desenvolvimento microbiano.

A palma forrageira é uma planta largamente difundida na região Nordeste do Brasil, rica em carboidratos, vitaminas e composta por $319,26 \pm 0,55 \text{ g kg}^{-1}$ de celulose, a utilização desta planta como substrato já demonstrou bons resultados para produção de enzimas celulolíticas (SANTOS et al., 2016; SANTOS et al., 2015). Nesse sentido, utilizar a palma forrageira como substrato apresenta características promissoras para produção de β -glicosidasas de origem fúngica.

Através da fermentação em estado sólido (FES) é possível a utilização de substratos alternativos aos meios de cultura comercial, como a palma forrageira, e também possibilita a utilização de resíduos agroindustriais e diversas matérias lignocelulósicas de baixo custo. Essa técnica tem se mostrado bastante promissora por apresentar uma série de benefícios, como, alta produtividade, vantagens econômicas, baixa contaminação bacteriana, favorecimento da estabilidade das enzimas secretadas, simplicidade de processo e diminuição da produção de águas residuais (ZAHAO et al., 2018; OHARA et al., 2018).

Uma das restrições a FES é quanto ao cultivo do microrganismo, pois esta técnica adequa-se melhor a microrganismos que crescem a baixos teores de umidade, demonstrando ser mais eficiente utilizando-se fungos filamentosos, por reproduzir um habitat muito próximo ao seu natural (HANSEN et al., 2015). Dentre os fungos filamentosos, os do gênero *Penicillium* tem sido caracterizado como bons produtores de enzimas incluindo as celulolíticas, como as β -glicosidasas (SANTA-ROSA et al., 2018; MARJAMAA et al., 2013; MAEDA et al., 2013). O *Penicillium* possui características favoráveis à fermentação, tais como, bom crescimento em baixo valores de pH e capacidade de utilizar uma variedade de compostos químicos como substrato, incluindo pentoses e hexoses (MIOSO et al., 2014).

Nesse sentido, realizamos a FES do fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 utilizando como substrato a palma forrageira objetivando a produção de β -glicosidase, visto que essa é uma alternativa promissora, considerando as características favoráveis do substrato e do fungo a ser utilizado. Porém, alguns fatores podem ser críticos para viabilidade e bons resultados dessa técnica, assim, foram realizados a investigação da influência do tempo de fermentação, umidade inicial e temperatura através do delineamento composto central rotacional, identificando assim, as melhores condições para produção de β -glicosidase pelo fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 em palma forrageira. Além de identificar as melhores condições de produção enzimática, foi realizada a caracterização bioquímica do extrato bruto obtido, a fim de avaliar as características de β -glicosidase que podem favorecer a sua utilização em processos industriais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar bioquimicamente a enzima β -glicosidase pelo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 a partir da fermentação em estado sólido utilizando como substrato a planta palma forrageira.

1.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a produção de β -glicosidase pelo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 a partir da fermentação em estado sólido utilizando como substrato a planta palma forrageira;
- Verificar os parâmetros de fermentação: temperatura de incubação, umidade inicial e tempo sobre a produção de β -glicosidase e determinar as condições que levam a aumentar a produção enzimática;
- Caracterizar bioquimicamente a β -glicosidase obtida.

1.3 REFERENCIAL TEÓRICO

1.3.1 Características gerais e classificação de β -glicosidases

Existe uma variedade de enzimas que atuam na clivagem das ligações glicosídicas, estas ocorrem em grande variedade na natureza e isso leva a atuação específica das enzimas em consequência da diversidade dos substratos (WITHERS, 2001). As enzimas glicosil-hidrolases formam um grupo de enzimas que catalisam a clivagem seletiva das ligações glicosídicas, dentre as enzimas desse grupo destacam-se as β -glicosidases.

As β -glicosidases desempenham funções diversas e cruciais em vias biológicas, por exemplo; nas plantas, essas enzimas atuam na defesa contra patógenos, hidrólise de propulsores de hormônios, liberação de compostos aromáticos, germinação, degradação da parede celular durante o processo de amadurecimento de frutos, entre outras funções (AHMED et al., 2017; JEYA et al., 2010; SARRY; GUNATA, 2004; GERARDI, et al., 2001). Em fungos e bactérias essas enzimas atuam na assimilação de carbono proveniente de substratos de oligossacarídeos, e em seres humanos, as β -glicosidases realizam o catabolismo das ceramidas glicosídicas e outros glicosídeos conjugados (JEYA et al., 2010; WALLECHA; MISHRA, 2003; BHATIA et al., 2002)

De acordo com as condições de cultivo, as β -glicosidases podem ser produzidas intracelular, extracelular ou associadas à parede celular em vários organismos. A classificação destas enzimas pode ser realizada de acordo com o substrato específico e com a identidade da sequência de aminoácidos. A depender da origem e função fisiológica da enzima, a sua especificidade ao substrato é definida e assim, as β -glicosidases podem ser classificadas em três classes. Classe I, contem as aril β -glicosidases, que hidrolisam apenas aril- β -glicosídeos, classe II que contém as celobíases, responsáveis pela hidrólise dos oligossacarídeos e classe III que contém as β -glicosidases que possuem ampla especificidade de substrato (BAI et al., 2013; WOODWARD; BHATIA et al., 2002).

Atualmente, a identificação e classificação das β -glicosidases ocorrem através da similaridade entre sua sequência de aminoácidos, uma vez que, por meio das informações genéticas é possível definir as características estruturais e mecanismos catalíticos das enzimas, permitindo sua melhor identificação, principalmente, pelo fato de enzimas sofrerem degradação e modificações evolutivas em sua estrutura (BHATIA

et al., 2002). Ao longo dos anos, foram propostos vários métodos de classificação baseados nas sequências dos genes das β -glicosidases, porém todos foram substituídos pelo esquema proposto por Henrissat e Bairoch (1996) que se fundamenta na análise de agrupamento hidrofóbico da enzima, ou seja, na sua sequência e semelhanças de dobramento.

A maioria das β -glicosidases caracterizadas atualmente pertence à classe III, que atuam na clivagem das ligações glicosídicas β 1,4; β 1,6; β 1,2 e α 1,3; α 1,4; e α 1,6 (BAI et al., 2013; BHATIA et al., 2002; RIOU et al., 1998). Na categoria das glicosil-hidrolases são classificadas 115 famílias, sendo as β -glicosidases pertencentes a família 1, 3, 5, 9, 10 e 30 (CAIRNS; ESEN, 2010). A família 1 contém as β -glicosidases produzidas em Archaeobacteria, plantas e mamíferos e a família 3 contém β -glicosidases que são encontradas em fungos, bactérias e plantas, a maioria das β -glicosidases caracterizadas pertence a essas duas famílias (BAI et al., 2013; VARGHESE et al., 1997).

A classificação das β -glicosidases em famílias facilita a compreensão do mecanismo de ação, estrutura e relação de determinada enzima com outras pertencentes a categoria das glicosil-hidrolases, pois, com base nas semelhanças de sequência de aminoácidos, característica de cada família, há correlação com os mecanismos enzimáticos e a dobra de proteínas mais do que a especificidade da enzima. Conseqüentemente, essas famílias podem ser usadas para classificar de forma preliminar, proteínas de função não caracterizada, mas que possuem a similaridade de sequência de aminoácidos com uma enzima caracterizada experimentalmente (CAIRNS; ESEN, 2010; CANTAREL, 2009)

1.3.2 Estrutura e mecanismo da hidrólise de β -glicosidases

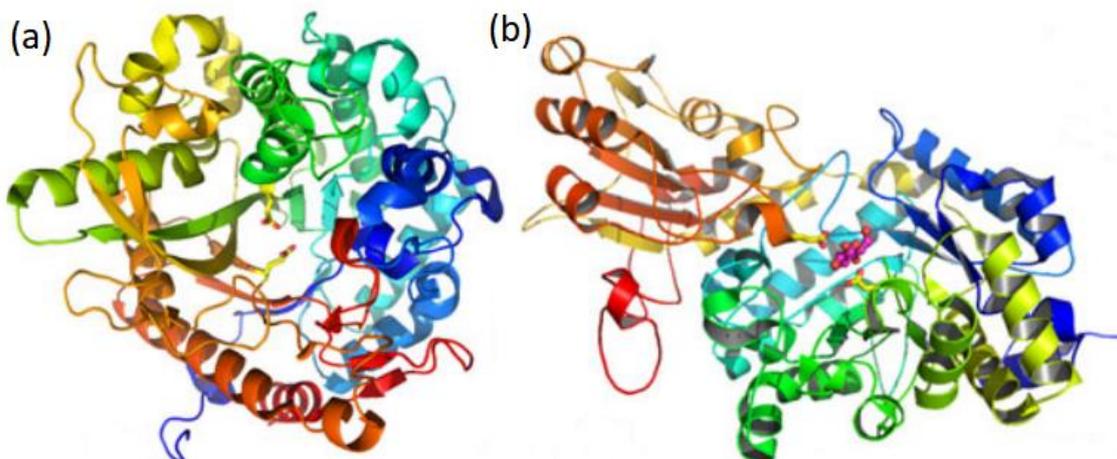
Conhecer o mecanismo de reação enzimática de forma detalhada possibilita a aplicação eficiente desses biocatalizadores. Atualmente, a β -glicosidases tem sido explorada para aplicações em diferentes processos biotecnológicos e com isto trabalhos que objetivam investigar e entender a base molecular, que permite a ampla especificidade de substrato destas enzimas, tem sido ampliado (FUSCO et al., 2018; CAO et al., 2015; BHATIA et al., 2002). A identificação de aminoácidos que constituem o sítio ativo destas enzimas é essencial para entender a relação entre a estrutura e função, visto que, a depender das condições de produção enzimática como; atividade de água ou umidade, alta concentração de substrato e a presença de

nucleófilos diferentes da água, as β -glicosidases podem catalisar a síntese de ligações β -glicosídicas entre diferentes moléculas (BHATIA et al., 2002).

A análise estrutural de várias β -glicosidases demonstraram que elas podem dobrar-se de diversas maneiras, assim existem várias estruturas tridimensionais que já foram desvendadas, no entanto, apesar dessa variedade, as β -glicosidases apresentam o domínio catalítico semelhante em cada família, possuindo a α -hélices e folhas- β localizadas em posições similares na sua conformação enovelada.

As famílias 1, 5, e 30 possuem forma similar com um domínio em forma de barril (β/α) 8 (barril TIM) que contém seu sítio ativo dois glutamatos, esses atuam como ácido base/catalítico e nucleófilo, respectivamente. Dependendo da presença de domínios auxiliares, massa e tamanho das subunidades, as β -glicosidases podem sofrer alterações. Já as enzimas pertencentes à família 3, possuem dois domínios que contribuem para a formação do sítio ativo (Figura 1.1) (CAIRNS, ESEN, 2010).

Figura 1.1 Estruturas tridimensional de β -glicosidases das famílias 1 (a) e 3 (b), com o sítio localizado em uma fenda no centro da enzima, sendo composto por resíduos catalíticos de ácido carboxílico.



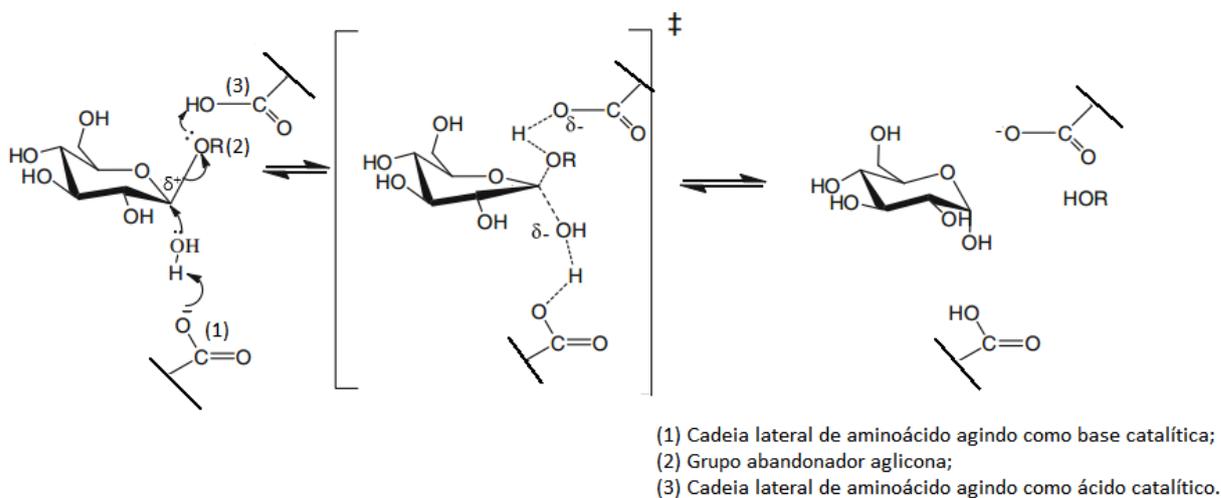
Fonte: Cairns e Esen (2010)

A depender do número de aminoácidos e de modificações após a tradução, por exemplo; na glicosilação, as β -glicosidases podem apresentar variado peso molecular dando origem a isoformas destas enzimas. As β -glicosidases pertencentes à família 1 têm 400-550 aminoácidos de comprimento com pesos moleculares de 40-60 kDa. Já as enzimas da família 3 contém 600-900 aminoácidos de comprimento, seu peso molecular pode variar de 65 a 1130 por subunidade, devido a predisposição desse grupo de enzimas a apresentar glicosilação (AHMED et al., 2017)

O principal fator que influencia a manifestação das variações estruturais de β -glicosidases são as fontes de carbono, as β -glicosidases sintetizadas por microrganismos são induzidas e sintetizadas em resposta a certos metabólitos presentes no meio de cultura. Estes metabólitos costumam ser carboidratos de baixo peso molecular incorporados ao meio de cultura ou sintetizado por outras enzimas secretadas para o meio, assim, há uma variedade de substratos glicosídicos que estas enzimas podem hidrolisar, tais como, dissacarídeos fosforilados, glicosídeos cianogênicos, dissacarídeos como celobiose e lactose, entre outros. O mecanismo pelo qual estas isoformas são geradas não é bem compreendido, embora provavelmente elas sejam produzidas pela multiplicidade de genes e modificações pós-traducionais (AHMADE et al., 2017; SANZ-APARICIO et al., 1998).

As β -glicosidases apresentam dois mecanismos de ação que ocorre através de uma reação de substituição com diferentes resultados estereoquímicos com cinética de "primeira ordem" ou "segunda ordem". Um dos mecanismos ocorre através da inversão da configuração anomérica (Figura 1.2) e outro pelo mecanismo de retenção da configuração anomérica no local de hidrólise (Figura 1.3). Atualmente, as famílias 1 e 3 agrupam as mais importantes e bem caracterizadas β -glicosidases, estas hidrolisam seus substratos pelo mecanismo de retenção da configuração anomérica (WITHERS, 2001; KOSHLAND, 1953; HENRISSAT et al., 1995).

