

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO
E MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

DIANDRA DE ANDRADES

**Hidrolases de fungos isolados da Mata Atlântica cultivados
em resíduos agroindustriais: Produção, Purificação e
Caracterização Enzimática**

CASCADEL-PR
JUNHO/2014

DIANDRA DE ANDRADES

**Hidrolases de fungos isolados da Mata Atlântica cultivados em
resíduos agroindustriais: Produção, Purificação e Caracterização
Enzimática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientadora: Marina Kimiko Kadowaki

CASCADEL-PR

Junho/2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A553h

Andrades, Diandra de

Hidrolases de fungos isolados da Mata Atlântica cultivados em resíduos agroindustriais: produção, purificação e caracterização enzimática. / Diandra de Andrades.— Cascavel, 2014.

76p.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Marina Kimiko Kadowaki

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Cascavel, 2014

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de
Recursos Naturais

1. Mata Atlântica. 2. Hidrolases. 3. Fungos. 4. Resíduos agroindustriais. I.
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 20.ed. 574.1925
576

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9^a/965

FOLHA DE APROVAÇÃO

DIANDRA DE ANDRADES

**Hidrolases de fungos isolados da Mata Atlântica cultivados em
resíduos agroindustriais: Produção, Purificação e Caracterização
Enzimática**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, pela comissão Examinadora composta pelos membros:

Prof^a. Dr^a Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof^a. Dr^a Cristina Beatriz Aroca Ribeiro

Docente externo

Prof^a. Dr^a Rita de Cássia Garcia Simão

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em 27 de junho de 2014.

Local da defesa: Unioeste, Prédio de salas de aula, sala 56, Cascavel-PR.

*Para aquela que muitas vezes sacrificou os seus
sonhos para que os meus fossem realizados,
meu exemplo, minha mãe, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada barreira e dificuldade que passei durante esta trajetória, pois foram matérias-primas para meu amadurecimento. À Ele, que sempre guiou os meus passos e me deu forças para levantar nas horas difíceis e, assim, me fez entender que nada é impossível quando as ferramentas são o amor, a fé e a dedicação.

Agradecerei até os últimos dias da minha vida, a aquela que agarrou os meus sonhos como dela e enfrentou tudo para que eu chegasse até aqui. Obrigada, mãezinha, por ter trabalhado em dobro para que eu tivesse condições financeiras de me manter estudando fora de casa. Obrigada, Dona Clair, por tudo que eu sou. Obrigada pelo amor único e por me proporcionar o orgulho de ser filha de alguém tão especial: minha heroína e meu exemplo de caráter! Sempre me esforçarei para que eu tenha condições de, no mínimo, te retribuir uma parcela. Obrigada, minha família, por toda a confiança depositada, pelos abraços e carinhos sem os quais nada conseguiria. Obrigada, meus irmãos queridos, Daniel e Danieli, que sempre me ensinaram o significado da partilha e da fraternidade. Aos meus amados avós, Classi e Dionizio, que sempre se preocuparam com meu bem estar e preparavam caixas e caixas de comidas para a viagem. Obrigada, enfim, a toda a minha família que acompanhou todas as minhas dificuldades e tem grande parte nessa conquista valiosa.

Agradeço à professora Marina, minha querida orientadora (não podia ter escolhido melhor!). Sou grata a ela pela sua serenidade e incomparável paciência para ensinar e tirar as pequenas dúvidas. Tais qualidades (e outras mais) conquistaram minha admiração e meu respeito. Sem dúvida todos esses anos foram muito mais marcantes com seus ensinamentos profissionais e pessoais. Muito obrigada por ter confiado na minha capacidade - até mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei... – e ter visto em mim alguém que poderia ir mais longe. MUITÍSSIMO obrigada pela amizade que levarei para toda a vida. Aos professores Dr^a Clarice A. Osaku, Dr^a Rita G. Simão e Dr^o José L. C. Silva pelo apoio, sugestões e pela boa companhia durante os cafés na sala dos professores.

Também agradeço aos meus queridos colegas de laboratório Juliana, Luciana, Carla, Laysa, Nyéssia, Sandra e Alesandra (foram inúmeras as risadas e os momentos de descontração!). Agradeço-lhe também pelas trocas de ideias e constantes discussões de resultados que não deram certo de primeira. Graças a vocês os dias de trabalho foram mais agradáveis! Sentirei muitas saudades e guardarei esses momentos na memória.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução Geral.....	1
2. CAPÍTULO 1: Avaliação do Potencial dos Fungos Filamentosos na Produção de β -galactosidase e β -frutofuranosidase utilizando fontes alternativas de carbono.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
CONCLUSÃO.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
3. CAPÍTULO 2: Potencial biotecnológico de fungos isolados da Mata Atlântica: Produção de complexos multienzimáticos.....	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	41
4. CAPÍTULO 3: Produção, purificação e caracterização de beta- frutofuranosidase do fungo <i>Aspergillus flavus</i>	54
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

RESUMO

Nos últimos anos a utilização de processos biotecnológicos com microrganismos vem se destacando cada vez mais, em especial a produção e comércio de enzimas. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o potencial de seis fungos filamentosos (*Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Chrysonilia sitophila*, *Gliocadium virens*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus flavus* isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná e sua capacidade em produzir enzimas hidrolíticas do complexo celulolítico, xilanolítico, pectinolítico e dissacaridases (β -galactosidase, β -glicosidases e β -frutofuranosidase), bem como purificar e caracterizar a β -frutofuranosidase do *A. flavus*. O fungo *A. aculeatus* exibiu grande potencial na produção de β -galactosidase intracelular (56,31 U/ml) com casca de laranja como substrato, β -frutofuranosidase intracelular (409,46 U/ml) com o trub (resíduo cervejeiro) e β -glicosidase intracelular obtida com a casca de maracujá (192,2 U/ml). O *C. sitophila* se destacou na produção de β -galactosidase intracelular com palha de sorgo (16,48 U/ml) e β -xilosidase intracelular com casca de laranja (4,60 U/ml). O *A. fumigatus* também foi um bom produtor de β -galactosidase intracelular (17,26 U/ml) com casca de maracujá e pectinase extracelular (45,95 U/ml) com casca de laranja. Entretanto, o *Gliocadium virens* produziu somente β -galactosidase intracelular (22,57 U/ml) com palha de arroz. Enquanto que o *T. longibrachiatum* exibiu atividade xilanase extracelular com palha de sorgo (22,38 U/ml), pectinase extracelular (26,43 U/ml) com casca de laranja e beta-galactosidase intracelular (17,53 U/ml) com casca de maracujá. Em adição, o *Aspergillus flavus* alcançou excelentes níveis β -frutofuranosidase tanto em cultivo líquido quanto em cultivo sólido quando suplementados com o farelo de soja ou trub, porém a produção enzimática do cultivo sólido foi 5 vezes superior ao cultivo líquido. Esta beta-frutofuranosidase de cultivo em estado sólido de farelo de soja foi parcialmente purificada com rendimento final de 19%, com massa molecular aparente de 37 KDa por SDS-PAGE e 45 KDa na forma nativa. O pH e a temperatura ótima de atividade da enzima foram de 5,0 e 60 °C, respectivamente. A enzima foi estável com 70% de atividade residual após 12 horas na faixa de pHs ácido (4,5 e 5,0), enquanto que nas temperaturas de 45°C a 55°C a enzima mostrou estabilidade superior a 50%.

Palavras chave: Mata Atlântica, hidrolases, fungos, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

In recent years the use of biotechnological processes with microorganisms has been highlighted, in particular the production of enzymes and commercial market. The objective of this study was to investigate the potential six filamentous fungi (*Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus sitophila*, *Chrysonilia*, *Gliocadium virens*, *Aspergillus flavus* and *Trichoderma longibrachiatum* isolated from Atlantic West of Paraná and its ability to produce hydrolytic enzymes of the cellulolytic complex, xylanolytic, pectinase and disaccharidases (β -galactosidase, β -glucosidase and β -fructofuranosidase), as well as purify and characterize the β -fructofuranosidase from *A. flavus*. The fungus *A. aculeatus* exhibited great potential in the production of intracellular β -galactosidase (56,31 U/ml) with orange peel as substrate, intracellular β -fructofuranosidase (409.46 U/mL) with the trub (brewing residue) and intracellular β -glucosidase obtained with passion fruit peel (192.2 U/ml). *C. sitophila* showed increased production of intracellular β -galactosidase with sorghum straw (16.48 U/ml) and intracellular β -xylosidase with orange peel (4.60 U/ml). *A. fumigatus* also was a good producer of β -galactosidase intracellular (17.26 U/ml) with passion fruit peel and extracellular pectinase (45.95 U/ml) with orange peel. However, *Gliocadium virens* produced only intracellular β -galactosidase (22.57 U/ml) with rice straw. While *T. longibracitum* exhibited the best enzymatic production of enzymes xylanase (22.38 U/ml) with sorghum straw; pectinase (26.43 U/ml) with orange peel and intracellular beta-galactosidase (17.53 U/ml) using passion fruit peel. In addition, *Aspergillus flavus* achieved excellent levels β -fructofuranosidase both in liquid culture and in solid culture when supplemented with soybean meal or trub, but the enzymatic production of solid cultivation was 5 times higher than the liquid culture. Thus, beta-fructofuranosidase obtained under solid state cultivation of soybean meal was partially purified with 19% overall yield with an apparent molecular mass of 37 kDa by SDS-PAGE and 45 kDa in native form. The pH and the optimum temperature for enzyme activity were 5.0 and 60°C, respectively. The enzyme was stable at 70% residual activity after 12 hours in the acid pH range (5.0 to 5.5), while at temperatures of 45°C to 55°C the enzyme showed higher stability than 50%.