Figura 1.2 Mecanismos de inversão de β -glicosidase.

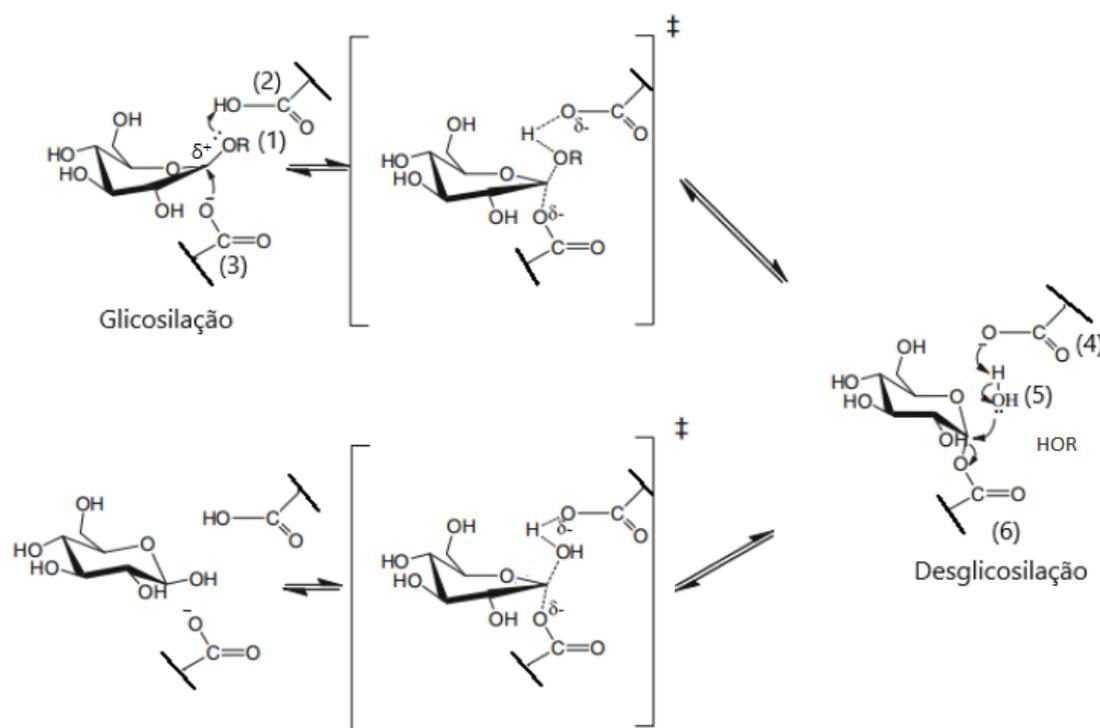


Fonte: Adaptado de Cairns e Esen (2010).

Os dois mecanismos de ação das β -glicosidases envolvem um intermediário de ligação covalente glicosil-enzima formado e hidrolisado com assistência catalítica ácido/base da cadeia lateral de dois aminoácidos, geralmente aspartato ou glutamato. As enzimas que atuam por meio do mecanismo de inversão iniciam a reação com uma molécula de água desprotonada pela base catalítica, tornando-se um bom nucleófilo e assim, atacando direto o carbono anomérico como mostrado na Figura 1.2. O mecanismo passa por um estado de transição, cujas ligações entre o nucleófilo (OH^-) e o carbono anomérico estão sendo formadas e a aglicona (OR) está sendo protonada pelo ácido catalítico, e assim, liberando a aglicona protonada como grupo abandonador. Este mecanismo ocorre em uma única etapa levando a inversão da configuração de ligação do átomo de carbono anomérico (CAIRNS; ESEN, 2010; KOSHLAND, 1953).

No entanto, as mais expressivas e bem caracterizadas β -glicosidases pertencentes à família 1, 3 e 30 realizam o mecanismo de retenção da configuração. As enzimas das famílias 1 e 30 utilizam dois glutamatos no sítio catalítico, um como nucleófilo e outro como ácido base/catalítico. Já em relação à família 3, poucas estruturas de β -glicosidases foram resolvidas, porém, é sabido que utilizam um aspartato no ataque nucleofílico e um glutamato como doador de prótons (CANTAREL et al., 2009).

Figura 1.3 Mecanismos de retenção de β -glicosidase.



- (1) Aglicona, grupo abandonador;
- (2) Cadeia lateral de aminoácido agindo como ácido catalítico;
- (3) Cadeia lateral de aminoácido agindo como nucleófilo catalítico;
- (4) Cadeia lateral de aminoácido agindo como base catalítica;
- (5) Molécula de água ativada agindo como nucleófilo;
- (6) Liberação do nucleófilo catalítico.

Fonte: Adaptado de Cairns e Esen (2010).

Quanto ao mecanismo de retenção, estas enzimas atuam em duas etapas, glicosilação e desglicosilação (Figura 1.3). Na glicosilação, a aglicona abandona a molécula com a retirada de um próton do ácido catalítico e ataque nucleófilo pela base catalítica ao carbono anomérico, formando um intermediário enzima-glicosídeo com a ligação parcialmente rompida entre o carbono anomérico e a aglicona e ligação parcialmente formada entre o carbono anomérico e o nucleófilo catalítico (Figura 1.3). Na etapa de desglicosilação, a atuação enzimática ocorre de modo invertido, uma molécula de água, ao ser desprotonada pela base catalítica, age como nucleófilo atacando o carbono anomérico, e assim, liberando o nucleófilo catalítico da molécula de glicose (Figura 1.3) (CAIRNS; ESEN, 2010).

1.3.3 Aplicações de β -glicosidasases

Do ponto de vista biotecnológico, as β -glicosidasases provenientes de fungos são preferidos sobre as de origem bacteriana, devido à facilidade no processo de recuperação com alta atividade, além de sua estabilidade em ampla gama de pHs e temperaturas (BAI et al., 2013; LIS; SHARON, 1993). As β -glicosidasases já foram isoladas de diferentes espécies de fungos, principalmente filamentosos, na busca de enzimas mais estáveis, ativas e específicas, que possibilitem a viabilidade da sua aplicação em larga escala, já que os principais impedimentos para exploração comercial de β -glicosidasases, bem como de biocatalisadores, no geral, é seu baixo rendimento, baixa estabilidade e especificidade associada seu alto custo de produção. Assim, explorar β -glicosidasases com características bioquímicas vantajosas e com baixo custo de produção deve ser o foco das pesquisas dessa área (BHAT; BHAT, 1997). As β -glicosidasases possuem ampla gama de potenciais aplicações biotecnológicas, baseadas principalmente na atividade hidrolítica e na atividade sintética destas enzimas (AHMED et al., 2017).

1.3.3.1 Hidrólise da celulose

As enzimas que apresentam atividade de hidrólise têm sido usadas em algumas aplicações, tais como, hidrólise de celobiose e oligossacarídeos curtos à glicose durante a hidrólise da celulose. A glicose produzida pode ser destinada para fermentação na produção de etanol ou outro biocombustível, o etanol proveniente da hidrólise de celulose tem sido avaliado como uma alternativa potencial para produção de combustível, visto que, possui como fonte matéria prima renovável e abundante, considerando que a matéria prima usada para produção deste biocombustível, pode ser proveniente de resíduos agroindustriais, que chegam a uma produção anual cerca de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas (ANDRADE et al., 2017; NG et al., 2010; OLAJUYIGBE et al., 2016)

Além da produção de combustíveis, a hidrólise enzimática da celulose também é utilizada na nutrição animal, ou seja, em ração animal, com função principal de facilitar e aumentar a digestibilidade de nutrientes e dos polissacarídeos não amiláceos, proporcionando melhor qualidade para a carne e o leite produzidos (MARTINS et al., 2006; LEWIS et al., 1996). As β -glicosidasases, juntamente, com outras enzimas do

complexo celulolítico ainda são usadas como facilitadoras ou catalizadoras no processo industrial de desbote de jeans. Neste processo, as enzimas agem diretamente sobre a celulose do tecido, ou seja, o algodão, realizando o desbote de forma mais suave, sem danificar o tecido, além de reduzir os gastos de água associando ao processo sem os biocatalizadores (KNOLL, 2011; LOPES, 2011).

Para conversão da celulose em açúcares fermentescíveis é necessária a ação de um complexo de enzimas que atuam em conjunto apresentando sinergismo, isto é, atuando em conjunto, as enzimas apresentam um rendimento maior do que a soma dos rendimentos individuais. Assim, para hidrólise eficiente da celulose é preciso um complexo de enzimas formado, principalmente, pela endoglucanase, que atua na clivagem da cadeia de celulose de forma aleatória gerando celo-oligossacarídeos, exoglucanase que atuam exoliticamente na extremidade redutora ou não-redutora da cadeia de celulose liberando celobiose e β -glicosidases que hidrolisam celobiose e celo-oligossacarídeos a glicose. A atuação da β -glicosidases tem grande relevância no processo de hidrólise, pois ela consegue retirar do meio a celobiose, que em excesso pode inviabilizar o processo inibindo a endoglucanases e exoglucanases (ANDRADE et al., 2017; NG et al., 2010).

Apenas alguns microrganismos avaliados apresentam produção de todas as enzimas do complexo celulolítico muitos desses microrganismos produzem celulasas com deficiência de β -glicosidases, como por exemplo; o fungo *Trichoderma reesei*, que é um dos mais utilizados na produção de celulasas, produzem baixa quantidade de β -glicosidases, sendo necessário a suplementação de β -glicosidases para aumentar a taxa de conversão de celulose em glicose, sendo assim, a exploração de fungos com potencial para produção de β -glicosidases com alto rendimento e estabilidade é relevante e tem atraído cada vez mais pesquisas (NG et al., 2011; KUMAR et al., 2008; SANTA-ROSA et al., 2018).

Além da necessidade de suplementação de β -glicosidases, a hidrólise enzimática de celulose possui alguns entraves econômicos e tecnológicos, a princípio é necessário que as enzimas do complexo celulolítico estejam em níveis e condições ótimas, e para viabilidade da aplicação dessas enzimas, seria necessário sua produção a baixo custo, no entanto, o que é observado é um alto custo para produção destas enzimas associada a seu baixo rendimento, baixa estabilidade e baixa especificidade impedindo a exploração

do potencial comercial das celulases destinadas a hidrólise de celulose (BHAT; BHAT, 1997).

Desse modo, a produção de combustíveis por meio da hidrólise celulítica e outras aplicações que requer a ação do complexo celulolítico precisam vencer esses entraves para que sua aplicação em larga escala nos processos industriais sejam mais difundidas.

1.3.3.2 Hidrólise de isoflavonas e terpenos

As isoflavonas e os glicosídeos isoflavonóides são fenólicos que ocorrem naturalmente em plantas e são encontradas abundantemente na soja, especula-se que através do seu consumo, esses compostos podem trazer diversos benefícios à saúde humana, como redução do risco de doenças cardiovasculares, taxas mais baixas de câncer de próstata, mama e cólon, melhoria da saúde óssea e prevenção de danos oxidativos em tecidos vivos, devido a sua capacidade antioxidante (SONG, et al 2011; DONKOR; SHAH, 2008). Porém, as isoflavonas presentes na soja existem, predominantemente, nas formas glicosídicas, elas são conjugadas com açúcares e raramente são encontrados em formas agliconas, sendo que em sua forma glicosídica a absorção destas isoflavonas não ocorre de forma efetiva no organismo humano (AHMED et al., 2017; SONG, et al., 2011)

Por tanto, as formas glicosídicas das isoflavonas requerem hidrólise para biodisponibilidade e metabolismo subsequente, a atuação das β -glicosidases no processo de desglicosilação de isoflavonas vem sendo exploradas para transformação destes compostos em sua forma biodisponível nos alimentos de soja como tofu, leite e iogurtes, agregando aos mesmos os benefícios de prevenção a doenças associados as isoflavonas em sua forma aglicanas.

A liberação de composto aromáticos realizada pelas β -glicosidases no processo de vinificação é uma de suas aplicações que também vem ganhando destaque na indústria (BARBAGALLO et al., 2004; AHMED et al., 2017). As β -glicosidases realizam mecanismo de hidrólise dos precursores glicosídicos do aroma, especialmente, os terpênicos, entre eles; nerol, α -terpineol, geraniol, linalol, citronelol e outros que, quando são glicosilados, apresentam baixa volatilidade e contribuem pouco para o aroma do vinho (PEREIRA et al., 2015). Assim, quando esses compostos terpênicos

glicosilados, que não são voláteis e sem sabor, sofrem clivagem da ligação glicosídica catalisado por β -glicosidases seguido da liberação dos monoterpenos, o vinho adquire sabor acentuado e aroma que é um dos parâmetros essenciais para determinar sua qualidade (POGORZELSKI et al., 2007).

Além de ser aplicada para melhorar aroma e sabor dos vinhos, as β -glicosidases também exerce esta função em sucos de frutas, porém o que tem sido observado é que as enzimas nem sempre são adequadas para tais processos devido a sua baixa estabilidade nas condições duras na produção do vinho e sucos, tais como: baixo pH, baixas temperaturas e altas concentrações de etanol e glicose (VILLENA, et al., 2006). Nesse sentido, têm sido realizados vários estudos com intuito de encontrar enzimas adequados para estes processos, demonstrando que as enzimas provenientes de fungos filamentosos têm potencial para essa finalidade (PEREIRA et al., 2015; POGORZELSKI et al., 2007; MICHLMAYR et al., 2010)

1.3.3.3 Outras aplicações biotecnológicas

A versatilidade da atuação da β -glicosidase é expressa também na indústria farmacêutica, estas enzimas podem ser utilizadas para hidrolisar a glicose a partir de várias estruturas de substratos, levando ao aumento dos efeitos farmacológicos em diversos compostos químicos, entre eles o resveratrol, norisoprenóides, terpenos e fenóis voláteis (KUO, et al., 2018). A síntese de tais compostos, por meio da catálise enzimática, fornece a vantagem regio-, estereoseletiva, além do uso de condições suaves, comparado aos métodos químicos que são inespecíficos e exigem condições severas (AHMED et al., 2017).