Key words: Atlantic forest, hydrolases, fungi, agroindustrial waste

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos a utilização de processos biotecnológicos para produção de bioativos de interesse industrial a partir de microrganismos vem se destacando cada vez mais, contribuindo inclusive para o desenvolvimento tecnológico mundial (MACIEL, 2006). Entre os produtos resultantes de bioprocessos estão as enzimas microbianas. A crescente utilização de fungos na produção de enzimas e metabólitos secundários aplicáveis em biotecnologia está relacionada, entre outros fatores, a grande facilidade de cultivo em laboratório e sua reduzida necessidade nutricional (BENNETT, 2010; SLIVINSKI, 2007). A utilização dos fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse comercial é vantajosa devido ao fato destes microrganismos excretarem estas proteínas para o meio de cultura, o que facilita o processo de obtenção e purificação destas moléculas (REIS, 2007). Além disso, enzimas fúngicas possuem vasta aplicabilidade industrial como, por exemplo, na indústria farmacêutica, alimentícia, têxtil, de papel, de ração, detergente, entre outras. Para a produção industrial de enzimas microbianas os microrganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo, produzirem a enzima em velocidade elevada, constante e em curto espaço de tempo. Os métodos para a recuperação devem ser simples, a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos microrganismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (SLIVINSKI, 2007).

Atualmente os processos biotecnológicos microbianos são responsáveis por uma grande parte da economia mundial, mas apesar da potencialidade do desenvolvimento dos processos enzimáticos vários estudos apontam os altos custos da produção como um fator limitante. Assim, uma das alternativas para minimizar este problema é o emprego de resíduos agroindustriais como substrato fermentescível (MUSSATTO et al, 2007; FERNANDES). Esta estratégia pode reduzir custos para aquisição de bioprodutos de origem microbiana e também contribuir com práticas biotecnológicas ecologicamente sustentáveis (ALVIRA et al., 2010; COSTA, 2008).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do Planeta - 15 a 25% da biodiversidade mundial. Devido a sua dimensão continental e à grande variação geomorfológica e climática, o Brasil abriga sete biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Costeiros, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos). Esses sete biomas são portadores de diversas espécies de animais, vegetais e microrganismos. No entanto, apenas 10% das espécies de fungos

que possuímos são conhecidas. A insuficiência de conhecimento científico da biodiversidade de microrganismos desses biomas, contrastado com a perda acelerada de habitats causados por mudanças ambientais globais, são aspectos particularmente preocupantes. Portanto, esse estudo contribuirá com ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade fúngica da Mata Atlântica do Paraná, além de buscar inovações sustentáveis em bioprocessos utilizando resíduos agroindustriais como alternativa promissora para obtenção de produtos de maior valor agregado. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar o potencial dos fungos filamentosos isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná capazes de produzir enzimas hidrolíticas (complexo celulolítico, xilanolítico, pectinolítico e dissacaridases), bem como analisar as características bioquímicas dessas enzimas para aplicação industrial.

CAPITULO 1:

Avaliação do Potencial dos Fungos Filamentosos na Produção de β -galactosidase e β -frutofuranosidase utilizando fontes alternativas de carbono

Diandra de Andrades¹, Marina Kimiko Kadowaki^{1,2}

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Rua Universitária 2069, Jardim Universitário, 85819-110 Cascavel, PR, Brasil

2. Autor para correspondência: marinakk@gmail.com

Resumo

A exploração de resíduos agroindustriais como fonte de carbono em bioprocessos para a produção de enzimas fúngicas podem ajudar na busca de fontes de baixo custo, e ajudar a resolver os problemas ambientais. O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade de produzir beta-frutofuranosidase e beta-galactosidase utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono por cinco fungos (*Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Chrysonilia sitophila*, *Gliocadium virens* e *Trichoderma longibrachiatum*) isolados recentemente na Mata Atlântica do Oeste do Paraná. Os valores mais elevados de atividade intracelular de beta-galactosidase foram obtidos a partir do resíduo de casca de laranja (56,31 U/ml) com o fungo *A. aculeatus*, palha de arroz (22,57 U/ml) por *G. virens*, palha de sorgo (16,48 U/ml) para *C. sitophila*, casca de maracujá para o *A. fumigatus* (17,26 U/ml) e *T. longibrachiatum* (17,53 U/ml). As melhores atividades da beta-frutofuranosidase intracelular foram obtidos com *A. aculeatus* usando o resíduo cervejeiro trub (409,46 U/ml) e casca de maracujá (44,59 U/ml). Assim, os fungos isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná podem ser considerados como promissores, principalmente pela produção de beta-galactosidase e beta-frutofuranosidase, especialmente o fungo *A. aculeatus*. Os resíduos agroindustriais, tais como casca de laranja e trub mostraram grande potencial como indutores para a produção destas enzimas.

Palavras chave: fungos, resíduos, β -galactosidase, β -frutofuranosidase.

Abstract

Exploration of agro-industrial wastes as carbon sources in bioprocesses for the production of fungal enzymes may help in the search for inexpensive sources, and aid in solving environmental problems. The purpose of this study was to investigate the ability to produce beta-fructofuranosidase and beta-galactosidase using agroindustrial wastes as carbon source for five fungal (*Aspergillus aculeatus*, *Chrysonilia sitophila*, *Gliocadium virens*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichoderma longibrachiatum*) isolated recently in the Atlantic Forest of Parana. The highest values of intracellular activity of beta-galactosidase was obtained from the orange peel waste (56.31 U/ml) with the fungus *A. aculeatus*, rice straw (22.57 U/ml) for *G. virens* sorghum straw (16.48 U/ml) for *C. sitophila*, passion fruit peel to *A. fumigatus* (17.26 U/ml) and *T. longibrachiatum* (17.53 U/ml). The best activity of intracellular β -frutofuranosidase activity were obtained with *A. aculeatus* using trub (409.46 U/ml) and passion fruit peel (44.59 U/ml). Thus, the fungi isolated from Atlantic Forest of Paraná can be considered as promising mainly for its production of β -galactosidase and β -frutofuranosidases, especially the *A. aculeatus* fungus. The agro-industrial residues such as orange peel and trub showed great potential as inducers for the production of these enzymes.

Keywords: fungi, agro-industrial waste, *β -galactosidase*, *β -frutofuranosidase*

Introdução

Nos últimos anos, houve um grande interesse na aplicação dos resíduos agroindustriais como fontes indutoras para a produção de diversos produtos com alto valor agregado, tais como o etanol, proteínas microbianas, ácidos orgânicos, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (Sanchés, 2009). Dentre os resíduos citados na literatura como indutores de enzimas, está o bagaço de mandioca, bagaço de cana, resíduos de beterraba, borra e casca de café, casca e bagaço de frutas cítricas, farelo de trigo, entre outros (Soccol e Vandenberghe 2003). Por ser um país com intensa atividade agrícola o Brasil produz anualmente uma grande quantidade de resíduos agroindustriais que geram grandes volumes com um alto potencial poluidor. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de ser uma fonte barata e de fácil acesso, também pode ajudar na solução dos problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza por atribuir uma destinação adequada a estes resíduos (Dashtban et al. 2009). Tais estudos são muito interessantes, visto que resíduos agroindustriais baratos podem ser utilizados como ricas fontes de carbono para a produção de enzimas com valor comercial. Dentre os principais produtos resultantes dos processos biotecnológicos estão as enzimas aplicadas nos mais diversos setores, como por exemplo, alimentícios, bebidas, detergentes, papel e celulose, têxtil, animal, e farmacêutica (Said e Pietro 2004; Li et al. 2012). Devido a esta alta aplicabilidade industrial nos mais variados setores, a busca por microrganismos que produzem estas enzimas tem uma grande relevância.

A invertase ou β -D-frutofuranosidase (E.C.3.2.1.26) é a enzima responsável pela hidrólise irreversível da ligação β 1-2 do dissacarídeo sacarose, originando uma mistura em quantidades iguais de glicose e frutose (Kadowaki et al. 2013). A invertase possui importância comercial em indústrias de alimentos, principalmente para a produção de doces e chocolates com o centro liquefeito, em indústrias sucroalcooleiras, e na produção de ácido láctico (Vitolo 2004; Kadowaki et al. 2013). Nas últimas décadas, a atividade enzimática da invertase tem sido extensivamente caracterizada por vários microrganismos, como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Andjelkovic et al. 2012), *Rhodotorula glutinis* (Rubio et al. 2002) e *Candida utilis* (Belcarz et al. 2002). Os fungos filamentosos também têm sido relatados como produtores de invertase de aplicação industrial, como *Penicillium chrisogenum* (Nuero e Reyes 2002), *A. fumigatus* (Uma et al. 2010), *A. ochraceus* (Guimarães et al. 2007), *A. niveus* (Guimarães et al. 2009), *A. caespitosus*

(Alegre et al. 2009), *Paecilomyces variotti* (Giraldo et al. 2012) e *A. niger* (Madhan et al. 2010). A produção por resíduos agroindustriais como bagaço de cana de açúcar, farinha de mandioca, e sabugo de milho (Alegre et al. 2009; Guimarães et al. 2007), resíduos de processamento de alimentos (Rashad e Nooman 2009), além de cascas de frutas como abacaxi, limão doce, romã, laranja e mosambi (Uma et al. 2012) têm sido citados na literatura como indutores de invertases.

Outra enzima de importância industrial, a β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é responsável por catalisar a hidrólise da lactose (Gal β 1-4Glc) para produzir glicose e galactose (Ansari e Satar 2012). Essa enzima é extensivamente utilizada pelas indústrias de laticínios, devido as suas aplicações na hidrólise da lactose do leite ou de produtos derivados do soro do leite. Recentemente, as β -galactosidases com atividade de transgalactosilação têm sido amplamente exploradas para a produção de galactoligossacarídeos (GOS) ou produtos funcionais galactosilados (Oliveira et al. 2011). Além disso, há um mercado considerável para o leite e produtos lácteos sem lactose nas indústrias de sorvete e na confeitaria, devido à intolerância ou má absorção de lactose ser um problema comum nos seres humanos. (Adam et al. 2004; Husain 2010). A produção de β -galactosidase é encontrada em células animais, plantas e microrganismos, tais como o *A. niger*, *A. oryzae*, *Kluyveromyces lactis* e *K. fragilis*, que são geralmente citados como seguros (GRAS) para consumo humano (Husain 2010).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi testar diferentes resíduos agroindustriais como indutores na produção de β -galactosidase e β -frutofuranosidase com as cinco linhagens de fungos filamentosos isolados da Mata Atlântica do Paraná. Embora o Brasil abrigue a maior biodiversidade do mundo (15 a 20%) e o maior número de espécies endêmicas, apenas 10% das 2 milhões de suas espécies são conhecidas (Ribeiro et al. 2009). Sabe-se ainda muito menos sobre sua diversidade de microrganismos, como bactérias e fungos. Diante deste cenário, a necessidade de ampliação do conhecimento a cerca da diversidade fúngica - especificamente da região de Mata Atlântica do Oeste do Paraná - somada à importância que estes microrganismos e seus produtos podem oferecer incentiva estudos mais aprofundados sobre a biota destes locais.

Material e Métodos

Isolamento e identificação dos fungos

As linhagens de fungos utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de amostras de solo ou de decomposição de matéria orgânica (folhas, caule e raiz) da Mata Atlântica na Reserva Biológica Bela Vista de Itaipu, localizada em Foz do Iguaçu, Paraná - Brasil. Aproximadamente 5 g de solo ou de pedaços de madeira em decomposição (comprimento de 10 e 20 mm) foram transferidos para placas contendo um meio de batata-dextrose-ágar (BDA) com cloranfenicol e incubados a 28°C ou 43°C durante 72-120 horas. Após a incubação, cada isolado purificado foi transferido para placa com meio de BDA fresco. A identificação morfológica dos fungos foi realizada pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, PE-Brasil. As estirpes selecionadas foram em seguida mantidas em tubos contendo meio BDA a 4°C. A extração de DNA genômico dos fungos foi realizada utilizando a metodologia descrita por White et al. [1990]. O fragmento de DNA da região ITS foi amplificada com o par de oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' direto) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' reverso). Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1,0% Tris-acetato-EDTA (agarose 1,0%, 0,04 M Tris-acetato e 1 mM EDTA), e revelados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação UV. A purificação dos produtos de PCR e a determinação das seqüências utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 foram realizadas pela empresa Helixxa® (Campinas-SP, Brasil). As seqüências determinadas (ITS1, ITS2 e 5.8S) foram comparadas com outras seqüências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando a ferramenta básica de alinhamento local (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> website). As identificações taxonômicas obtidas em nível de espécies dos fungos foram: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Gliocadium virens*, *Crysonilia sitophila*, e *Trichoderma longibrachiatum*.

Condições de cultivo e obtenção de enzimas

O meio líquido utilizado para a produção das enzimas foi composto de (gramas por litro): Extrato de levedura, 5; (NH₄)₂SO₄, 2.8; KH₂PO₄, 4; MgSO₄·7H₂O, 0.9; CaCl₂·2H₂O,

0.9. O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio estéril suplementado com 1% de fonte de carbono alternativo (Casca de banana, casca de laranja, casca de maracujá, casca de nozes, casca de pera, farelo de quinoa, farelo de soja, palha de arroz, palha de sorgo e trub). Os resíduos agroindustriais foram adquiridos no comércio local e utilizados sem qualquer pré-tratamento. Após o inóculo de 1 ml da solução de esporos (10^5 esporos/ mL), as culturas dos fungos mesofílicos *A. aculeatus*, *C. sitophila* e *G. virens* foram incubados (incubadora tipo B.O.D.) a 28°C, enquanto os fungos termotolerantes *A. fumigatus* e *T. longibrachiatum* (estufa bacteriológica) a 42°C, em condição estacionária por 5 dias. Após o crescimento as culturas foram filtradas a vácuo, com funil de Büchner e papel filtro, obtendo-se um filtrado livre de células, o qual foi utilizado para determinação da atividade enzimática extracelular. O extrato intracelular foi obtido a partir do micélio congelado em freezer -20°C, macerado em gral de porcelana mantido em gelo, ressuspenso em água destilada gelada e centrifugado a 6000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O filtrado foi dialisado por uma noite a 4°C, contra tampão utilizado para o ensaio.

Dosagens Enzimáticas

Atividade β -frutofuranosidásica A atividade de β -frutofuranosidase foi determinada utilizando 0,2 M de sacarose em tampão acetato de sódio (50 mM pH 4,0), a 60°C, por 10 min. A reação foi interrompida com adição do ácido 3,5'dinitrosalicílico (DNS) e os açúcares redutores quantificados pelo método de Miller (1959). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 micromol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

Atividade β -galactosidásica 100 μ l da enzima adequadamente diluída foi incubada com 500 μ l do substrato sintético o-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (3 mM) em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,5) a 40°C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 2 ml de 0,2 M de Na_2CO_3 . A atividade da enzima foi determinada a partir da quantidade de o-nitrofenol liberado e medida por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto sob as condições de ensaio.

Determinação de Proteínas

As proteínas foram determinadas a partir do método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovina como padrão.

Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças significativas entre as médias das atividades enzimáticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com o auxílio do software SAEG, versão 9.1., em nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Os fungos filamentosos *A. aculeatus*, *A. fumigatus*, *C. sitophila*, *G. virens* e *T. longibrachiatum* foram cultivados em meio líquido na presença de diferentes resíduos agroindustriais para verificar os melhores substratos indutores para a produção das enzimas β -galactosidase e β -frutofuranosidase.

Influência de resíduos agroindustriais e produtos agrícolas na produção de β -galactosidase pelas linhagens estudadas

Entre os dez resíduos lignocelulósicos testados como fonte de carbono, a casca de laranja favoreceu significativamente a indução da β -galactosidase extracelular em relação aos demais resíduos para as cinco linhagens fúngicas (Figura 1). Os maiores valores de atividade da β -galactosidase extracelular (8,47 U/ml) foram observados na presença da casca de laranja com o fungo *G. virens*. Entretanto o nível de atividade da β -galactosidase intracelular foi maior que as extracelulares. Sendo que os maiores indutores da enzima foram a casca de laranja (56,31 U/ml) para o fungo *A. aculeatus*, palha de arroz (22,57 U/ml) para o *G. virens* e casca de maracujá para o *A. fumigatus* (17,26 U/ml) e *T. longibrachiatum* (17,53 U/ml) (Figura 2).

Até o momento, não existem relatos sobre a produção de β -galactosidase para fungos das espécies de *Gliocadium* e *Chrysonilia*. Porém o gênero *Aspergillus*, como o *A. niger* (Panesar et al. 2010), é citado como um dos fungos amplamente empregados na indústria (Panesar et al. 2006). Várias linhagens de *A. oryzae* também foram estudadas por Bailey e Linko (1990), quanto à produção de β -galactosidase utilizando diferentes combinações de fontes indutoras. A maior produção foi encontrada na presença de farelo de trigo (500 nkat/ml). Inúmeras estirpes do gênero *Trichoderma* também têm sido relatadas quanto à produção de β -galactosidase induzidas por lactose, na faixa de 0,35 a 2,24 U/ml, ou seja, semelhante aos valores obtidos com o *T. longibrachiatum* (Akinola et al. 2012).

O resíduo agroindustrial que favoreceu significativamente a produção da β -galactosidase pelas linhagens fúngicas testadas neste trabalho foi a casca de laranja. Os resíduos cítricos têm sido utilizados na produção de várias outras enzimas, como endopoligalacturonases produzidas por *Fusarium moniliforme* (Niture e Pant 2004), *A. giganteus* (Pedrolli et al. 2008), e β -galactosidases de *A. oryzae* (Shankar e Mulimani 2007). Além da produção de xilanase por *Streptomyces actuosus* (Wang et al. 2003).