As β -glicosidases também podem hidrolisar antocianinas, que são consideradas um dos principais agentes de cor encontrados em alimentos de origem vegetal (SPAGNA et al., 2000). Além da atividade hidrolítica, muitas β -glicosidases podem catalisar a formação de ligações glicosídicas por hidrólise reversa controlada termodinamicamente, ou por transglicosilação, cineticamente controlada, processo que envolve a esterificação direta de um doador de glicosila e um aceptor, produzindo sofrorose, laminaribiose, celobiose e gentiobiose que podem ser utilizados na fabricação de nutracêuticos ou farmacêuticos (FUSCO et al., 2018; KUMAR et al., 2017; UCHIYAMA et al., 2013)

Já na indústria de cerveja, as β -glicosidases são utilizadas para promover a melhora da qualidade, pois ajudam no processo de filtração através da clivagem catalítica das ligações β -1,3 e β -1,4 de glicanas presentes em cevadas de baixa qualidade (BHAT; BHAT, 1997). Elas ainda são usadas na indústria de bebidas para clareamento de sucos e em processos de maceração ou liquefação, participando da celulólise (BHATIA et al., 2002).

Outra aplicação relevante da β -glicosidases é atuar no processo de desintoxicação de glicosídeos cianogênicos, estes compostos são produzidos por sistema de defesa de vegetais quando o tecido é macerado durante a preparação do alimento ou por mastigação. O ácido cianídrico (HCN) pode ser encontrado em tecidos de vegetais, como raízes e folhas de mandioca, feijão e semente de linho. Dentre estes alimentos, a mandioca é um dos mais consumidos em países tropicais e parte da Ásia, sendo esse vegetal conhecido por conter glicosídeos cianogênicos tóxicos, como a linamarina e a lotaustralina, o consumo prolongado de mandioca, com a presença desses compostos tem sido relacionado à síndrome do sistema nervoso central. Com a adição de linamarase exógena e β -glicosidase, durante o processamento da mandioca, pode eliminar os compostos cianogênicos (AHMED et al., 2017; BHALLA et al., 2017; NZWALO; CLIFF, 2011)

As β -glicosidases ainda podem atuar no monitoramento da presença de compostos fenólicos glicosídicos em óleo de oliva virgem, a presença destes compostos indica a qualidade do azeite trazendo benefícios para o organismo como ação antioxidante, combate a inflamação sistêmica e protrombótico (ROMERO-SEGURA et al., 2012). E ainda estudos como de Dog et al. (2017) revelam que a β -glicosidase através da hidrólise de celobiose é utilizada para produção de ácido succínico, um composto extensivamente aplicado para a produção de solventes, produtos químicos, polímeros biodegradáveis e farmacêuticos (DOG et al., 2017).

Finalmente, a β -glicosidase, juntamente com outras enzimas celulolíticas e hemicelulases, é utilizada em reciclagem de papel, extração de ágar a partir de algas e síntese de alquil- e aril- β -glicosídeos que são utilizados como surfactantes não iônicos com vantagens de estabilidade química, segurança, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana. Eles podem ser usados em indústrias de detergentes, farmacêuticas,

alimentícias e de cosméticos (AHMED et al., 2017; RATHER; MISHRA, 2013; BEGUIN et al., 1993).

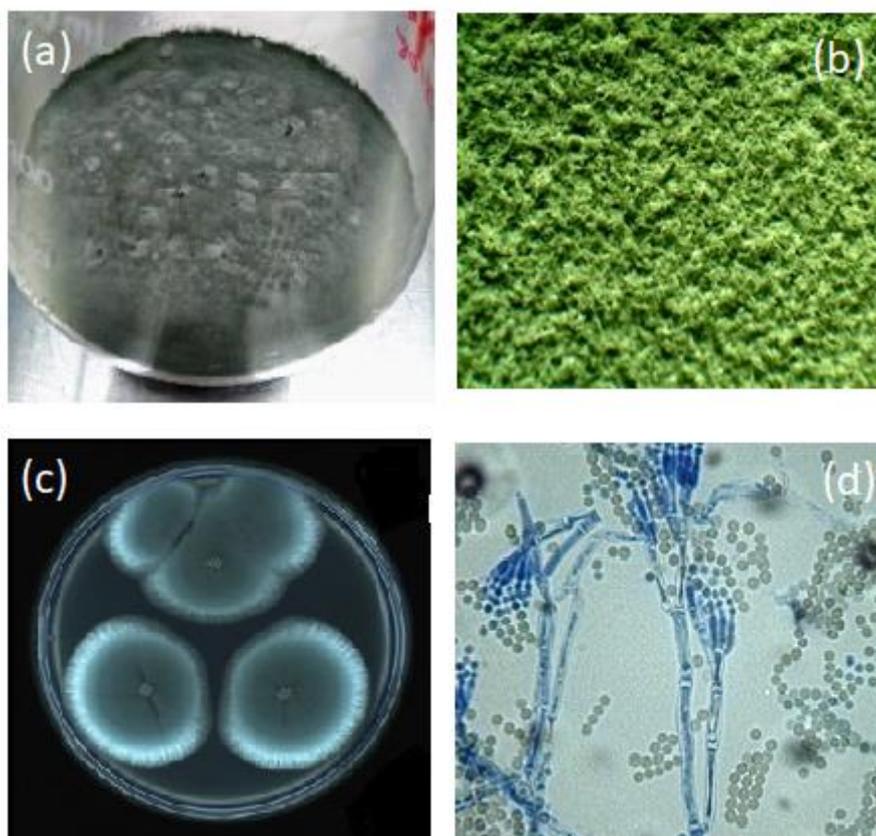
1.3.4 *Penicillium roqueforti*

O gênero *Penicillium* é bem difundido na natureza de ocorrência nos mais variados tipos de *habitat* que incluem solos, vegetações, madeiras, sementes e vários produtos alimentícios, apresentando uma grande variedade de espécies com variações em sua morfologia que podem levar a diferentes propriedades específicas a cada uma delas, desse modo, explorar diferentes espécies de *Penicillium* tem importância para delimitar a aplicação deste fungo a determinadas finalidades, como na produção de queijos ou na produção de metabólitos secundários e de enzimas de interesse biotecnológico (GILLOT et al., 2015).

Atualmente, fazem parte do gênero *Penicillium* cerca de 225 espécies, cientificamente esse gênero de fungo é classificado como pertencente ao filo Ascomycota, classe Eurotomycetes, ordem Eurotiales e família Trichocomaceae (VISAGIE et al., 2014).

O *Penicillium roqueforti* é um fungo saprófito que pode ser isolado do solo ou da matéria orgânica em decomposição. Este fungo tem como característica o crescimento rápido, formando colônias de coloração verde escura e veludíneas, multiplica-se vegetativamente através de conídios produzidos em cadeia com conidióforos dispostas em número variável em uma ramificação terminal (conjunto lembra uma vassoura). Estes conídios, após disseminados, produzirão um novo micélio formado por hifas que é responsável pela nutrição do fungo (Figura 1.4) (KIMATI et al., 1978; MIOSO et al. 2015).

Figura 1.4 Ilustrações do fungo *P. roqueforti*. (a) imagem do fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 (b) imagem de colônias sob microscopia óptica de 4x; (c) Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de Petri; (d) imagem de conidióforo e conídios corados com solução de algodão azul de lactofenol sob microscopia óptica de 40x.



Fonte: (a) autora. (b), (c) e (d) adaptado de <http://atlas.microumftgm.ro/micologie/filamentosi/penroqueforti.php>

Essa espécie de fungo é adaptável a situações severas, apresentando crescimento em concentrações críticas de oxigênio (até 4,2% de O₂), alta concentração de dióxido de carbono e tolerância a condições ácidas e alcalinas (pH 3 – 10), além de crescer em temperaturas baixas, até 4°C, tendo seu crescimento comprometido a partir de 35 °C. Essas características somadas à capacidade do *P. roqueforti* de usar pentoses e hexoses como substratos tonam a espécie favorável à fermentação (GILOT et al. 2017; JACKSON; DOBSON, 2016)

Dentre os gêneros de *Penicillium*, o produtor do antibiótico penicilina e as espécies associadas à produção de queijo são os mais conhecidos, porém, este gênero adequa-se a diversas aplicações industriais por possuir um conjunto de enzimas lipolíticas, proteolíticas, decarboxilase e deaminase que atualmente são aplicadas na

remoção de escamas de peixe, produção de lipídios de alta qualidade a partir de resíduos alimentares, elaboração de bebidas lácteas e preservação de produtos de carne (MIOSO et al., 2015). Estudos apontam que o *Penicillium* também, como bom produtor de enzimas celulolíticas, como por exemplo, xilanases e β -glicosidase, que podem ser produzidas baseadas em vários tipos de substratos (FERRAZ et al., 2018; BAI et al., 2013; LI et al., 2010)

1.3.5 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica já consolidada, atualmente, por definição é considerada um bioprocessamento que consiste no cultivo de microrganismos envolvendo sólidos inertes ou substratos insolúveis, com umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo do microrganismo servindo como fonte de nutrientes e energia (CCOUTO; SANROMÁN, 2004; PANDEY, 2003).

A técnica de FES é utilizada desde a antiguidade, aproximadamente 2600a.c. nos países asiáticos para preparação do molho de soja, mas foi por muito tempo ignorada nos países ocidentais até aproximadamente 1940. Esse fato deve-se, principalmente, ao sucesso da técnica de fermentação submersa no desenvolvimento da penicilina, tornando a fermentação submersa uma tecnologia modelo para a produção de qualquer composto por fermentação (CCOUTO; SANROMÁN, 2004).

O enriquecimento proteico em ração animal iniciada em 1940 marcou o progresso da utilização da FES no ocidente, ocorrendo também alguns trabalhos isolados por volta de 1950 a 1970, com objetivo de transformação de esteróides por culturas fúngicas e produção de micotoxinas. Desde então, a FES tem ganhado destaque em pesquisas científicas nas últimas décadas, com grande número de patentes, publicações e inovações, como desenvolvimento de biorreatores e modelagem na produção de produtos microbianos, aplicadas a diversas finalidades industriais (PANDEY, 2003)

Um dos principais motivos para consolidação da FES é tanto suas vantagens na produção enzimática, quanto para obtenção de substâncias de interesse da indústria de alimentos. Dentre as vantagens, destaca-se a alta produtividade e reprodutibilidade da técnica, principalmente quando comparada a fermentação submersa. Em um estudo realizado por Viniegra-González et al. (2003) foi comparado a produtividade na fermentação submersa e em estado sólido de três enzimas fúngicas; invertase, pectinase e tanase, os resultados demonstraram uma maior produção através da FES, além da

vantagem de ser um processo estático sem a necessidade adicional de gasto de energia. Já Castilho et al. (2000) avaliaram a viabilidade econômica do processo em estado sólido e submerso para a produção de lipases de *Penicillium restrictum*, chegando a conclusão de que a fermentação submersa precisa 78% a mais de investimento de capital do que a fermentação em estado sólido.

Além disso, a FES por ser uma técnica realizada em condições simples, para o crescimento do microrganismo, dispensa a necessidade de equipamentos complexos ou sistemas de controle sofisticados, a essas características da FES pode-se somar ainda, a obtenção de concentração elevada do produto final, menor geração de águas residuais e produção de enzimas com características bioquímicas favoráveis para aplicações industriais, tais como, estabilidade a temperaturas mais altas e resistência ao pH (GARCIA et al., 2015; WANG et al., 2008; COUTO; SANROMAN, 2006; MITCHELL et al., 2000)

O microrganismo empregado no processo de FES é um dos fatores mais importantes para o sucesso da técnica, os fungos filamentosos são os microrganismos que mais adequam-se a FES, justamente pela mesma simular um ambiente próximo ao habitat natural destes microrganismos, entretanto, as leveduras e bactérias também foram relatadas para produzir com sucesso enzimas na condição de estado sólido (SOCCOL et al., 2017).

A escolha do substrato também é um fator de grande influência nos resultados, sendo os resíduos mais promissores empregados na FES, os agrícolas e florestais, que em geral são muito abundantes além de serem subutilizados, logo, o custo e disponibilidade são características consideradas para a escolha do substrato a ser utilizado na fermentação (PANDEY, 2003).

Os substratos mais utilizados são compostos basicamente por celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e outras fibras (SOCCOL et al., 2017), normalmente esses resíduos não são apenas um suporte sólido, eles se comportam como fonte de carbono, nitrogênio e nutrientes que são necessários ao desenvolvimento dos microrganismos que realizam a fermentação (LI; ZONG, 2010; KIRAN et al., 2014). No entanto, às vezes faz-se necessário o uso de suplementação no meio para fornecer nutrientes capazes de promover o crescimento ideal do microrganismo, os macro e micro nutrientes adicionados nesses casos, geralmente, é o fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto e iodo (FARINAS et al., 2015;

PANDEY, 2003). As características do substrato como cristalinidade, área acessível, área superficial, porosidade e tamanho de partícula também são aspectos importantes a serem considerados para a escolha do substrato (FARINAS, 2015; SINGHANIA et al., 2009)

Durante o processo de FES algumas variáveis são determinantes das melhores condições para o crescimento do microrganismo, entre elas a atividade de água, considerando que cada microrganismo possui um limite mínimo de atividade de água para realizar suas atividades metabólicas, este parâmetro deve ser avaliado cuidadosamente para adequar-se a melhor condição de crescimento do microrganismo (JAY, 2005). A granulometria do substrato, também é um importante parâmetro uma vez que, partículas pequenas favorecem a compactação do sólido em consequência, dificulta a circulação de gases no meio. Em contrapartida, partículas grandes favorecem maior aeração, no entanto limitam a superfície de contato do substrato para o microrganismo (DEL BIANCHI et al., 2011).

Por fim, a temperatura e pH que são variáveis de suma importância no crescimento do microrganismo, já que todo microrganismo tem sua faixa de temperatura e pH ideal. Considerando que as reações que ocorrem durante o crescimento do microrganismo são exotérmicas, a temperatura de fermentação deve promover a troca de calor sem prejudicar o crescimento do mesmo, quanto ao pH, apesar de ser um parâmetro importante, controlar a sua atuação no meio é tarefa difícil, mas tem sido possível através da adição de tampão durante a etapa de umidificação e desenvolvimento da FES em biorreatores (SCHMIDELL et al., 2001)

Diante do que foi posto acima para maximizar a produção de enzimas por FES é necessário determinar as condições ótimas de cultivo. As técnicas estatísticas de planejamento de experimentos têm sido uma alternativa promissora para determinar as condições que visam maximizar a produção através da FES (SANTOS et al., 2016; Vu et al., 2011).

1.3.6 Palma Forrageira

A região definida como semiárida no Brasil abrange uma área de 969.589,4 km, chegando a 60% da área da região nordeste, essa região tem como característica solos rasos de média a alta fertilidade, escassez e irregularidade de chuvas, as espécies

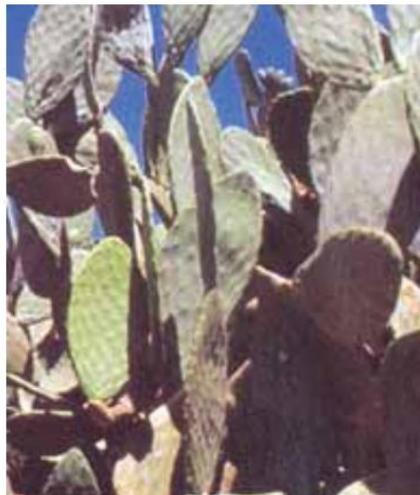
vegetais que se desenvolvem nessa região possuem características que as permite adaptar-se a condições do solo e clima, como as espécies forrageiras, que são consideradas as que melhor adaptam-se as condições climáticas do semiárido (DE OLIVEIRA et al., 2010)

Nesta conjuntura, destaca-se a planta cactácea palma forrageira que chega, aproximadamente, a uma área de cultivo de 550.000 ha na região semiárida do Brasil, tornando-se uma alternativa de cultivo vegetal para região devido a seu mecanismo fisiológico, especial no que se refere a absorção, aproveitamento e perda de água. A alta resistência ao ambiente árido da palma forrageira deve-se a presença do metabolismo ácido das crassuláceas, que permite a fixação do CO₂ no ácido málico durante a noite sendo durante o dia descarboxilado de volta ao CO₂ e usado para a produção de carboidratos através da fotossíntese, esse processo permite aos cactos sobreviverem em regiões com limitada quantidade de água no solo para produzir biomassa (DESOUZAFILHO et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2010; NOBEL, 2002).

A palma forrageira tem origem mexicana, mas tem sido cultivada no Brasil desde o final do século XIX, sendo encontrada em duas espécies principais, duas do gênero *Opuntia* (*Opuntia ficus indica* e *Opuntia sp.*) e *Nopalea cochenillifera*, entre essas espécies as *Opuntias* são consideradas mais resistentes a seca e mais produtivas, porém a espécie *Nopalea cochenillifera* apresenta maior valor nutricional (DESOUZAFILHO et al. 2016).

A espécie *Nopalea cochenillifera* pode atingir altura de 4 m, em sua estrutura arborescente apresenta coroa larga, glabra, 60-150 cm de largura do caule, raquetes obovaladas com 30 a 60 cm de comprimento, 20 a 40 cm de largura e 19 a 28 cm de espessura. Essas plantas possuem uma cor verde e são cobertas de uma camada de cera, cuja espessura atinge 10 a 50 µm (Figura 1.5) (DE OLIVEIRA et al., 2010). Em sua classificação botânica, a palma forrageira pertence à classe Liliatae; família Cactaceae; subfamília Opuntioideae, tribu Opuntiae; gênero *Opuntia*, subgênero *Opuntia* e *Nopalea*; do reino Vegetal; sub-reino Embryophita; divisão Angiospermae (CHIACCHIO et al., 2006)

Figura 1.5 Imagem da planta palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*).



Fonte: Adaptado de Chiacchio et al. (2006).

A caracterização química da *Nopalea cochenillifera* demonstra que a mesma possui alto valor de nutrientes digestivos, com elevados níveis de carboidratos solúveis, vitaminas e ferro, além de cálcio (3%), fósforo (0,15) e potássio (2,5%), em baixas concentrações estão presentes proteína bruta ($4,81 \pm 1,16\%$) fibra em detergente neutro ($26,79 \pm 5,07\%$) e fibra de detergente ácido ($18,85 \pm 3,17\%$) (SANTOS et al., 2016). Além de suas características nutritivas favoráveis a palma forrageira possui ampla disponibilidade por não depender do período entressafra e de tecnologias para cultivo e colheita, isso tem atraído o interesse de muitos pesquisadores em explorar possíveis aplicações desta planta (DESOUZAFILHO et al. 2016)

Nesse sentido, as aplicações da palma forrageira, apesar de maior participação na nutrição animal, pode ser estendida a outras finalidades, como alimentação humana, indústria de cosméticos, proteção e conservação do solo, fabricação de adesivos, colas, fibras para artesanato, papel, corantes, mucilagem, antitranspirante. Com destaque nos últimos anos para produção de enzimas utilizando a palma como substrato e na produção de biocombustível, principalmente a produção de etanol lignocelulósico, utilizando para tal, complexo enzimático de celulasas (SANTOS et al., 2015; CHIACCHIO et al., 2006)

A grande diversidade de aplicações da palma forrageira revela a versatilidade dessa espécie vegetal, porém seu potencial é pouco explorado na região de predominância desta planta, conseqüentemente há uma perda das oportunidades para

melhorar índices sociais e econômicos que poderiam ser agregados ao explorar a palma forrageira, por exemplo, em biorrefinaria, integrando a extração de produtos químicos de valor agregado e a produção de combustível (DESOUZAFILHO et al. 2016; CHIACCHIO et al., 2006).

Neste trabalho, o potencial da palma forrageira da variedade miúda (*Nopalea cochenillifera*) foi explorado utilizando seu farelo seco e com base em sua composição lignocelulósica, o mesmo foi aplicado como substrato para obtenção de enzimas fúngica por meio da fermentação em estado sólido.

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de β -glicosidase microbiana tem sido investigada cientificamente, principalmente devido à possibilidade de utilização em diversos processos industriais, com destaque na conversão de celulose a açúcar fermentescíveis utilizando materiais lignocelulósicos. A necessidade de enzimas que apresentem maior estabilidade e produtividade associadas a baixo custo de produção é um dos principais fatores que impulsionam novas pesquisas nessa área.

Nesse sentido, recentemente tem sido exploradas novas fontes de microrganismos produtores de β -glicosidase, como os fungos do gênero *Penicillium* que, recentemente, estão sendo indicados como fontes de enzimas celulolíticas. Entretanto, espécies como, o *P. roqueforti* tem sido pouco investigado para produção destas enzimas por fermentação em estado sólido, apesar deste fungo apresentar algumas características favoráveis a fermentação, como crescimento em diferentes condições de pH e capacidade de utilizar diferentes substratos como a pentose e hexoses.

A utilização do *P. roqueforti* para produção de β -glicosidase por meio da fermentação em estado sólido consiste em uma alternativa promissora para obtenção desta enzima, visto as vantagens associadas à técnica de FES, bem como a utilização da palma forrageira, uma planta rica em nutrientes e celulose, como substrato.

1.5 REFERÊNCIAS

- AHMED, A., ASLAM, M., ASHRAF, M., NASIM, F., BATOOL, K., BIBI, A. Microbial β -Glucosidases: Screening, Characterization, Cloning and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, v. 5, p. 57-73, 2017.
- ANDRADE, L. G., MAITAN-ALFENAS, G. P., MORGAN, T., GOMES, K. S., FALKOSKI, D. L., ALFENAS, R. F., GUIMARÃES, V. M. Sugarcane bagasse saccharification by purified β -glucosidases from *Chrysosporthe cubensis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 12, p. 199-205, 2017
- ASHA, P., DIVYA, J., SINGH, I. B. Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. *Bioresource technology*, v. 213, p. 245-248, 2016.
- Atlas Online de Microbiologie. Disponível em: <<http://atlas.microumftgm.ro/micologie/filamentosi/penroqueforti.php>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2018.
- BAI, H., WANG, H., SUN, J., IRFAN, M., HAN, M., HUANG, Y., 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, 2013.
- BARBAGALLO, R. N., SPAGNA, G., PALMERI, R., RESTUCCIA, C., GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 1, p. 58-66, 2004.
- BÉGUIN, PIERRE; AUBERT, JEAN-PAUL. The biological degradation of cellulose. *FEMS microbiology reviews*, v. 13, p. 25-58, 1994.
- BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potencial industrial applications. *Biotechnology advances*, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BHATIA, YUKTI; MISHRA, SAROJ; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Critical reviews in biotechnology*, v. 22, p. 375-407, 2002.
- CAIRNS, J.R.K.; ESEN, A. β -Glucosidases. *Cell.Mol. Life Sci.*, v. 67, p. 3389–3405, 2010.
- CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, v. 37, p. D233–D238, 2009.
- CAO, P., WANG, L., WANG, Y., ZHOU, N., & CHEN, Y. Alkali-tolerant β -glucosidase produced by newly isolated *Aspergillus fumigatus* WL002 from rotten wood. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 105, p. 276-282, 2015.

Castilho, L. R., Polato, C. M., Baruque, E. A., Sant'Anna Jr, G. L., & Freire, D. M. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 239-247, 2000.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v. 123, 413-433, 2006.

CHIACCHIO, F. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. *Bahia Agrícola*, v.7, p.39-49, 2006.

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

DE OLIVEIRA, F. T., SOUTO, J. S., DA SILVA, R. P., DE ANDRADE FILHO, F. C., JÚNIOR, E. B. P. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 5, p. 27-37, 2010.

DE SOUZA FILHO, P. F., RIBEIRO, V. T., DOS SANTOS, E. S., DE MACEDO, G. R. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass-evaluation of using different pretreatments. *Industrial Crops and Products*, v. 89, p. 425-433, 2016.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido. Ed. *Edgard Blücher*, v. 2. 2001.

DONKOR, OSAANA N.; SHAH, NAGENDRA P. Production of β -Glucosidase and Hydrolysis of Isoflavone Phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in Soymilk. *Journal of Food Science*, v. 73, p. M15-M20, 2008.

Ferraz, J. L. D. A. A., Souza, L. O., Soares, G. A., Coutinho, J. P., de Oliveira, J. R., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. *Bioresource technology*, v. 248, p. 214-220, 2018.

FUSCO, F. A., FIORENTINO, G., PEDONE, E., CONTURSI, P., BARTOLUCCI, S., AND LIMAURO, D. Biochemical characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*. *International journal of biological macromolecules*, v. 113, p. 783-791, 2018.

GERARDI, C., BLANDO, F., SANTINO, A., ZACHEO, G. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science, Clare*, v. 160, p. 795-805, 2001.

GILLOT, G., JANY, J. L., COTON, M., LE FLOCH, G., DEBAETS, S., ROPARS, J., COTON, E. Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. *PLoS One*, v.10, p. 1-21, 2015.

HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1327-1341, 2015.

HENRISSAT, B.; CALLEBAUT, I.; FABREGA, S.; LEHN, P.; MORNON, J.P.; Davies, G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p. 7090–7094, 1995.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. Rio Grande do Sul: v.6, *Artmed*, 2005.

Jeya, M., Joo, A. R., Lee, K. M., Tiwari, M. K., Lee, K. M., Kim, S. H., Lee, J. K. Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 86, p. 1473-1484, 2010.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. *Waste Biomass Valorization*, v. 5, p. 903-917, 2014.

KNOLL, K.C. Estonagem ecológica para denim. *Textília*, v. 80, p. 30-24, 2011.

KOSHLAND JR, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological reviews*, v. 28, p. 416-436, 1953.

KUO, H. P., WANG, R., HUANG, C. Y., LAI, J. T., LO, Y. C., AND HUANG, S. T. Characterization of an extracellular β -glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production. *Journal of food and drug analysis*, v. 26, p. 163-171, 2018.

Lewis, G. E., Hunt, C. W., Sanchez, W. K., Treacher, R., Pritchard, G. T., Feng, P. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 3020-3028, 1996.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, p. 43–54, 2010.

Li, Y., Hu, X., Sang, J., Zhang, Y., Zhang, H., Lu, F., and Liu, F. An acid-stable β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus*: Gene expression, biochemical characterization and molecular dynamics simulation. *International journal of biological macromolecules*, v. 119, p. 462-469, 2018.

LIS, HALINA; SHARON, NATHAN. Protein glycosylation: structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry*, v. 218, p. 1-27, 1993.

LOPES, CAMILA SANTOS DOUBEK. Análise ambiental da fase de acabamento do jeans. *InterfacEHS-Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 6, 2012.

MICHLMAYR, H., SCHÜMANN, C., WURBS, P., DA SILVA, N. M. B. B., ROGL, V., KULBE, K. D., ANDRÉS, M. A β -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 1281-1289, 2010.

MIOSO, R.; MARANTE, T. F. J.; LAGUNA, I. H. B. *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, p. 781-791, 2014.

NG, I. S., LI, C. W., CHAN, S. P., CHIR, J. L., CHEN, P. T., TONG, C. G., AND HO, T. H. D. High-level 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.

NOBEL, P. S., DE LA BARRERA, E., BEILMAN, D. W., DOHERTY, J. H., ZUTTA, B. R. Temperature limitations for cultivation of edible cacti in California. *Madroño*, p. 228-236, 2002.

NZWALO, HIPÓLITO; CLIFF, JULIE. Konzo: from poverty, cassava, and cyanogen intake to toxico-nutritional neurological disease. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, p. e1051, 2011.

OHARA A., SANTOS, J. G., ANGELOTTI, J. A. F., BARBOSA, P. P. M., DIAS, F. F. G., BAGAGLI, M. P., SATO, H. H., CASTRO, R. J. S. A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation, *Food Science and Technology*, v. 38, p. 131-137, 2018.

OLAJUYIGBE, FOLASADE M.; NLEKEREM, CHIDINMA M.; OGUNYEWO, OLUSOLA A. Production and characterization of highly thermostable β -glucosidase during the biodegradation of methyl cellulose by *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry research international*, v. 2016, p1-8 2016.

PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 15, p. 107-115, 2003.

PARK, H. J.; ASHLEY J. D.; PATRICK A. J. The development and evaluation of β -glucosidase immobilized magnetic nanoparticles as recoverable biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, v. 133, p. 66-73, 2018.

PEREIRA, de CASSIA J., LEITE, R. S. R., DO PRADO, H. F. A., MARTINS, D. A. B., GOMES, E., DA SILVA, R. Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 175, p. 723-732, 2015.

POGORZELSKI, EUGENIUSZ; WILKOWSKA, AGNIESZKA. Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour and fragrance journal*, v. 22, p. 251-254, 2007.

R. C. F.; FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. *Revista Caatinga, Mossoró*, v. 29, p. 222-233, 2016.

RIOU, C. et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3607-3614, 1998.

SALGADO, J. C. S., MELEIRO, L. P., CARLI, S., WARD, R. J. Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases—A review. *Bioresource technology*, 2018.

Santa-Rosa, P. S., Souza, A. L., Roque, R. A., Andrade, E. V., Astolfi-Filho, S., Mota, A. J., and Nunes-Silva, C. G. Production of thermostable β -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 31, p. 84-92, 2018.

SANTOS, T. C. D., ABREU FILHO, GEORGE, B., PIRES, A. J. V., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. By solid state fermentation of prickly pear. *Revista Caatinga*, v. 29, p. 222-233, 2016.

SANTOS, T. C. D.; ABREU FILHO, G.; BRITO, A. R. D.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. AND BORZANI, W., *Biotechnology Industrial: Engenharia Bioquímica*. Blucher, São Paulo, 2001.