Segundo Mamma e colaboradores (2008) as cascas de laranja secas são ricas em pectina, celulose e hemicelulose, que podem ser utilizados como fontes de carbono pelos microrganismos. Os resíduos de laranja contêm 16,9% de açúcares solúveis como glicose, frutose e sacarose, 9,21% de celulose, 10,5% de hemiceluloses, e 42,5% de pectina, o componente principal (Rezzadori et al. 2012). As elevadas quantidades dos compostos solúveis em água podem ter induzido os fungos estudados a excretarem galactosidases a fim de obter seus recursos. A utilização de casca de laranja como fonte indutora para produção de enzimas é muito interessante, visto que grandes quantidades deste resíduo são geradas no Brasil pelas indústrias citrícolas e a disposição das cascas frescas vem se tornando um grande problema ambiental para muitas fábricas. Além disso, a rica composição em carboidratos do resíduo de laranja pode ser utilizada para conversão biológica por hidrólise enzimática originando, assim, produtos com alto valor agregado (Rivas et al. 2008).

Outros resíduos que também se destacaram na produção da β -galactosidase intracelular pelo fungo *A. aculeatus* foram a palha de arroz (47,97 U/ml) e a casca de pera (44,45 U/ml). Segundo Kim e colaboradores (2013), a palha de arroz contém 46% de glucano, 19% de xilano e 35% de outros açúcares contendo lignina. Esta composição

torna-o um resíduo atrativo, pois uma grande quantidade de palha é acumulada como um subproduto de cultivos de arroz (Pandey et al. 2009). Além de ser uma rica fonte de nutrientes para o crescimento de fungos lignocelulósicos (Kausar et al. 2010). Os derivados de pera apresentam um baixo teor de proteína e lipídios e um elevado nível de açúcares como a frutose, a sacarose e a glicose, de fibras (Barroca et al. 2006) e além de uma rica composição mineral (Chen et al. 2007). Segundo dados do IBGE (2011), a região sul do Brasil apresenta a maior produção de pera do país. Além do consumo direto da fruta, ela é comumente encontrada em produtos processados como bebidas e doces. Entretanto, sabe-se que as cascas são frequentemente descartadas durante a fabricação desses produtos. O emprego destes resíduos no processo de produção de enzimas de interesse industrial agrega valor a um produto que seria normalmente descartado e contribui para a diminuição dos custos de produção das enzimas.

Produção de β -frutofuranosidase por fungos filamentosos induzidos por resíduos agroindustriais ou produtos agrícolas

Por outro lado, a atividade mais elevada da invertase extracelular foi obtida quando *A. aculeatus* foi crescido em presença de farelo de soja como indutor (9,48 U/ml) (Figura 3). No entanto, os níveis intracelulares de invertase foram consideravelmente maiores quando *A. aculeatus* foi crescido com trub (409,46 U/ml) ou casca de maracujá (44,59 U/ml). Nota-se que o fungo *C. sitophila* também apresentou alta produção invertásica na presença do resíduo de farelo de quinoa (27,91 U/ml) (Figura 4). Resultados similares foram encontrados para a atividade invertásica extracelular do *A. caespitosus* quando crescido em farelo de trigo (19,1 U/ml) e para a atividade intracelular na presença de sacarose como fonte indutora (15,8 U/ml) (Alegre et al. 2009). Do mesmo modo, *A. fumigatus* e *P. pinophilum* produziram aproximadamente 20000 U/L, enquanto que a linhagem de *A. niger* produziu 81270 U/L induzidos com sacarose (Flores-Gallegos et al. 2012). Já *Cladosporium cladosporioides* em cultivo líquido, utilizando casca de romã, apresentou uma produção de aproximadamente 14 U/ml (Uma et al. 2012). Esses dados demonstram que a produção de invertase encontrada para as linhagens *C. sitophila* e *A. aculeatus* deste trabalho apresentam grande potencial para futuras aplicações industriais.

O farelo de soja induziu significativamente a produção de invertase extracelular para as linhagens de *C. sitophila* (3,98 U/ml) e *A. aculeatus* (9,48 U/ml). Segundo Brijwani

e Vadlani (2011) as cascas de soja apresentam amplo potencial na indução de enzimas fúngicas devido a grande quantidade de celulose (34%), hemicelulose (17%), e lignina (10%) em sua composição, sendo assim ideal para estimular o crescimento celular destes fungos. Além disso, apresentam uma alta quantidade de proteína bruta que geralmente varia entre 44 e 48% de seu conteúdo, além de quantidades significativas de outros carboidratos (33%) e fibras (5%) (Watchararuij et al. 2008). Interessantemente, a produção de invertase intracelular do *A. aculeatus* (409,46 U/ml), *A. fumigatus* (4 U/ml) e *T. longibrachiatum* (4,14 U/ml) foi induzida com o trub, um resíduo obtido do processo de fermentação da cerveja pelas leveduras. Este resíduo é composto principalmente de complexos de proteína-proteína (50%), complexos de proteína-polifenol (15±25%), gorduras e carboidratos (20±30%) (Briggs et al. 2004; Mishra 2012). O trub possui excelentes características nutricionais e, muitas vezes, recebe o mesmo destino do bagaço de malte, que pode ser utilizado em rações animais (Aliyu e Bala 2011). O trub é responsável por grande parte da matéria orgânica formada pelas indústrias cervejeiras durante os processos fermentativos; e formas de utilização destes resíduos torna o processo menos poluidor e mais atrativo. No entanto, não têm sido encontrados muitos relatos da constituição e aplicação deste resíduo na literatura (Knob et al. 2013).

A casca de maracujá também foi capaz de induzir significativamente a produção de invertase intracelular do *A. aculeatus* (44,59 U/ml), e intra (4,54 U/ml) e extracelular (2,86 U/ml) do *T. longibrachiatum*. Segundo Pinheiro e colaboradores (2008), as cascas de maracujá apresentam uma abundante composição em carboidratos (21%), fibras solúveis (19%), insolúveis (38%) e proteínas (4%). Este alto teor de fibras provou que os resíduos das cascas de maracujá podem ser usados como uma matéria prima para a extração da pectina, que está altamente presente nas cascas (21,5%) (Rebello et al. 2007). Além disso, as cascas de frutas são ricas em dissacarídeos como maltose, frutose e sacarose que podem ser assimiladas por fungos como fonte de energia, fazendo-se desnecessária a síntese de enzimas complexas para a degradação de macromoléculas - como a lignina e a celulose (Putzke e Putzke 2002). Os derivados de quinoa também têm sido avaliados como um alimento com excelentes características nutricionais (Hirose et al. 2010). Neste estudo, o farelo de quinoa induziu significativamente a produção de invertase intracelular do *A. aculeatus* (40,59 U/ml), do *C. sitophila* (27, 91 U/ml) e também do *G. virens* (2,06 U/ml). Segundo Ando e colaboradores (2002) seus principais componentes são carboidratos (77,6%), proteínas (12,9%), uma ampla gama de aminoácidos (3,0%), lipídios (6,5%) e

também rico em fibras e polifenóis. Sendo assim, tanto a casca de maracujá quanto o farelo de quinoa revelaram-se como fontes de carbono adequadas para induzir a produção desta enzima.

A produção de biomassa celular pelos fungos para cada fonte de resíduos testados está apresentada na figura 5. A maioria dos resíduos lignocelulósicos utilizados proporcionou um bom crescimento para as linhagens por 5 dias de cultivo. Os maiores valores de biomassa foram encontrados em meio suplementado com farelo de soja para os fungos *G. virens* (41,30 mg/ml) e para o *A. fumigatus* (31,47 mg/ml), e em meio suplementado com farelo de quinoa (41,17 mg/ml) e farelo de soja (38,47 mg/ml) do *C. sitophila*. Valores significativos de biomassa também foram encontrados para o *T. longibrachiatum* na presença de trub (26,30 mg/ml) e para o *A. aculeatus* em casca de laranja (26,69 mg/ml). Entretanto todas as linhagens fúngicas quando crescidas com casca de arroz, e com casca de nozes para os fungos *C. sitophila*, *A. fumigatus* e *T. longibrachiatum* obtiveram uma menor quantidade de biomassa.

Conclusões

Pode-se concluir que todos os isolados estudados foram capazes de produzir pelo menos uma das dissacaridases. O fungo *A. aculeatus* exibiu grande potencial na produção de β -galactosidase na presença de casca de laranja como substrato indutor enquanto que a produção de invertase por este mesmo isolado utilizando o trub (resíduo cervejeiro), casca do maracujá e o farelo de quinoa apresentaram alta produção da enzima. O fungo *C. sitophila* também se destacou na produção invertásica em meio suplementado com farelo de quinoa. Assim, os fungos isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná podem ser considerados como promissores na produção de β -galactosidases e invertases, com destaque para a linhagem de *A. aculeatus*. Os resíduos agroindustriais como a casca de laranja e o trub mostraram-se fontes de carbono alternativas e baratas para o crescimento e desenvolvimento dos fungos, além de favorecer a produção enzimática dessas enzimas.