SANTOS, T. C., DINIZ, G. A., BRITO, A. R. D., PIRES, A. J. V., FRANCO, M. Effect of solid state fermentation on nutritional content and evaluation of degradability in cactus pear. *Revista Caatinga*, v. 28, p. 248-254, 2015.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.A.; MARTINEZ-RIPOLL, M.; LEQUERICA, J.L.; POLAINA, J. Crystal structure of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J. Mol. Biol.*, v. 275, p. 491–502, 1998

Sarry, J. E.; Günata, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, v. 87, p. 509-521, 2004.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.

SONG, X., XUE, Y., WANG, Q., WU, X. Comparison of three thermostable β -glucosidases for application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 59, p. 1954-1961, 2011.

SPAGNA, G., BARBAGALLO, R. N., PIFFERI, P. G., BLANCO, R. M., GUIGAN, J. M. Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 63-69, 2000.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 92, p. 305 -311, 2001.

UCHIYAMA, TAKU; MIYAZAKI, KENTARO; YAOI, KATSURO. Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, p. 18325-18334, 2013.

VARGHESE, JOSEPH N.; HRMOVA, MARIA; FINCHER, GEOFFREY B. Three-dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure*, v. 7, p. 179-190, 1999.

VILLENNA, María Arévalo et al. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 229-234, 2006.

VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., HONG, S. B., KLAASSEN, C. H. W., PERRONE, G., SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, v. 78, p. 343-371, 2014.

VU, V. H.; PHAM, T. A.; KIM, K. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation, *Mycobiology*, v. 39, p. 20-25, 2011.

WALLECHA, ANU; MISHRA, SAROJ. Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1649, p. 74-84, 2003.

WANG, Q.; HOU, Y.; XU, Z.; MIAO, J.; LI, G. Optimization of coldactive protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1926-1931, 2008.

WITHERS, S.G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, v. 44, p. 325–337, 2001.

WOJTUSIK, M., YEPES, C. M., VILLAR, J. C., CORDES, A., ARROYO, M., Garcia-Ochoa, F., Ladero, M. Kinetic modeling of cellobiose by a β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 136, p. 502-512, 2018.

WOODWARD, J.; WISEMAN, A. Fungal and other β -D-glucosidases – their properties and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 4, p. 73-79, 1982.

ZAHAO, Y., SUN-WATERHOUSEA, D., ZHAOA, M., ZHAOA, Q., QIUC, C., SU, G. Effects of solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis on defatted soybean meal, *Food Science and Technology*, v. 97, p. 496–502, 2018.

CAPÍTULO 2

Produção e caracterização bioquímica de β -glicosidase halotolerante de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 sob fermentação em estado sólido

Cíntia Albernaz das Neves¹, Glêydison Amarante Soares², Luiz Henrique Sales de Menezes¹, Nadabe dos Santos Reis³, Elizama Aguiar-Oliveira¹, Marcelo Franco¹, Julieta Rangel de Oliveira^{1*}

¹*Departamento de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Brasil*

²*Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil*

³*Centro de Formação em Técnico-Ciências, Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB), Itabuna, Brasil*

*Autor correspondente: telefone: +55 073 3680535;

email:julietaquimica@yahoo.com

^aManuscrito a ser submetido ao periódico Bioresource Technology

RESUMO

Neste estudo, investigou-se a produção de β -glicosidase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por fermentação em estado sólido utilizando como substrato a palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*). Os parâmetros temperatura de incubação e umidade inicial foram otimizados utilizando-se o delineamento composto central rotacional, obtendo-se um rendimento máximo de $935,07 \pm 21,70$ UI g⁻¹ a 23 °C e 56% de umidade. As β -glicosidasas produzidas apresentaram maior reatividade e estabilidade em pH 5,0 a 52 °C. Além de halotolerância, apresentando 139,93% e 95,34% de atividade residual na reação e 57,93% e 94,28% após 24 h de incubação. A adição de Na⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, EDTA, Triton X-100, lactose e diclorometano potencializou a atividade de β -glicosidase, enquanto, Ca²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ não foram expressivos, e SDS, etanol, acetona e metanol foram inibidores. Portanto, foi possível produzir β -glicosidase com perfil halotolerante, indicando uma alternativa promissora para a obtenção desta enzima para aplicações biotecnológicas e industriais.

Palavras-chave: Delineamento composto central rotacional, celulases, *Penicillium roqueforti*, caracterização bioquímica, palma forrageira.

ABSTRACT

In this study, the production of β -glucosidase from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 by solid state fermentation using forage palm (*Nopalea cochenillifera*) as substrate was investigated. The parameters incubation temperature and initial moisture were optimized using the central rotational compound design, obtaining maximum yield of 935.07 ± 21.70 IU g⁻¹ at 23 °C and 56% humidity. The β -glucosidase produced showed higher reactivity and stability at pH 5.0 at 52 °C. In addition to good halotolerance, maintaining 139.93% and 95.34% of the residual activity in the reaction and 57.93% and 94.28% after 24 h of incubation. The addition of Na⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, EDTA, Triton X-100, lactose and dichloromethane improved β -glucosidase activity, while Ca²⁺, Zn²⁺ and Co²⁺ were not expressed, and SDS, ethanol, acetone and methanol were inhibitors. Therefore, it was possible to produce β -glucosidase with a halotolerant profile, indicating a promising alternative to obtain this enzyme for biotechnological and industrial applications.

Keywords: Central rotational compound design, cellulases, *Penicillium roqueforti*, biochemical characterization, prickly pear

2.1 INTRODUÇÃO

As β -glicosidases formam um grupo de enzimas que atuam na hidrólise de ligações glicosídicas de alquil-, amino- ou aril- β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, dissacarídeos e oligossacarídeos, além de possuírem atividade de transglicosilação (Watanabe et al., 2017; Salgado et al.; 2018).

Devido a sua aplicação em substratos glicosilados, as β -glicosidases podem ser utilizadas em vários setores industriais, como na indústria farmacológica, atuando na desglicosilação de terpenos, que em sua forma glicosilada tem sua absorção e biodisponibilidade reduzida (Gonzalez-Pombo et al., 2010; Kuo et al., 2018). Já na indústria de bebidas, as β -glicosidases são responsáveis por hidrolisar compostos terpênicos não voláteis a terpenos voláteis, melhorando o sabor e aroma do vinho, e também são utilizadas na remoção de amargor de sucos cítricos através da hidrólise da naringina, além de participar do processo de extração e clarificação de sucos (Pereira et al., 2015).

As β -glicosidases através da transglicosilação ou hidrólise reversa podem sintetizar aril e alquil-glicosídeos, estes compostos são surfactantes não iônicos biodegradáveis usados como transportadores de fármacos e como agentes solubilizantes para membranas biológicas (Bhatia et al., 2002; Wallecha e Mishra, 2003; Ahmed et al., 2017). Esta enzima, também, participa do processo de transglicosilação durante a síntese de oligossacarídeos, compostos empregados como agentes terapêuticos, promotores do crescimento de bactérias probióticas, vacinas e ferramentas de diagnóstico (Ahmed et al., 2017)

Na hidrólise da biomassa celulósica para produção de biocombustível as β -glicosidases atuam juntamente com outras enzimas do complexo celulolítico, sendo

responsável pela hidrólise da celobiose, devido a celobiose provocar a inibição das outras enzimas do complexo celulolítico, a suplementação de β -glicosidases tem sido cada vez mais empregada na hidrólise da biomassa em escala industrial (Santa-Rosa et al., 2018; Sørensen et al., 2013). Porém, no pré-tratamento da biomassa são geradas elevadas quantidades de sal, que pode reduzir a atividade catalítica, este fator tem estimulado a busca por enzimas celulolíticas que apresentem perfil halotolerante (Meleiro et al., 2018).

Para atuar em todas estas e outras demandas industriais, as β -glicosidases de origem microbiana são as mais utilizadas, com destaque as oriundas de fungos filamentosos que tem apresentado boa estabilidade e rendimento (Santa-Rosa et al., 2018). No processo de produção enzimática por meio da FES uma importante etapa é a escolha do microrganismo. Algumas espécies do gênero *Penicillium* têm sido indicadas como fontes de enzimas celulolíticas (Marques et al., 2017; Souza et al., 2018; Ferraz et al., 2018). Entretanto, o *Penicillium roqueforti* tem sido pouco explorado para produção de β -glicosidases por FES, mesmo esta espécie fúngica apresentando características favoráveis à fermentação, que incluem o desenvolvimento em diferentes condições de pH e atividade de água (a_w), além ser considerado um microrganismo GRAS (Generally Regarded as Safe) (Mioso et al., 2015).

Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentoso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 para produção da enzima β -glicosidase por meio da FES utilizando como substrato a palma forrageira, uma espécie vegetal rica em carboidratos e vitaminas (Santos et al., 2016a, 2016b; dos Santos et al., 2017). As variáveis que influenciam o processo fermentativo, umidade e temperatura, foram analisadas por planejamento experimental composto central rotacional e a enzima obtida foi caracterizada bioquimicamente.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Microrganismo e inóculo

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 doado pela INCQS/Fiocruz (Rio de Janeiro, Brasil) com número de registro 40074 e foi mantido em sílica sob refrigeração a 4 °C. O fungo foi cultivado em Ágar-Batata-Dextrose (VETEC®) em frascos Erlenmeyer de 250 mL por 7 dias em incubadora BOD (SOLAB/Piracicaba, Brasil) a 27 °C. Após o período de incubação, a obtenção da solução de esporos foi realizada por meio da suspensão da cultura esporulada em solução Tween 80 (VETEC®) (0,01%, v v⁻¹) e a contagem do número de esporos foi realizada sob um microscópio binocular usando a câmara de Neubauer.

2.2.2 Substrato

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) foi doada pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) (Itapetinga, Bahia, Brasil). Após a lavagem e corte, a palma forrageira foi seca em estufa a 65 °C por 24 h e moída em moinho Wiley até uma granulometria aproximada a 2 mm (Santos et al., 2015).

2.2.3 Fermentação em estado sólido

2.2.3.1 Perfil fermentativo de β -glicosidase

A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada utilizando frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 5,0 g do substrato com adição de água destilada até obter-se umidade inicial desejada e posterior esterilização em autoclave. Após o resfriamento, o inóculo foi realizado com 10^7 de esporos por grama de substrato seco. As culturas foram conduzidas em uma incubadora BOD (SOLAB/Piracicaba, Brasil) com temperatura controlada. Para o perfil fermentativo foi realizada fermentações por

168 h a 20 °C e 55% de umidade (m m^{-1} , base úmida) e a cada 24 horas uma amostra foi retirada e determinada à atividade de β -glicosidase. Cada tempo de fermentação foi realizado em triplicata.

2.2.3.2 Obtenção do extrato enzimático bruto

Após o processo de fermentação, os meios fermentados foram extraídos adicionando-se tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 5,0), em seguida foi agitada e misturada em incubadora orbital (Quimis, Q315IA) a 4 g, 25 °C por 10 min, O extrato resultante foi coletado e centrifugado (CT-6000R; Cientec, Piracicaba, Brasil) a 70 g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para dosar a atividade de β -glicosidase.

2.2.3.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada no extrato enzimático bruto utilizando o p -NP β Glc (4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo) como substrato e a curva de calibração padrão foi preparada com p -nitrofenol (p -NP), como previamente descrito por Matsuura et al. (1995) com algumas modificações. O meio reacional contendo 0,25 mL de extrato enzimático bruto, 1,0 mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 5,0) foi previamente incubado em banho a 42 °C por 5 min, em seguida foi adicionado 0,25 mL do substrato com concentração 0,1 mM preparado em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 5,0). A reação foi incubada por 10 min e posteriormente, foi interrompida com a adição de 1,0 mL de uma solução a 1,0 M de carbonato de sódio. A concentração de glicose produzida foi determinada indiretamente pela medida de concentração de p -nitrofenol no meio reacional por leitura em espectrofotômetro (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics) a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de p -nitrofenol por minuto de reação.

2.2.3.4 Planejamento experimental e análise estatística

A otimização da produção de β -glicosidase por FES foi realizada utilizando o delineamento composto central rotacional (2^2 DCCR) constituído por 4 experimentos diferentes, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos (Tabela 2.1). Foram analisadas, em diferentes níveis, as variáveis independentes, temperatura (T, °C) e umidade (m m⁻¹, base úmida). A variável dependente (resposta) avaliada foi a atividade de β -glicosidase (UI g⁻¹) determinada no extrato enzimático bruto obtido. O tempo de fermentação foi fixado em 96 h e os dados obtidos foram analisados com o auxílio de STATISTICA® v. 10.0 (Statsoft, EUA).

2.2.4 Caracterização bioquímica

2.2.4.1 pH e temperatura ótima

Para determinação do pH ótimo reacional foram utilizados diferentes tampões variando o pH de 3 a 9 (citrato de sódio 0,1 M, pH 3,0 a 6,0 e Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0 a 9,0), para cada tampão utilizado foi necessário diluir o extrato enzimático bruto 30 vezes. A atividade de β -glicosidase foi determinada em temperatura a 52 °C e o resultado expresso como atividade relativa, sendo o maior resultado considerado como 100%.

O efeito da temperatura sobre a atividade foi determinado na reação enzimática, variando a temperatura de reação entre 42, 47, 52, 57 e 62 °C. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo o maior resultado obtido considerado como 100%.

2.2.4.2 Estabilidade térmica e ao pH

A estabilidade ao pH foi determinada por incubação do extrato enzimático bruto em banho Maria a 52 °C utilizando tampão no pH 3 a 8 na diluição do extrato a ser incubado. Durante o tempo de incubação (3 h) foram retiradas alíquotas em intervalos de 30 min. A atividade enzimática foi determinada em temperatura a 52 °C e as respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

Os ensaios de termoestabilidade foram realizados submetendo o extrato enzimático bruto a incubação em diferentes temperaturas, variando de 42 °C a 72 °C, retirando-se alíquotas em intervalos de 30 min. Na sequência, a atividade enzimática foi determinada como descrito anteriormente e as respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

2.2.4.3 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos.

Foram avaliados os efeitos dos sais metálicos FeSO₄, CoSO₄, ZnSO₄, CaCl₂, MgSO₄, NaSO₄, os reagentes EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), SDS (dodecil sulfato de sódio), Triton X-100 (*t*-octilfenoxipolietoxietanol) e lactose sobre a atividade enzimática. Os ensaios foram realizados mediante incubação do extrato enzimático bruto em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 5,0) com os aditivos por 30 min a 52 °C, seguido da determinação da atividade enzimática de β -glicosidase. A concentração dos aditivos utilizados foi 10 mM de meio de reação. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade de β -glicosidase obtida utilizando-se o extrato enzimático bruto sem os aditivos.