Referências

- Adam, A. C., Rubio-Teixeira, M., Polaina, J. (2004). Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 44, 553–7.
- Akinola, G.E., Adebayo-Tayo B., Olonila, O.T. (2012). Screening and production of β -galactosidase by *Trichoderma* Species. *Nature and Science*, 10(12), 265-270.
- Alegre, A. C. P., Polizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Guimarães, L. H. S. (2009). Production of thermostable invertases by *Aspergillus Caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 612-622.
- Aliyu, S. & Bala, M. (2011). Brewer's Spent grain: A review of its potentials and applications, *African Journal of Biotechnology*, 10(17), 324–331.
- Andjelkovic, U., Theisgen, S., Scheidt, H. A., Petkovic, M., Huster, D., Vujcic, Z. (2012). The thermal stability of the external invertase isoforms from *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the surface charge density. *Biochimie.*, 94, 510-515.
- Ando, H., Chen, Y., Tang, H., Shimizu, M., Watanabe, K., Mitsunaga, T. (2002). Food components in fractions of quinoa seed. *Food Science and Technology Research*, 8(1), 80–84.
- Ansari, S. A. & Satar, R. (2012). Recombinant β -galactosidases—past, present and future: A mini Review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
- Bailey, M., J. & Linko, M. (1990). Production of fl-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in submerged bioreactor cultivation. *Journal of Biotechnology*, 16, 57-66.
- Barroca, M. J., Guiné R. P. F., Pinto, A., Gonc, F. M. Alves Ferreira. D. M. S. (2006). Chemical and microbiological characterization of portuguese varieties of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 84(C2): 109–113. Doi: 10.1205/Fbp.05200
- Belcarz, A., Ginalska, G., Lobarzewski, J., Penel, C. (2002). The Novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (The properties and the conditions of production and purification). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594, 0-53.
- Bradford, M. M. A. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principlle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Briggs, D.E., Brookes, P., Boulton, C. (2004). Chemistry of wort boiling. in: Brewing science and practice. Ed. Stevens, R. Boca Raton, Crc Press, Cambridge, England. Woodhead Pub., 306-324.
- Brijwani, K. & Vadlani, P. V. (2011). Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. *Enzyme Research*, Doi:10.4061/2011/860134.
- Chen, J., Wang, Z., Wub, J., Wang, Q., Hub, X. (2007). Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 104, 268–275.
- Dashtban, M., Scharaft, H., Wensheng, Q. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues, opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6), 578-595.
- Flores-Gallegos, A. C., Castillo-Reyes, F., Lafuente, C. B., Loyola-Licea, J. C., Reyes-Valdés, M. H., Aguilar, C. N., Rodríguez Herrera, R. (2012). Invertase production by *Aspergillus* and *Penicillium* and sequencing of an inv gene fragment. *Micología Aplicada Internacional*, 24(1), 1-10.
- Giraldo, M. A., Silva, T. M., Salvato, F., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Guimaraes, L. H. S. (2012). Thermostable invertases from *Paecylomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World J Microbiol Biotechnol.*, 28, 463–472.
- Guimarães, L. H. S., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M., Jorge, J. A. (2007). Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 52–57.
- Guimarães, L. H. S., Somera, A. F., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M., Jorge, J. A. (2009). Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* Using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochemistry*, 44, 37–241.
- Hirose, Y., Fujita, T., Ishii, T., Ueno, N. (2010). Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan. *Food Chemistry*, 119, 1300–1306.
- Husain, Q. (2010). beta galactosidases and their potential applications: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 41–62.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2011). Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro, v. 38, (pp.1-97).
- Kadowaki, M. K., Simao, R. C. G., Da Conceição Silva, J. L., Osaku, C. A., Guimaraes, L. H. S. (2013). Biotechnological advances in fungal invertases. In: Biotechnological advances in fungal invertases. (Ed.), Crc Press, (pp. 1-30).
- Kausar, H. Sariah, M. Saud, H. M. Alam, M. Z Ismail. M. R. (2010). Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 594-600.
- Kim, S. B. Kim, E. Yoo, H Y Kang, M Kang, S. W. Park, C. Kim, J S Kim, S W. (2013) Reutilization of carbon sources through sugar recovery from waste Rice straw. *Renewable Energy*, 53, 43-48.
- Knob, A., Beitel, S.M., Fortkamp, D., Terrasan, C. R. F., Almeida, A. F. (2013). Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. *Biomed Research International*.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, (3).
- Madhan, S. S. R., Sathyavani, R., Niket, B. (2010). Production and partial purification of invertase using *Cympopogan caecius* leaf powder as substrate. *Journal Microbiology*, 50, 318-324.
- Mamma, D., Kourtoglou, E., Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, 99, 2373–2383.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 424-426.
- Mishra, A. (2012). The effect of wort boil time and trub on barley malt fermentability through the miniature fermentation method.
- Nuero, O. M. & Reyes, F. (2002). Enzymes for animal feeding from *penicillium chrysogenum* mycelial wastes from *Penicillum* manufacture. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 413-416.
- Niture, S. K. & Pant, A. (2004). Purification and biochemical characterization of polygalacturonase ii produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiological Research*, 159, (3), 305-314.

- Oliveira, C., Guimarães, P. M. R., Domingues, L. (2011). Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 29, 600–609.
- Pandey, A.K., Gaiad, S., Ali, A., Nain, L., (2009). Effect of bioaugmentation and nitrogen supplementation on composting of paddy straw. *Biodegradation* 20, 293-306.
- Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of beta-d-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 530–43.
- Panesar, P. S., Kumari, S., Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research*, 16, Doi:10.4061/2010/473137.
- Pedrolli, D. B., Gomes, E., Monti, R., Carmona, E. C. (2008). Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Berlin, 144(2), 191-200.
- Pinheiro, E. R., Silva, I. M.D.A., Gonzaga, L. V., Amante, E. R., Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., Amboni, R. D.M.C. (2008). Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 99, 5561–5566.
- Putzke, J., Putzke, M. T. L. (2002). Os Reinos dos Fungos. Vol. 2. (Ed.), Da Universidade de Santa Cruz Do Sul, Santa Cruz do Sul.
- Rashad, M. M. & Nooman, M. U. (2009). Production, purification and characterization of extracellular invertase from *Saccharomyces cerevisiae* nr1 y-12632 by solid-state fermentation of red carrot residue. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3), 1910-1919.
- Rebello, B. M., Moreno, S. R. F., Ribeiro, C. G., Neves, R. F., Da Fonseca, A. S., et al. (2007). Effect of a peel passion fruit flour (*Passiflora edulis F. flavicarpa*) extract on the labeling of blood constituents with technetium-99m and on the morphology of red blood cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 153-159.
- Rezzadori, K., Benedetti, S., Amante, E.R. (2012). Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 606–614.

- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J., Hirota, M. M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? implications for conservation. *Biological Conservation*, 142, 1141–1153.
- Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A., Domínguez, J. M. (2008). Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2380–2387.
- Rubio, M. C., Runco, R., Navarro, A. R. (2002). Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 61, 605–9.
- Sanchés, C. Lignocellulosic Residues: (2009). Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnological Advances*, 27(2), 185-194.
- Said, S. & Pietro, R. C. L. R. (2004). Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: *Enzimas como agentes biotecnológicos*. (Ed.), Legis Summa (pp. 1–7) São Paulo.
- Shankar, S.K., Mulimani, V.H. (2007). α -galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 958–961.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 205-218.
- Uma, C. Gomathi, D. Muthulakshmi, C. Gopalakrishnan. V.K. (2010). Optimization and characterization of invertase by *Aspergillus fumigatus* using fruit peel waste as substrate. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.
- Uma, C., Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Gopalakrishnan, V. K. (2012). Production and properties of invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SMF using pomegranate peel waste as substrate. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1-7.
- Vitolo, M. In: Said, S. & Pietro, R. C. L. R. (2004). *Enzimas como agentes biotecnológicos*, (Ed.), Legis Suma, (pp. 207-221). São Paulo.
- Wang, S. L., Yen, Y.H., Shih, I.L., Chang, A. C., Chang, W.T., Wu, W.C., Chai, Y.D. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 917–925.
- Watchararuji, K., Goto, M., Sasaki, M., Shotipruk, A. (2008). Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technology*, 99, 6207–6213.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and application. Academic Press.

FIGURAS

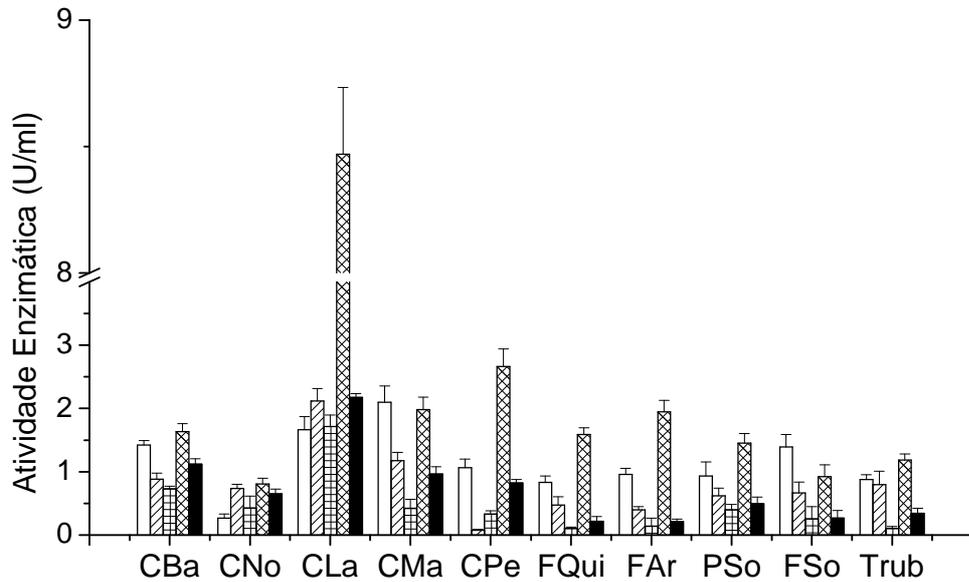


Figura 1 Produção de β -galactosidase extracelular pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*, *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAR palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

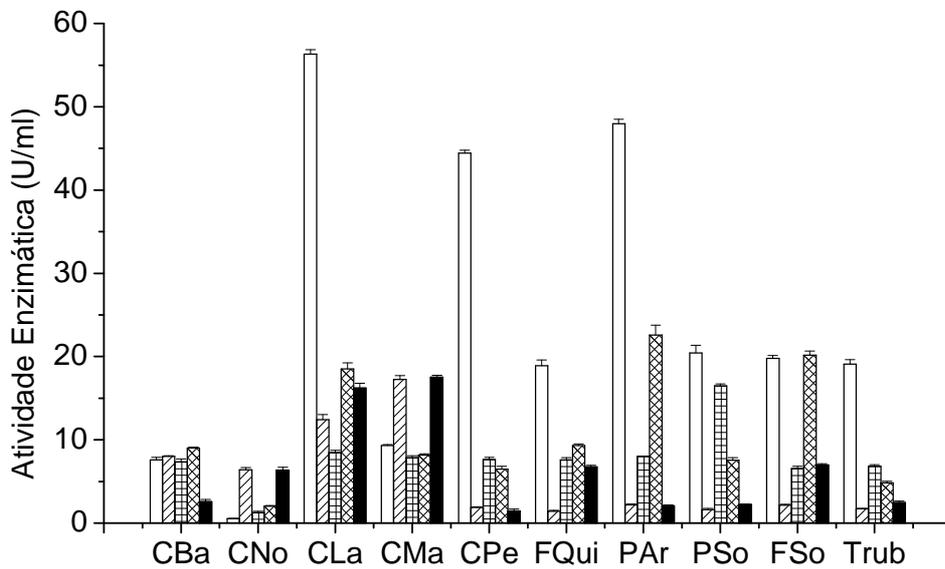


Figura 2 Produção de β -galactosidase intracelular pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*, *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAR palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

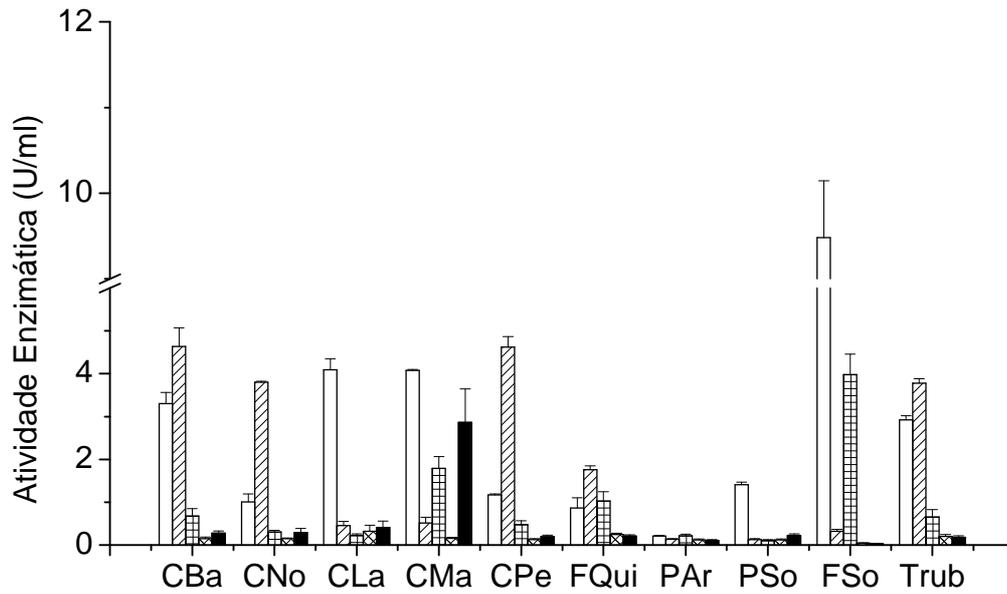


Figura 3 Produção de invertase extracelular pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*; *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAr palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

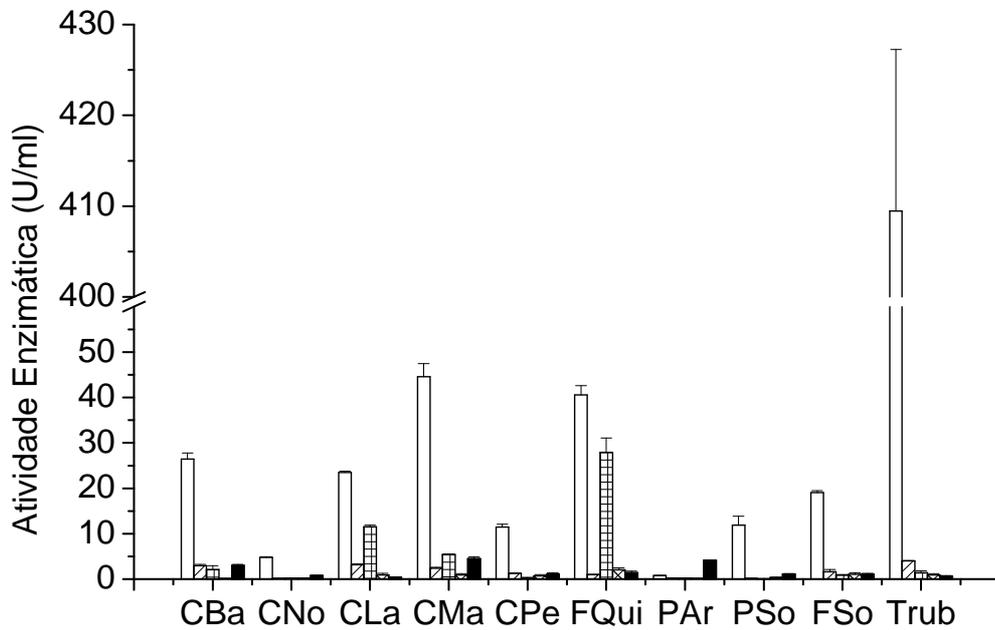


Figura 4 Produção de invertase intracelular pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*; *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAr palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

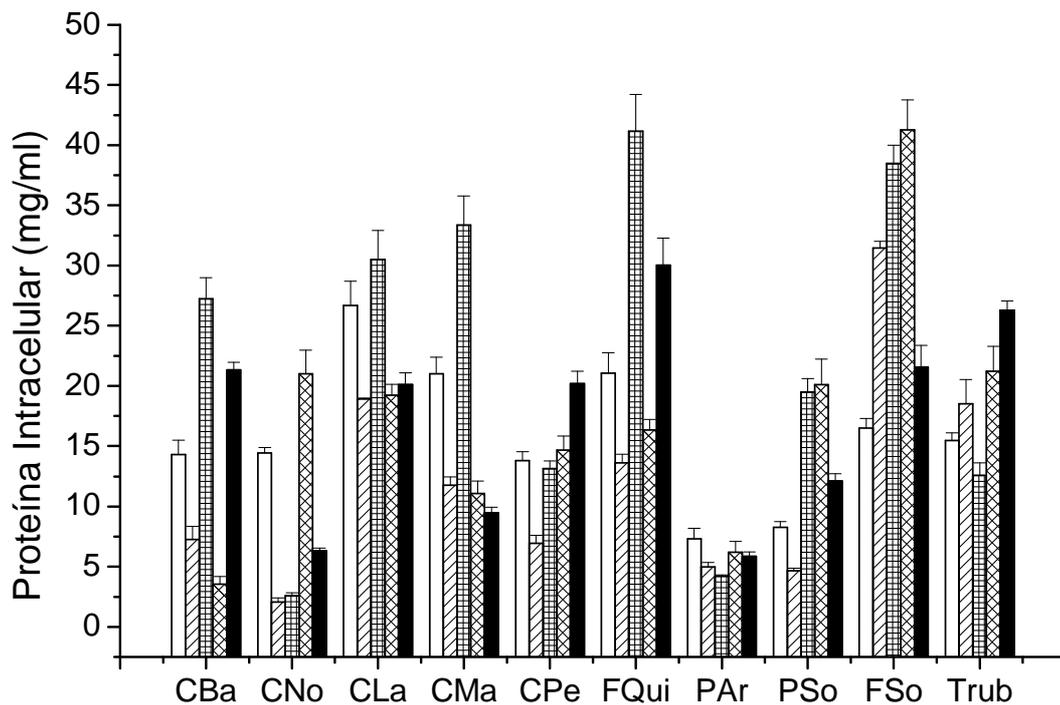


Figura 5 Produção de biomassa celular dos fungos filamentosos suplementados com diferentes resíduos agroindustriais em cultivo líquido. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*, *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAr palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