2.2.4.4 Efeitos da adição de solventes

O efeito dos solventes orgânicos na atividade enzimática foi determinado adicionando cada solvente selecionado (etanol, acetona, metanol e diclorometano) a 1 mL de tampão citrato de sódio (pH 5,0) na concentração 10, 20, 30 e 40% e, posteriormente, adicionado ao meio reacional. A atividade enzimática foi dosada, sendo considerada como 100% a atividade de β -glicosidase obtida utilizando-se o extrato enzimático bruto sem a adição dos solventes.

2.2.4.5 Efeito de NaCl na atividade e estabilidade de β -glicosidase

A tolerância ao sal de β -glicosidase foi investigada estimando-se a atividade de hidrólise na presença de diferentes concentrações de NaCl (0-2,0 M) adicionado a 1 mL tampão de citrato de sódio (0,1 M pH 5,0) que, posteriormente, foi adicionado ao meio reacional sob as condições otimizadas na seção 2.2.4.1. Para medir a haloestabilidade de β -glicosidase, o extrato enzimático bruto foi incubado com solução de NaCl (0-2,0 M) em tampão citrato de sódio (0,1 M pH 5,0) a 25 °C por 24 h. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade de β -glicosidase obtida utilizando-se o extrato enzimático bruto sem adição de NaCl.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Perfil fermentativo de β -glicosidase

O tempo de fermentação na FES está relacionando a disponibilidade de macro e micronutrientes no meio fermentativo. Sendo assim, a produção enzimática acelera em função do tempo, até alcançar seu valor máximo, e posteriormente, devido à redução de nutrientes, ocorre o decaimento do crescimento microbiano e, conseqüentemente da produção enzimática (Santos et al., 2015). Como observada na Fig. 2.1, em que o

melhor tempo de produção de β -glicosidase em palma forrageira foi em torno de 96 h, ocorrendo o decaimento após esse período.

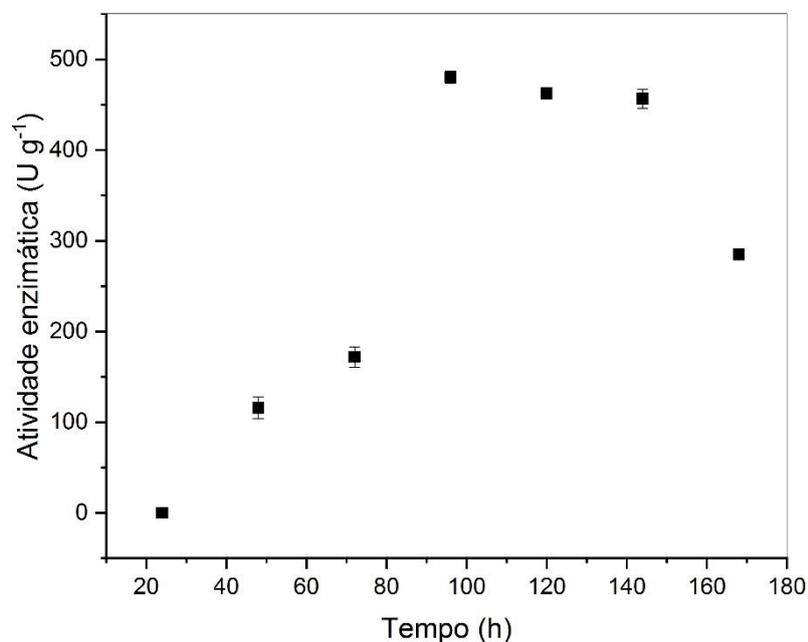


Fig. 2.1 Produção de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5 g de palma forrageira com 55% de umidade a 20 °C, em função do tempo. As análises foram realizadas em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Aliyah et al. (2017) que investigaram o efeito do tempo de fermentação em diferentes substratos (espigas de milho, casca de arroz e bagaço de cana), observando em todos, maior atividade enzimática β -glicosidase em 144 h, já em Salim et al. (2017) o melhor tempo foi em 72 h utilizando mistura dos substratos farelo de soja, farelo de girassol, farelo de trigo, pericarpo de milho e farelo de milho, e Ohara et al. (2018) ao usarem mistura dos substratos farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão e laranja, o melhor tempo de produção de β -glicosidase foi em 96 h.

2.3.2 Otimização da produção de β -glicosidase

Os resultados (Tabela 2.1) foram submetidos à análise de regressão para ajustar modelos polinomiais de segunda ordem. A significância estatística dos termos quadráticos (Q), lineares (L) e de interação (L x L) foi disposta em forma de gráfico de Pareto (Fig. 2.2a), estabelecendo-se um nível de confiança a 95% representada pela linha vertical traçada, tornando possível estabelecer uma seleção de termos estatisticamente significativos, sugerindo que as duas variáveis investigadas, temperatura e umidade inicial, foram críticas para produção de β -glicosidase. Considerando a presença de termos não significativos para o modelo (Fig. 2.2a), os coeficientes de regressão destes foram removidos e um novo modelo reduzido foi construído por análise de regressão e submetido à ANOVA ($p < 0,05$) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (2^2 DCCR,) com seus níveis reais e codificados (em parênteses) para as variáveis independentes temperatura de incubação (T, ° C) e umidade (U, %), e considerando a variável dependente (resposta) como a atividade de BGLs (IU g⁻¹) de *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10⁷ de esporos por grama de substrato.

| Ensaio | Fatores | | Respostas |
|--------|--------------|-------------|----------------------------|
| | U (%) | T (°C) | BGLs (IU g ⁻¹) |
| 1 | -1(40) | -1(18) | 22,69 |
| 2 | +1(70) | -1(18) | 306,51 |
| 3 | -1(40) | +1(28) | 65,57 |
| 4 | +1(70) | +1(28) | 146,08 |
| 5 | 0(55) | 0(23) | 909,46 |
| 6 | 0(55) | 0(23) | 935,07 |
| 7 | 0(55) | 0(23) | 847,12 |
| 8 | -1,41(33,85) | 0(23) | 4,46 |
| 9 | +1,41(76,15) | 0(23) | 146,85 |
| 10 | 0(55) | -1,4(15,95) | 375,00 |
| 11 | 0(55) | +1,4(30,05) | 513,45 |

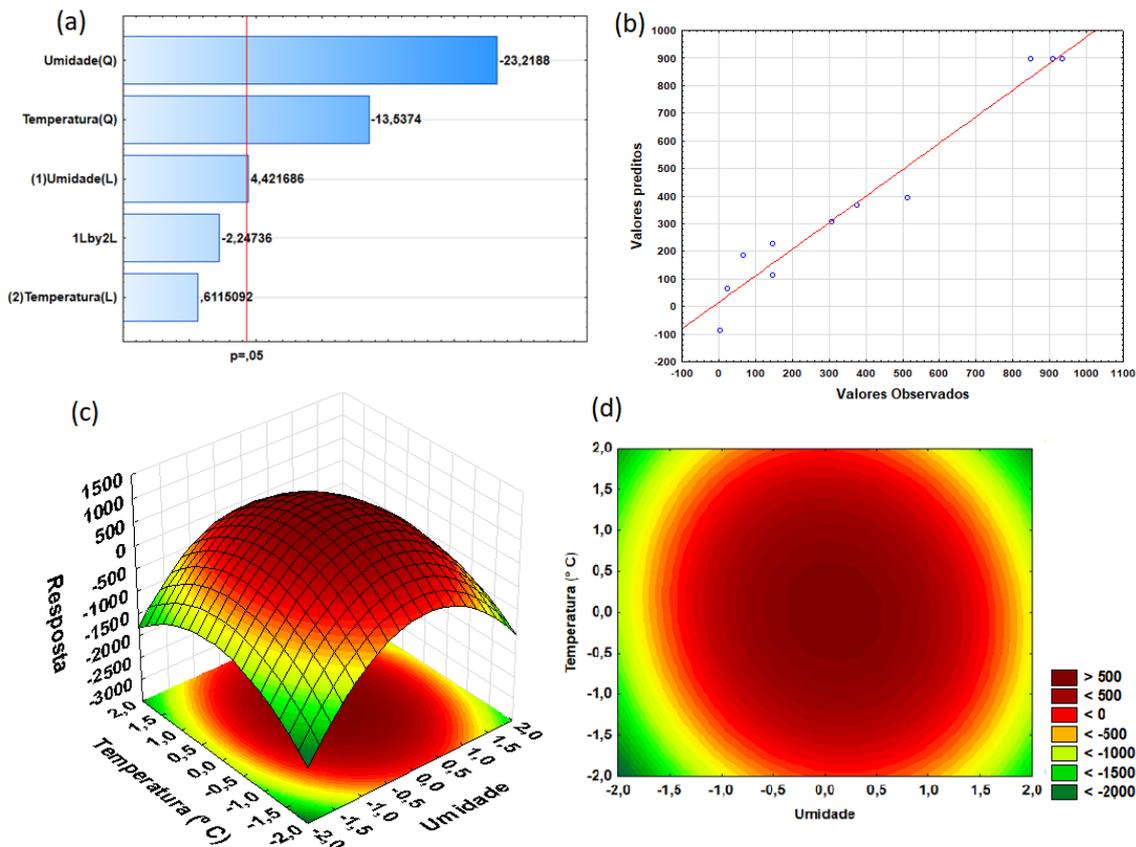


Fig. 2.2 (a) Gráfico de Pareto mostrando a significância dos termos das variáveis temperatura de incubação e umidade inicial no modelo ajustado, (b) gráfico de valores observados em função dos valores preditos, (c) gráfico de superfície de resposta e (d) gráfico contorno construídos com base no modelo representando as interações entre as variáveis temperatura de incubação e umidade inicial, tendo-se como resposta a atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato.

Procedendo com a análise de variância (ANOVA) (Tabela 2.2), o modelo construído foi estatisticamente significativo ($p < 0,0001$), como pode ser evidenciado pelo coeficiente de determinação R^2 (0,9526) indicando que 95,5% da variabilidade da resposta pode ser explicada pelo modelo matemático, o que é enfatizado pelo valor de R^2 -adj (0,9323) muito próximo ao de R^2 , além de não haver falta de ajuste significativa ($p = 0,1572$), como pode ser confirmado ao analisar o gráfico com os valores reais e previstos na Fig. 2.2b, em que o modelo apresentou os valores de resposta esperada muito próximos dos valores das respostas experimentais.

Tabela 2.2 Análise de variância (ANOVA) para o modelo reduzido ajustado na otimização da produção de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato.

| Fontes de variação | SQ | GL | QM | F | P |
|--------------------|----------------------|----|-----------------------|-------|----------|
| Regressão | 1,244E ⁺⁶ | 3 | 4,146 E ⁺⁵ | 46,89 | < 0,0001 |
| Resíduo | 61897,49 | 7 | 8842,50 | | |
| Erro puro | 4092,10 | 2 | 2046,05 | | |
| Falta de ajuste | 57805,39 | 5 | 15568 | 5,65 | 0,1572 |
| Total | 1,306E ⁺⁶ | 10 | | | |

R² = 0,9526; R²-adj = 0,9323 GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM, quadrado médio; F, teste de Fisher; p, probabilidade.

A partir das variáveis estudadas, foi possível obter a equação 1 que representa o modelo polinomial de segunda ordem, em que BGLs (UI g⁻¹) representa a atividade da β -glicosidase investigada, U a umidade inicial e T a temperatura de fermentação. Para composição da equação que descreve o modelo, apenas os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) foram considerados.

$$BGLs \text{ (UI g}^{-1}\text{)} = 897,22 + 70,71U - 441,96U^2 - 257,68T^2 \quad (1)$$

Com base na equação 1, o gráfico de superfície de resposta e contorno (Fig. 2.1c,d) foram gerados, ilustrando o efeito das variáveis e suas interações, sendo possível visualizar as regiões que resultaram em valores máximos de atividade enzimática. Considerando a validade do modelo, foi estimada as condições teóricas para a máxima produção de β -glicosidase, assim a temperatura ótima foi definida em 23 °C e umidade inicial a 56% (m m⁻¹, base úmida). Sob essas condições a resposta teórica prevista pelo modelo é de 900 UI g⁻¹.

Para validação do modelo, as condições previstas para o ponto crítico foram conduzidas em triplicata, obtendo-se uma resposta de $935 \pm 21,7$ UI g⁻¹ de atividade enzimática equivalendo a uma diferença de 3,74% do valor predito pelo modelo.

Dentro do domínio experimental a variável umidade foi crítica na produção de β -glicosidase durante a FES. A umidade é um dos parâmetros fundamentais para o desenvolvimento do microrganismo e consequente produção enzimática na fermentação, pois a elevada umidade reduz a porosidade do substrato e a distribuição de oxigênio facilitando a contaminação bacteriana, no entanto, o contrário resulta em pouca acessibilidade aos nutrientes, dificultando o crescimento do microrganismo (Pandey, 1992).

Zhang e Sang (2011) encontraram resultado semelhante para umidade inicial, realizando FES a 60% de umidade para o fungo *Penicillium chrysogenum*. Além da umidade, a temperatura, também, foi uma variável significativa, sendo observado o ótimo em temperatura próxima a ambiente como em Park et al. (2012) para o fungo *Penicillium italicum* com otimização da temperatura em 28 °C e Jeya et al. (2010) utilizando o *Penicillium purpurogenum* também com ótimo em 28 °C. A importância da temperatura no processo de FES está associada ao crescimento aeróbico do microrganismo, que ocorre através de reações metabólicas exotérmicas (Farinas, 2015).

Assim, encontrar o percentual de umidade e temperatura ideal para o processo de fermentação, é fundamental para maximizar a atividade enzimática, esses parâmetros puderam ser definidos através do planejamento experimental com sucesso, onde se obteve as condições ótimas próximo ao ponto central com umidade inicial 56% (m m⁻¹, base úmida) e temperatura 23 °C, resultando em um aumento da atividade enzimática em 94,70%, quando comparado ao perfil fermentativo.

2.3.3 Caracterização bioquímica

2.3.3.1 pH e temperatura ótima

O efeito do pH sobre a atividade de β -glicosidase obtida por *P. roqueforti* ATCC 10110 pode ser analisado na Fig. 2.a. A maior atividade enzimática foi observada em pH 5,0, não havendo diferença acentuada entre as faixas de pH 4,0 e 6,0, porém após pH 6,0 a atividade decresce significativamente, sugerindo a presença de uma β -glicosidase acidófila.