CAPITULO 2:

Potencial biotecnológico de fungos isolados da Mata Atlântica: Produção de complexos multienzimáticos

Diandra de Andrades², Marina Kimiko Kadowaki^{1,2}

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Rua Universitária 2069, Jardim Universitário, 85819-110 Cascavel, PR, Brasil

2. Autor para correspondência: marinakk@gmail.com

Resumo

Este trabalho objetivou investigar a habilidade de produção de enzimas hidrolíticas por cinco fungos recentemente isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono. A maior produção de xilanase extracelular foi obtida com o *Trichoderma longibrachiatum* utilizando palha de sorgo (22,38 U/ml) e casca de maracujá (15,10 U/ml). Enquanto que os valores mais elevados de β -xilosidase intracelular foram obtidos na presença de palha de sorgo com o *T. longibrachiatum* (7,54 U/ml), seguido do *Aspergillus aculeatus* e *Crysonilia sitophila* com casca de laranja (5,04 e 4,60 U/ml, respectivamente). A casca de laranja também foi destaque na indução de celulase extracelular por *A. fumigatus* (0,53 U/ml). No entanto, os maiores valores de atividade de β -glicosidase intracelular foram obtidos com a casca de maracujá (192,2 U/ml), casca de banana (164,11 U/ml) e farelo de quinoa (158,01 U/ml) pelo *A. aculeatus*. A atividade pectinásica extracelular também foi significativa quando *A. fumigatus* (45,95 U/ml) e *T. longibrachiatum* (26,43 U/ml) foram crescidos com casca de laranja. Portanto, os fungos isolados da Mata Atlântica do Oeste do Paraná podem ser considerados promissores na produção de enzimas de aplicação industrial utilizando resíduos encontrados facilmente e em abundância no Brasil. Além disso, vários resíduos foram capazes de induzir a produção de enzimas hidrolíticas e conseqüentemente, será capaz de diminuir custo de cultivo e evitar problemas ambientais.

Palavras chave: complexo celulolítico, complexo xilanolítico, Mata Atlântica, Resíduos agroindustriais e pectinase

Abstract

This study aimed to investigate the ability of producing hydrolytic enzymes for five fungi recently isolated Atlantic Forest of Western Paraná using different agroindustrial residues as carbon source. The highest production of extracellular xylanase was obtained with *Trichoderma longibrachiatum* using sorghum straw (22.38 U/ml) and passion fruit peel (15.10 U/ml). Whereas higher amounts of intracellular β -xylosidase were obtained in the presence of sorghum straw with *T. longibrachiatum* (7.54 U/ml), followed by *A. aculeatus* and *Crysonilia sitophila* to orange peel (5.04 and 4.60 U/ml, respectively). The orange peel is also highlighted in the induction of extracellular cellulase by *A. fumigatus* (0.53 U/ml). However, the highest values of activity of intracellular β -glucosidase were obtained with passion fruit peel (192.2 U/ml), banana peel (164.11 U/ml) and quinoa bran (158.01 U/ml) by *A. aculeatus*. The extracellular pectinase activity was also significant when *A. fumigatus* (45.95 U/ml) and *T. longibrachiatum* (26.43 U/ml) were grown with orange peel. Thus, fungi isolated from the Atlantic Forest of Paraná can be considered promising for the production of enzymes for industrial application using agro-industrial residues found easily and abundantly in Brazil. In addition, several residues were capable of inducing the production of hydrolytic enzymes and thus be able to reduce the cost of growing and avoid environmental problems.

Keywords: Agro-industrial residues, Atlantic forest, cellulolytic complex, pectinase xylanolytic complex

1. Introdução

O Brasil é um país com intensa atividade agrícola, e como consequência, abundantes quantidades de subprodutos agrícolas ou agroindustriais são geradas [1]. Atualmente, estes materiais são aproveitados somente na geração de energia elétrica ou simplesmente queimada no campo. Uma das possibilidades promissoras de utilização dos resíduos que vem sendo muito pesquisada nos últimos anos é a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol por microrganismos [2], [3], e [4]. A conversão desses resíduos em produtos de valor agregado como produção de bioativos por microrganismos é a possibilidade de contribuir com a remoção desses poluentes ambientais. Além de trazer benefícios por gerar produtos aproveitáveis pelas indústrias em diferentes setores, como nas áreas têxtil, farmacêutica, alimentos e de ração.

Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são a celulose, hemicelulose e lignina, que são compostos orgânicos mais abundantes na terra com potencial para produzir fonte renovável de energia e produtos químicos. A produção global de biomassa lignocelulósica é na ordem de 1×10 toneladas ao ano [5]. Dentro desse contexto, os fungos são os organismos predominantemente eficazes na degradação dessa biomassa lignocelulósica pela habilidade em produzir várias enzimas que despolimerizam substratos de diferentes complexidades e em consequência agir sinergicamente para degradar a biomassa da planta [6].

A celulose encontrada nesses resíduos lignocelulósicos é constituída de polímeros lineares com ligações β -1,4 de resíduos de D-glicose. Este polímero é degradado pelas celulases secretadas por microrganismos, denominados de complexos multi-enzimáticos formados por três principais enzimas, as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolases ou exoglucanases (E.C. 3.2.1.91) e celobiasas ou β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) [7]. O segundo polímero mais abundante da parede celular, o xilano é constituído de uma estrutura de xilose linear com ligações β -1,4 que podem ser substituídos por cadeias laterais de açúcares adicionais [6]. Assim, enzimas do complexo xilanolítico são requeridas para despolimerização do heteropolissacarídeo, que são as endo-1,4- β -xilanases (E.C. 3.2.1.8) e a β -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), responsáveis pela clivagem da cadeia principal do xilano. Além disso, acetil esterases (E.C. 3.1.1.6), α -D-glucuronidases (E.C. 3.2.1.1), e α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55) são requeridas para hidrolisar as cadeias laterais do xilano [8]. As enzimas pectinolíticas ou pectinases responsáveis pela hidrólise de

pectinas que são encontradas na parede celular, que inclui pectina metilesterase (E.C. 3.1.11.1), endo-poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15), exopolygalacturonase (E.C. 3.2.1.67), pectato liase (E.C. 4.2.2.2) exo-pectato liase (E.C. 4.2.2.9) e endopectina liase (E.C. 4.2.2.10) [9], [10] e [11].

No Brasil são encontrados vários tipos de biomas, e entre esses o bioma da Mata Atlântica, constituído de alta diversidade biológica com ambiente propício para desenvolvimento de vários organismos. O bioma da Mata Atlântica ocupa aproximadamente 13% do território brasileiro formado por complexas cadeias de montanhas, vales, planaltos e planícies. Devido à escassez de estudos sobre a diversidade de fungos da Mata Atlântica do Paraná, o foco do presente trabalho foi investigar a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos recentemente isolados da Mata Atlântica da região oeste do Paraná em resposta a diferentes resíduos agroindustriais. Dentro desse contexto, a produção de enzimas do complexo celulolítico, xilanolítico e pectinolítico produzidas pelas cinco espécies de fungos: *Aspergillus aculeatus*, *Gliocadium virens*, *Crysonilia sitophila*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichoderma longibrachiatum* em cultivos líquido utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono foi investigada.

2. Material e Métodos

2.1 Isolamento e Identificação dos fungos

As linhagens de fungos utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de amostras de solo ou de decomposição de matéria orgânica (folhas, caule e raiz) da Mata Atlântica na Reserva Biológica Bela Vista de Itaipu, localizada em Foz do Iguaçu, Paraná - Brasil. Aproximadamente 5 g de solo ou de pedaços de madeira em decomposição (comprimento de 10 e 20 mm) foram transferidos para placas contendo um meio de batata-dextrose-ágar (BDA) com cloranfenicol e incubados a 28°C ou 43°C durante 72-120 horas. Após a incubação, cada isolado purificado foi transferido para placa com meio de BDA fresco. A identificação morfológica dos fungos foi realizada pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, PE-Brasil. As estirpes selecionadas foram em seguida mantidas em tubos contendo meio BDA a 4°C. A extração de DNA genômico dos fungos foi realizada utilizando a metodologia descrita por White et al. [12]. O fragmento de DNA da região ITS

foi amplificada com o par de oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' direto) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' reverso). Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1,0% Tris-acetato-EDTA (agarose 1,0%, 0,04 M Tris-acetato e 1 mM EDTA), e revelados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação UV. A purificação dos produtos de PCR e a determinação das seqüências utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 foram realizadas pela empresa Helixxa® (Campinas-SP, Brasil). As seqüências determinadas (ITS1, ITS2 e 5.8S) foram comparadas com outras seqüências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando a ferramenta básica de alinhamento local (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> website). As identificações taxonômicas obtidas em nível de espécies dos fungos foram: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Gliocadium virens*, *Crysonilia sitophila*, e *Trichoderma longibrachiatum*.