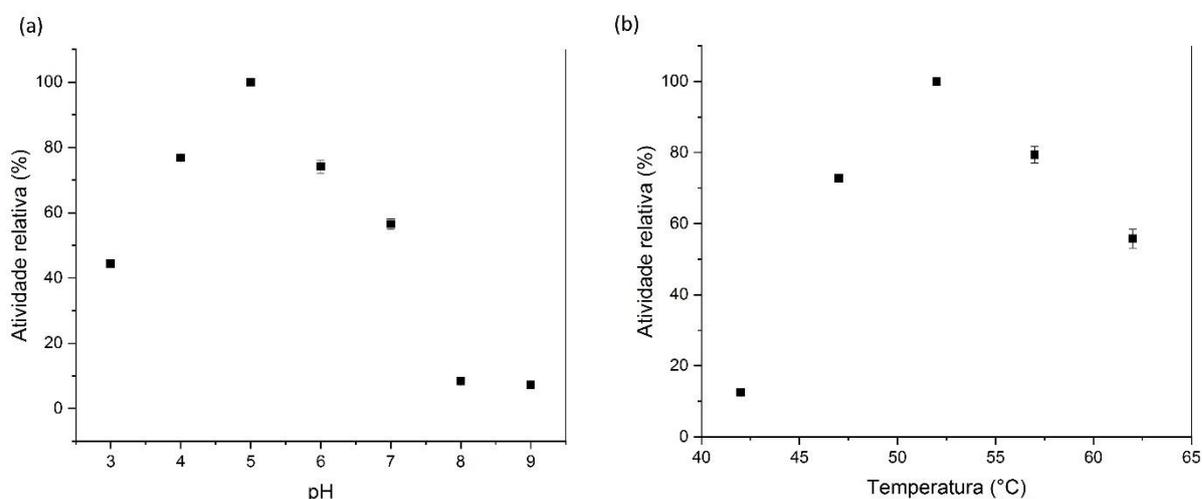


Fig. 2.3 (a) Atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato, em vários pHs (a mais alta atividade obtida em pH 5,0 foi tomada como 100%) (b) atividade de BGLs em diferentes temperaturas (a mais alta atividade obtida a 52°C foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

Características semelhantes referentes ao pH ótimo foram observadas em Kuo et al. (2018), eles relataram uma β -glicosidase com pH ótimo em 5,0 e uma queda acentuada na atividade a partir de pH 7,0, enquanto Dong et al. (2017) verificaram o pH ótimo em 6,0 e Ahmed et al. (2017) analisaram que, comumente, as β -glicosidases apresentam pH ótimo na faixa de 4-6. Fato que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

Ao analisar o efeito da temperatura (Fig. 2b), observa-se que a atividade relativa de β -glicosidase aumenta com aumento da temperatura, atingindo o ótimo em 52 °C, ocorrendo um declínio após essa temperatura. Segundo Ahmed et al. (2017), a maioria das β -glicosidases apresentam características termofílicas, o que também foi observado em trabalhos de Fusco et al. (2018), Whatanabe et al. (2018), Oh et al. (2018) e Li et al. (2018) com temperaturas ótimas em 62, 50, 60 e 70° C, respectivamente.

Os resultados obtidos referentes ao pH e temperatura ótima (Fig. 2a, b) condizem com os dados observados na literatura e apontam para a presença de uma β -glicosidase com potencial para aplicações industriais, uma vez que, enzimas que apresentam inativação a pH mais ácidos e a fácil inativação térmica podem tornar economicamente inviável a aplicação das mesmas em processos industriais (Fusco et al., 2018).

2.3.3.2 Estabilidade térmica e ao pH

Foi avaliado o comportamento de β -glicosidase quanto a sua estabilidade em diferentes pHs (Fig. 2.4a), sendo observado que em pH 5,0, a enzima consegue manter 100% da atividade enzimática até 90 min de incubação, demonstrando maior afinidade por condições ácidas, esses dados estão de acordo com os dados da literatura, que trazem β -glicosidases com maior estabilidade em uma faixa de pH que varia de 3-6 (Asha et al., 2016; Dong et al., 2017; Kuo et al., 2018). A tolerância a pH mais ácido torna a β -glicosidase atrativa para hidrólise da celulose, que geralmente ocorre em faixa pH 4-5, além da produção de bebidas e processamento de frutas e vegetais (Sohail et al., 2009; Li et al., 2018).

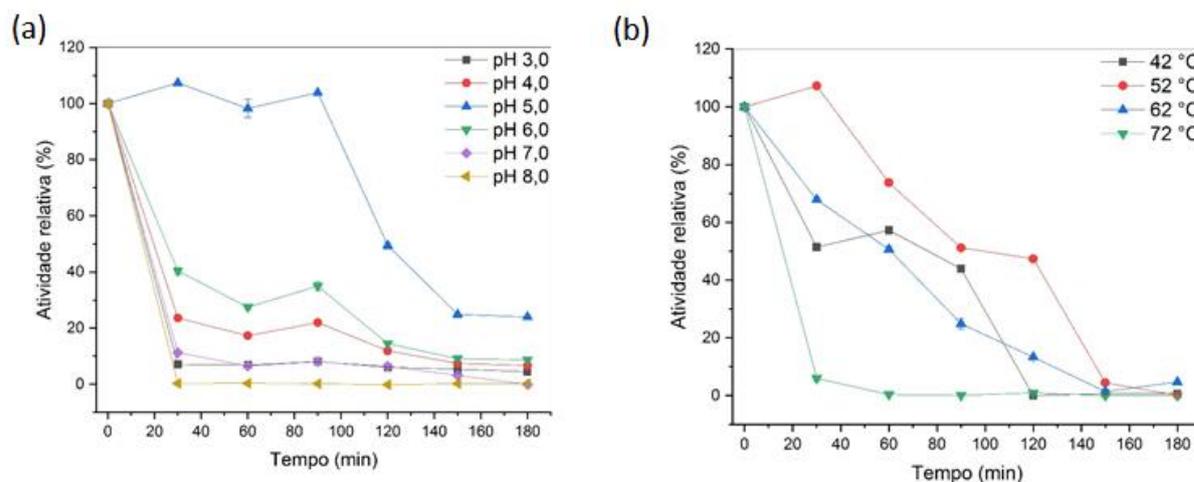


Fig. 2.4 (a) Perfil de estabilidade ao pH de BGLs e (b) Perfil de estabilidade térmica de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato. Os experimentos foram realizados em duplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados. A atividade obtida sem incubação foi tomada como 100%).

Ao avaliar a termoestabilidade da β -glicosidase de *P. roqueforti* ATCC 10110 (Fig. 2.4b) é possível notar que a enzima apresenta boa estabilidade térmica, chegando a manter aproximadamente 50% da atividade inicial a 52 °C após 120 min de incubação e 50% a 62 °C, após 60 min de incubação, porém a enzima é aparentemente desnaturada a 72 °C com atividades muito baixas mesmo após 30 min de incubação.

Enzimas que apresentam estabilidade em temperaturas acima daquela em que ocorre o crescimento máximo do microrganismo e considerável estabilidade acima de 50 °C por períodos prolongados são, geralmente, definidas como enzimas termoestáveis. Estas enzimas apresentam vantagens para aplicação industrial, visto que, em processos biotecnológicos o uso de altas temperaturas reduz o risco de contaminação microbiana, favorece a solubilidade de compostos em meio reacional beneficiando a difusão dos substratos, o que acarreta no aumento da taxa reacional, além disso, utilizar temperaturas mais elevadas pode promover um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação a cada 10 °C (Fusco et al., 2018).

2.3.3.3 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos

O efeito de diferentes íons e compostos orgânicos sobre a atividade de β -glicosidase é apresentado na Tabela 2.3. Dentre os seis íons investigados, o Fe^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ apresentam efeito positivo sobre a atividade da enzima, após 30 min de incubação a 52 °C. Porém, na presença do Zn^{2+} a atividade enzimática é reduzida, enquanto que, os íons Co^{2+} e Ca^{2+} não demonstraram efeito significativo sobre a mesma.

Os íons metálicos podem agir como cofatores enzimáticos ou estar presente em sua composição, formando complexos com outras moléculas ligadas a enzimas, ou como reguladores estruturais, podendo ativar ou inibir a atividade enzimática por meio da interação com a amina ou grupo ácido carboxílico dos aminoácidos (Mandels e Reese, 1965; Ishida et al., 1980; Pereira et al., 2017). Em estudos anteriores, foram reportadas β -glicosidases que tiveram sua atividade enzimática aumentada na presença de Fe^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ (Watanabe et al., 2016; Asha et al., 2016; Ovalle et al., 2018; Wu et al., 2018) indicando que a presença destes íons metálicos pode ter causado uma mudança conformacional levando a maior atividade da enzima.

Em contrapartida, alguns íons metálicos podem ocasionar a oxidação de grupos presentes na cadeia lateral dos aminoácidos, resultando em uma redução da atividade. Em estudos recentes (Watanabe et al., 2016; Asha et al., 2016; Kuo et al., 2018) os íons Zn^{2+} e Ca^{2+} foram apontados como inibidores da atividade de β -glicosidase. Assim como o íon Co^{2+} , que segundo Wu et al. (2018), também não apresentou efeito significativo sobre a atividade enzimática. Uma vez que o efeito de íons bivalentes nas celulases não está bem elucidado, o potencial ativador ou inibidor vai variar de acordo com as enzimas secretadas pelos diferentes microrganismos investigados (Pereira et al., 2017).

Tabela 2.3 Atividade relativa de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato, no extrato enzimático bruto de esporos por grama de substrato, frente à adição de 10mM em meio reacional de diferentes sais metálicos e compostos orgânicos incubado em pH 5,0 a 52 °C por 30 min.

| Atividade Relativa (%) | |
|-------------------------------|----------------|
| Fe ²⁺ | 118,02 ± 4,54 |
| Mg ²⁺ | 113,48 ± 6,88 |
| Ca ²⁺ | 74,69 ± 17,88 |
| Co ²⁺ | 94,09 ± 1,79 |
| Na ⁺ | 103,30 ± 0,83 |
| Zn ²⁺ | 64,51 ± 14,20 |
| SDS | 2,48 ± 0,83 |
| EDTA | 188,86 ± 12,38 |
| Triton-X | 164,10 ± 5,50 |
| Lactose | 159,28 ± 0,96 |

A atividade obtida utilizando o extrato enzimático bruto sem aditivos foi tomada como 100%

Dentre os compostos orgânicos investigados, o EDTA comportou-se como um potencial ativador aumentando a atividade enzimática (Tabela 2.3). Esse composto é um agente quelante que pode atuar ativando algumas enzimas, esse processo permite que o sítio ativo da enzima, antes impedidos por interações iônicas, fique disponível para reagir com o substrato (Miyano et al., 1985; Perreira et al., 2107). O Triton X-100 também apresenta efeito positivo na atividade enzimática (Tabela 2.3), fato que pode ser associado às propriedades dos surfactantes não-iônicos de interagir com celulasas de modo a aumentar sua estabilidade e atividade enzimática (Kristensen et al., 2007; Hsieh et al; 2014). A lactose também elevou a atividade enzimática, este dissacarídeo é formado por uma molécula de glicose e outra de galactose, logo a presença deste açúcar pode estar provocando a ativação da enzima por representar um substrato com potencial afinidade com sitio ativo. Estudos anteriores citam a lactose como uma fonte de carbono indutora na produção de celulasas (Sun et al., 2010; Dhillon et al., 2012), mas são poucos os estudos que relatam o uso deste açúcar simples como ativador da atividade enzimática de celulasas e sua atuação neste sentido ainda não está bem esclarecida (Perreira et al., 2017).

O SDS foi o único entre os compostos investigados que apresentou efeito inibitório da atividade da β -glicosidase, esse mesmo efeito foi observado em trabalhos de Oh et al. (2018), kuo et al. (2018) e Dong et al. (2017). O SDS é um detergente iônico que pode causar alterações na estrutura tridimensional da enzima por interferir em suas regiões hidrofóbicas, nesse sentido a presença desse detergente no meio pode ter levado a desnaturação enzimática o que justifica o resultado obtido de 2,48% de atividade relativa (Kuo et al., 2018)

2.3.3.4 Efeitos de solventes orgânicos

Dentre os solventes investigados (Tabela 2.4) somente o diclorometano apresentou elevação da atividade enzimática em função do aumento da concentração, entretanto, o efeito contrário foi observado em metanol, acetona e etanol. Resultado semelhante foi observado por Hwang et al. (2018), ao avaliar o efeito da acetona, metanol e etanol, verificou efeito inibitório com aumento da concentração dos solventes.

Tabela 2.4 Efeito da adição de diferentes concentrações de solventes orgânicos na atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir da FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato. Condições de reação: pH 5,0, 52 °C, 10 min.

| Concentração | Atividade Relativa (%)* | | | |
|--------------|-------------------------|--------------|---------------|--------------|
| | Metanol | Acetona | Diclorometano | Etanol |
| 10% | 63,03 ± 0,10 | 29,79 ± 1,38 | 80,74 ± 4,24 | 40,75 ± 1,13 |
| 20% | 45,20 ± 0,04 | 31,18 ± 8,10 | 124,72 ± 0,17 | 21,40 ± 0,84 |
| 30% | 15,99 ± 3,38 | 12,09 ± 9,78 | 136,38 ± 0,84 | 3,57 ± 0,08 |
| 40% | 0,38 ± 0,17 | 2,43 ± 0,59 | 172,35 ± 0,27 | 0,34 ± 0,02 |

*A atividade obtida utilizando o extrato enzimático bruto sem os solventes foi tomada como 100%.

Os solventes orgânicos utilizados em biocatálise na maioria das vezes reduz a atividade enzimática. O índice log *P*, definido como o logaritmo do coeficiente de

partição do solvente no sistema octanol/água, tem sido cada vez mais utilizado como parâmetro quantitativo da polaridade do solvente na relação estrutura/atividade da enzima (Pogorevc et al., 2002; Batra e Mishra, 2013; Hwang et al. 2018). Este parâmetro baseia-se na incapacidade de solventes hidrofóbicos para remover a água do reservatório de hidratação ao redor da enzima, o que não compromete sua atuação catalítica e pode promover sua estabilidade. No entanto, em solventes hidrofílicos a perda severa de água associada à enzima leva à sua desativação catalítica (Laane et al. 1987). Considerando que, quanto maior $\log P$ mais hidrofóbico é o solvente, o diclorometano possui baixa polaridade ($\log p$ 1,25) confirmando sua influência positiva sobre a atividade enzimática.

Batra e Mishra 2013 ao analisar a influência dos solventes como metanol, DMF (Dimetilformamida), 2-propanol e tolueno observaram comportamento semelhante ao apresentado nesse estudo, onde o tolueno apresentou maior $\log P$ aumentou significativamente a atividade catalítica. As β -glicosidase geralmente são sensíveis a presença de solventes orgânicos (Hwang et al. 2018; Batra e Misha, 2013), assim, a obtenção de β -glicosidase tolerante a diclorometano, traz diversas vantagens biocatalíticas, como a possibilidade de realizar reações, que dificilmente ocorreriam em água.

2.3.3.5 Efeito de NaCl na atividade e estabilidade de β -glicosidase

A β -glicosidase de *P. roqueforti* ATCC 10110 mostrou-se bastante tolerante ao NaCl (Tabela 2.5), mantendo 95,34% da atividade frente a adição de 2 M de sal em meio reacional, além de apresentar aumento da atividade na menor concentração avaliada, 0,5 M. Xu et al. (2014) ao investigar o efeito de NaCl em celulasas (endoglucanase e exoglucanase) obteve resultado semelhante, observando decréscimo

na atividade de celulasas a partir 2 M de NaCl em meio reacional, bem como aumento da atividade na concentração de 0,05 M.

Tabela 2.5 Efeito da adição de diferentes concentrações de NaCl e estabilidade da atividade de BGLs por *P. roqueforti* ATCC10110 a partir de FES em 5,0 g de palma forrageira com 10^7 de esporos por grama de substrato. Condições de reação: pH 5,0, 52 °C, 10 min.

| NaCl (M) | Atividade Relativa (%) | |
|----------|------------------------|--------------|
| | Efeito | Estabilidade |
| 0,5 | 139,93 ± 17,46 | 57,95 ± 3,14 |
| 1,0 | 91,79 ± 2,15 | 81,20 ± 4,17 |
| 1,5 | 89,0 ± 6,17 | 87,4 ± 0,44 |
| 2,0 | 95,34 ± 0,52 | 94,28 ± 2,18 |

A atividade obtida sem adição do sal foi tomada como 100%.

Enzimas que são resistentes a grandes quantidades de sal, geralmente, não são de origem fúngica, além disso as celulasas que apresentam tolerância significativa a NaCl são majoritariamente provenientes de microrganismos de origem halofílicas (Xu et al., 2014; Silva, 2018), desse modo este resultado demonstra que o *P. roqueforti* ATCC 10110, um fungo não halofílico, é capaz de produzir β -glicosidase halotolerante.

Além de ser investigada a influência de NaCl na atividade reacional, também foi investigada a estabilidade da enzima em solução salina (Tabela 2.5), sendo observado que a β -glicosidase manteve 94,28% de sua atividade de controle após 24 h de incubação na mais alta concentração investigada, 2 M.

Baseado nestes resultados, a β -glicosidase investigada pode ser considerada halotolerante, uma vez que a enzima apresenta atividade com e sem NaCl, enquanto as enzimas halofílicas tendem a ser inativadas em menos de 2 M NaCl (Madern et al., 2000). Esta característica pode permitir sua aplicação em processo de sacarificação de biomassa lignocelulósica usando água do mar, uma vez que 0,5 M de NaCl equivale a concentração salina da água do mar. Além disso, a halotolerância possibilita a aplicação

em processos envolvendo pré-tratamentos de biomassa que resultam em altas concentrações salinas, como também, esta propriedade é interessante para a indústria alimentícia em processos que requer altas concentrações de sal, como no preparo de molho de soja (Delgado-García, 2012; Meleiro et al., 2018).

2.4 CONCLUSÃO

O *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 demonstrou ser promissor na produção de β -glicosidase quando cultivado sob fermentação em estado sólido utilizando como substrato matéria prima vegetal renovável, a palma forrageira, que impulsionou a produção enzimática sem adição de suplementos elaborados a uma temperatura próxima a ambiente. A enzima produzida apresenta características atrativas para aplicação industrial, adaptando-se a pH ácido e apresentando boa estabilidade térmica, além de maior atividade catalítica pela adição dos compostos EDTA, Triton-X, do solvente diclorometano e íons metálicos Fe^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ . Outro fator vantajoso da β -glicosidase investigada é sua halotolerância, que favorece sua aplicação a processos industriais com elevadas concentrações salinas.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro, a Universidade Estadual de Santa Cruz pelo apoio técnico e administrativo.

2.5 REFERÊNCIAS

- Ahmed, A., Aslam, M., Ashraf, M., Nasim F. ul-Hassan, Batool, K., Bibi, A. (2017). Microbial β -glucosidases: screening, characterization, cloning and applications. J. App. Environ. Microbiol. 5, 57-73. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-2-2>
- Aliyah, A., Alamsyah, G., Ramadhani, R., Hermansyah, H. (2017) Production of α -amylase and β -glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. Energy Procedia. 136, 418-423. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.269>
- Asha, P., Divya, J., Singh, I. B. (2016). Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. Bioresour. Technol. 213, 245-248. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.013>
- Auta, R., Radecka, I., Hooley, P. (2016). A Novel thermotolerant β -glucosidase from *Aspergillus nidulans* has activity across a broad pH profile and a likely bacterial origin. The FASEB Journal, 30, 1070-1. <https://doi.org/10.5923/j.ajb.20170705.03>
- Delgado-García, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar-González, C. N., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R. (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. J. Sci. Food Agric. 92, 2575-2580. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5860>
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., Verma, M. (2012). Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. I. Crop. Prod. 38, 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.036>
- Dong, W., Xue, M., Zhang, Y., Xin, F., Wei, C., Zhang, W., Jiang, M. (2017). Characterization of a β -glucosidase from *Paenibacillus* species and its application for succinic acid production from sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresour. Technol. 241, 309-316. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.141>
- dos Santos, T. C., de Brito, A. R., Bonomo, R. C. F., Pires, A. J. V., Aguiar-Oliveira, E., Silva, T. P., Franco, M. (2017). Statistical optimization of culture conditions and characterization for ligninolytic enzymes produced from *Rhizopus* sp. using prickly palm cactus husk. Chem. Eng. Commun. 204, 55-63. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n126rc>.
- Farinas, C. S. (2015). Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. Renew. Sust. Energ. Ver. 52, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>
- Ferraz, J. L. D. A. A., Souza, L. O., Soares, G. A., Coutinho, J. P., de Oliveira, J. R., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. Bioresour. Technol. 248, 214-220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>
- Fusco, F. A., Fiorentino, G., Pedone, E., Contursi, P., Bartolucci, S., & Limauro, D. (2018). Biochemical characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*. Int. J. Biol. Macromol. 113, 783-791. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.018>

- Garcia, N. F. L., Santos, F. R. D. S., Gonçalves, F. A., Paz, M. F. D., Fonseca, G. G., and Leite, R. S. R. (2015). Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electron. J. Biotechn.* 18, 314-319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.05.007>
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., Brena, B. M. (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white *Muscat wine*. *Process Biochem.* 46, 385-389. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>
- Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* 50, 1327-1341. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>
- Herbst, D., Peper, S., & Niemeyer, B. (2012). Enzyme catalysis in organic solvents: influence of water content, solvent composition and temperature on *Candida rugosa* lipase catalyzed transesterification. *J. Biotechnol.* 162, 398-403. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.011>
- Hsieh, C. W. C., Cannella, D., Jørgensen, H., Felby, C., & Thygesen, L. G. (2014). Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3800-3805. <https://doi.org/10.1021/jf5012962>
- Hwang, E. J., Lee, Y. S., & Choi, Y. L. (2018). Cloning, purification, and characterization of the organic solvent tolerant β -glucosidase, OaBGL84, from *Olleya aquimaris* DAU311. *App. Biol. Chem.* 61, 325–336. <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0361-9>
- Ishida, N., Okubo, A., Kawai, H., Yamazaki, S., Toda, S. (1980). Interaction of amino acids with transition metal ions in solution (I) solution structure of L-lysine with Co (II) and Cu (II) ions as studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Agric. Biol. Chem.* 44, 263-270. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10863934>
- Jeya M, Joo A-R, Lee K-M, Tiwari MK, Lee K-M, Kim S-H, Lee J-K. (2010). Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 86, 1473-1484. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2395-8>
- Kapilan, R., Arasaratnam, V. (2011). Paddy husk as support for solid state fermentation to produce xylanase from *Bacillus pumilus*. *Rice Science*, 18, 36-45. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(11\)60006-1](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(11)60006-1)
- Karnchanatat A, Petsom A, Sangvanich P, Piaphukiew J, Whalley AJ, Reynolds CD, Sihanonth P. (2007). Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wooddecaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb: Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 162-170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00662.x>
- Kiran, E. U., Trzcinski, A. P., Ng, W. J., Liu, Y. (2014). Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. *Waste Biomass Valori.* 5, 903-917. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9311-x>

- Kristensen, J. B., Börjesson, J., Bruun, M. H., Tjerneld, F., Jørgensen, H. (2007). Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 888-895. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.014>
- Kuo, H. P., Wang, R., Huang, C. Y., Lai, J. T., Lo, Y. C., Huang, S. T. (2018). Characterization of an extracellular β -glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production. *J. Food Drug Anal.* 26, 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.016>
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81-87. <https://doi.org/10.1002/bit.260300112>
- Li, N., Zong, M. H. (2010). Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 66, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.004>
- Li, Y., Hu, X., Sang, J., Zhang, Y., Zhang, H., Lu, F., and Liu, F. (2018). An acid-stable β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus*: Gene expression, biochemical characterization and molecular dynamics simulation. *Int. J. Biol. Macromol.* 119, 462-469. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.165>
- Madern, D., Ebel, C., Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4, 91-98. <https://doi.org/10.1007/s007920050142>
- Maeda, R. N., Barcelos, C. A., Santa Anna, L. M. M., Pereira Jr, N. (2013). Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *J. Biotechnol.* 163, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.014>
- Mandels, M., Reese, E. T. (1965). Inhibition of cellulases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3, 85-102. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.03.090165.000505>
- Marjamaa, K., Toth, K., Bromann, P. A., Szakacs, G., Kruus, K. (2013). Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme Microb. Technol.* 52, 358-369. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.03.003>
- Marques, G. L., dos Santos Reis, N., Silva, T. P., Ferreira, M. L. O., Aguiar-Oliveira, E., de Oliveira, J. R., Franco, M. (2017). Production and characterisation of xylanase and endoglucanases produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through the solid-state fermentation of rice husk residue. *Waste Biomass Valori.* 9, 2061-2069. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x>
- Matsuura, M., Sasaki, J., Murao, S. (1995). Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1623-1627. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1623>
- Meleiro, L. P., Carli, S., Fonseca-Maldonado, R., da Silva Torricillas, M., Zimbardi, A. L. R. L., Ward, R. J., Furriel, R. P. M. (2018). Overexpression of a cellobiose-glucose-halotolerant endoglucanase from *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 185, 316-333. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2660-8>
- Mioso, R., Toledo Marante, F. J., Herrera Bravo de Laguna, I. (2015). *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *J. App. Microbial.* 118, 781-791. <https://doi.org/10.1111/jam.12706>

- Miyano, H., Toyo'oka, T., Imai, K., Nakajima, T. (1985). Influences of metal ions on the reaction of amino and imino acids with fluorogenic reagents. *Anal. Biochem.* 150, 125-130. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90450-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90450-6)
- Oh, J. M., Lee, J. P., Baek, S. C., Kim, S. G., Do Jo, Y., Kim, J., Kim, H. (2018). Characterization of two extracellular β -glucosidases produced from the cellulolytic fungus *Aspergillus* sp. YDJ216 and their potential applications for the hydrolysis of flavone glycosides. *Int. J. Biol. Macromol.* 111, 595-603. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.020>
- Ohara, A., Santos, J. G. D., Angelotti, J. A. F., Barbosa, P. D. P. M., Dias, F. F. G., Bagagli, M. P., Castro, R. J. S. D. (2018). A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation. *Food Sci. Technol. (AHEAD)*, 38, 131-137. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.17017>
- Ovalle, S., Cavello, I., Brena, B. M., Cavalitto, S., González-Pombo, P. (2018). Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *LWT*, 87, 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.026>
- Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 27, 109-117. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)80017-W](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W)
- Park A-R, Hong JH, Kim J-J, Yoon J-J. (2012). Biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the fungus, *Penicillium italicum*, isolated from rotten citrus peel. *Mycobiology*, 40, 173-180. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.3.173>
- Pereira de Cassia, J., Giese, E. C., de Souza Moretti, M. M., dos Santos Gomes, A. C., Perrone, O. M., Boscolo, M., Martins, D. A. B. (2017). Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. In *Enzyme Inhibitors and Activators. IntechOpen*. 6, 139- 164. <http://dx.doi.org/10.5772/65934>
- Salgado, J. C. S., Meleiro, L. P., Carli, S., Ward, R. J. (2018). Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases—A review. *Bioresour Technol.* 267, 704-713. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.137>
- Salim, A. A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Tanasković, S. J., Luković, N., Knežević-Jugović, Z. (2017). Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods. *Bioresour. Technol.* 228, 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.081>
- Santa-Rosa, P. S., Souza, A. L., Roque, R. A., Andrade, E. V., Astolfi-Filho, S., Mota, A. J., and Nunes-Silva, C. G. (2018). Production of thermostable β -glucosidase and CMCCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. *Electron J. Biotechn.* 31, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.005>
- Santos, T. C. D., Abreu Filho, G. E. O. R. G. E., Brito, A. R. D., Pires, A. J. V., Bonomo, R. C. F., and Franco, M. (2016). Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. *Revista Caatinga*, 29, 222-233. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n126rc>

- Santos, T. C., dos Santos Reis, N., Silva, T. P., Machado, F. D. P. P., Bonomo, R. C. F., Franco, M. (2016). Prickly palm cactus husk as a raw material for production of ligninolytic enzymes by *Aspergillus niger*. Food Sci. Biotechnol. 25, 205-211. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-016-0031-9>
- Silva, T. P., Fabiana, S., dos Santos, C. W. V., Franco, M., Caetano, L. C., Pereira, H. J. V. (2018). Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. Bioresour. Technol. 270, 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.022>
- Sohail, M., Siddiqi, R., Ahmad, A., Khan, S. A. (2009). Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. New Biotechnol. 25, 437-441. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.002>
- Souza, L. O., de Brito, A. R., Bonomo, R. C. F., Santana, N. B., Ferraz, J. L. D. A. A., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M. (2018). Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. Biocatal. Agric. Biotechnol. 16, 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.016>
- Sun, H., Ge, X., Hao, Z., and Peng, M. (2010). Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. Afr. J. Biotechnol. 9, 163-166.
- Wallecha, A., Mishra, S. (2003). Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteom. 1649, 74-84. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00163-8](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00163-8)
- Watanabe, A., Suzuki, M., Ujiie, S., and Gomi, K. (2016). Purification and enzymatic characterization of a novel β -1,6-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. J. Biosci. Bioeng. 121, 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.07.011>
- Wu, J., Geng, A., Xie, R., Wang, H., and Sun, J. (2018). Characterization of cold adapted and ethanol tolerant β -glucosidase from *Bacillus cellulosilyticus* and its application for directed hydrolysis of cellobiose to ethanol. Int. J. Biol. Macromol. 109, 872-879. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.072>
- Xia, Y., Yang, L., Xia, L. (2018). High-level production of a fungal β -glucosidase with application potentials in the cost-effective production of *Trichoderma reesei* cellulase. Process Biochem. 70, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.031>