2.2 Condições de cultivo e obtenção da enzima

Cinco isolados foram selecionados (*Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Gliocadium virens*, *Crysonilia sitophila* e *Trichoderma longibrachiatum*) entre os isolados fúngicos que mostraram um halo de hidrólise para atividade celulásica e xilanásica. Posteriormente, cada isolado fúngico foi inoculado em meio líquido Czapek [13] suplementado com 1% de diferentes resíduos agroindustriais como fontes de carbono: Casca de banana, casca de laranja, casca de maracujá, casca de nozes, casca de pera, farelo de quinoa, farelo de soja, palha de arroz, palha de sorgo e trub (a camada de sedimentos que aparece no fundo do fermentador, no processo de produção da cerveja). Estes resíduos foram utilizados diretamente para o processo de fermentação, sem qualquer pré-tratamento. Após o inóculo de 1 ml da solução de esporos (10^5 esporos/ml) as culturas dos fungos mesofílicos *A. aculeatus*, *C. sitophila* e *G. virens* foram incubados (incubadora tipo B.O.D.) a 28°C, enquanto os fungos termotolerantes *A. fumigatus* e *T. longibrachiatum* (estufa bacteriológica) a 42°C, durante 5 dias. As culturas foram obtidas por filtração à vácuo, utilizando papel de filtro, o filtrado (extrato bruto) foi utilizado para a quantificação da atividade enzimática extracelular. Os micélios foram rompidos por maceração em almofariz de porcelana com areia tratada na proporção de 1:1, ressuspensão em água destilada gelada e centrifugado a 6000 rpm durante 5 min. O sobrenadante obtido

foi denominado de extrato bruto intracelular e utilizado para determinar a atividade intracelular da enzima.

2.3 Dosagens enzimáticas

2.3.1 Xilanase: A atividade xilanásica foi dosada através da análise dos açúcares redutores liberados a partir da hidrólise do xilano de “beechwood”. A mistura de reação continha 0,9 ml de 1% (w/v) de xilano de beechwood (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0) e 0,1 ml de solução de enzima adequadamente diluída. A mistura foi incubada a 40°C durante 10 min e a quantidade de açúcares redutores liberados foi determinado pelo método de Miller [14] pela adição do ácido dinitrossalicílico (DNS). Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de D-xilose por minuto sob as condições de ensaio padrão.

2.3.2 β -xilosidase: A atividade da β -xilosidase foi estimada usando p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNPX) como substrato. A mistura consistiu de 500 μl de pNPX (2 mM) preparado em 50 mM de tampão acetato de sódio pH 6,0 e 100 μl da solução da enzima. A reação foi incubada a 50°C por um máximo de 60 min e foi parada por adição de 2 ml de solução saturada de tetraborato de sódio, quantificada a 410 nm. Uma unidade da atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto.

2.3.3 Endoglucanase: A atividade de CMCase foi realizada através da mistura de reação de 0,9 ml de 1% (w/v) de carboximetilcelulose (CMC) (tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,5) e 0,1 ml de solução de enzima diluída adequadamente. A mistura foi incubada a 40°C durante 30 min. A quantidade de açúcares redutores foi determinada com a adição de ácido dinitrossalicílico (DNS) pelo método de Miller [14]. Uma unidade de atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto nas condições de ensaio padrão.

2.3.4 β -Glicosidase: A atividade β -glicosidásica foi estimada usando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) como substrato. A mistura consistiu de 500 μl de pNPG (2 mM) em 50 mM de tampão acetato de sódio pH 4,5 e 100 μl da enzima incubada a 50°C por um tempo máximo de 60 min. A reação foi parada com a adição de 2 ml de 0,1 M Na_2CO_3 e quantificado a 410 nm. Uma unidade de atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto.

2.3.5 Pectinase: A atividade pectinásica foi realizada através da mistura de reação de 0,9 ml de 1% (w/v) de pectina cítrica (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0) e 0,1 ml de solução da enzima diluída adequadamente. A mistura foi incubada a 40°C durante 20 min e a quantidade de açúcares redutores liberados foi determinado pelo método de Miller [14]. Uma unidade de atividade da pectinase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores por minuto sob as condições de ensaio padrão.

2.4 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças significativas entre as médias das atividades enzimáticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey com o auxílio do software SAEG, versão 9.1., em nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1 Influência de resíduos agroindustriais na produção de xilanase extracelular pelos fungos

A palha de sorgo foi o resíduo lignocelulósico que mais se destacou entre as dez fontes de carbono testadas para a produção de xilanase para as linhagens fúngicas. Os maiores valores de atividade xilanásica extracelular foram obtidos na presença deste substrato com os fungos *T. longibrachiatum* (22,38 U/ml), *A. fumigatus* (11,77 U/ml), *A. aculeatus* (6,67 U/ml) e *C. sitophila* (2,70 U/ml) (Figura 1). O *T. longibrachiatum* deste trabalho exibiu valores superiores de xilanase extracelular em relação ao *T. harzianum rifai* na presença de bagaço de cana em cultivo no estado sólido (15 U/ml) [15] ou por *T. reesei* SAF3 em cultura submersa utilizando xilano como substrato (4,75U/ml) [16]. Até o momento, não foram encontrados na literatura produção de xilanase com os fungos dos gêneros *Gliocadium* e *Chrysonilia*, porém as espécies de *A. niger*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* e *T. koningii* têm sido utilizados como fontes comerciais de xilanases pelas indústrias [17].

Várias xilanases produzidas por microrganismos tem sido induzidas com substratos comerciais como o glucuronoxilano de bétula (birchwood xylan) e o de faia (beechwood xylan), porém devido ao seu alto custo a sua utilização para a produção em larga escala da

xilanase se torna inviável. Este fato incentiva a utilização de resíduos agrícolas como o farelo de trigo, farelo de arroz, casca de arroz, serragem e feno como substratos alternativos para a produção desta enzima [18]. A palha de sorgo é também um resíduo lignocelulósico oriundo do cultivo do sorgo (*Sorghum bicolor*). Atualmente este grão é o quinto cereal mais produzido no mundo, com produção estimada em 64 milhões de toneladas em 2014 [19]. No Brasil, a produção de sorgo gera cerca de 7,8 toneladas de resíduo por hectare plantado a cada safra [20]. Segundo Vázquez e seus colaboradores [21] a palha de sorgo é composta por aproximadamente 35% de celulose, 24% de hemiceluloses e 25% de lignina.

A casca de maracujá também foi capaz de induzir significativamente a produção de xilanase extracelular do *T. longibrachiatum* (15,10 U/ml), e do *G. virens* (13,79 U/ml) (Figura 1). Segundo Pinheiro e colaboradores [22], a casca de maracujá apresenta abundante composição em carboidratos (21%), fibras solúveis (19%), fibras insolúveis 38% (celulose, lignina e porções de hemicelulose) e proteínas (4%). O Brasil é o maior produtor de maracujá, e tem exportado para países como, Reino Unido, França, Bélgica, Alemanha e Países Baixos [23]. As indústrias utilizam a polpa de maracujá para produção de sucos e como consequência geram enormes quantidades de subprodutos como cascas e sementes que representam 60% dos frutos, rotineiramente descartados como resíduos sólidos de elevada carga orgânica que inevitavelmente poluem o meio ambiente se não existir uma destinação correta [24]. Portanto, a utilização destes subprodutos como fontes de carbono para produção de enzimas por microrganismos se torna viável e vantajoso, assim como sua utilização como matéria prima para produção de compostos bioativos [25], probióticos [26] e produção de pectina [27].

3.2 Produção de β -xilosidase pelos fungos na presença de resíduos agroindustriais

Os maiores valores de atividade de β -xilosidase intracelular foram encontrados na presença da palha de sorgo com o fungo *T. longibrachiatum* (7,54 U/ml), seguido por *A. aculeatus* e *C. sitophila* quando crescidos com casca de laranja (5,04 e 4,60 U/ml), respectivamente (Figura 2A). Enquanto que a produção de β -xilosidase extracelular foi induzida por vários resíduos, tais como a casca de laranja, casca de banana, trub e casca de pera com o fungo *A. aculeatus*, as atividades enzimáticas variaram de 3,62 a 5,82 U/ml (Figura 2B). O *G. virens* também produziu β -xilosidase extracelular na presença de casca de laranja (2,75

U/ml). Estes resultados demonstram que esses resíduos lignocelulósicos contêm na sua composição importantes indutores da biossíntese de β -xilosidase desses fungos. Muitas vezes as diferenças nos valores de atividades enzimáticas observadas se devem à composição distinta dos resíduos e também de acessibilidade aos substratos [28]. De acordo com Oliveira e seus colaboradores [29], a porcentagem de hemicelulose presente em cada substrato é um fator muito importante para a indução de enzimas xilanolíticas. Além disso, a produção de β -xilosidase pelas linhagens estudadas neste trabalho foi superior em relação a valores de atividades enzimáticas de β -xilosidase produzidas por outros fungos, a exemplo do *A. awamori* crescido em bagaço de cana com 1,3 U/ml [30], do *Penicillium sclerotiorum* em farelo de trigo (1,24 U/ml) e farelo de aveia (0,24 U/ml) [31].

3.3 Influência de resíduos agroindustriais na produção de celulase extracelular pelos fungos

Os valores mais elevados de atividade de celulase extracelular foram obtidos quando *A. fumigatus* foi crescido na presença de casca de laranja (0,53 U/ml) (figura 3). Bico e Mustata [32] descreveram que as cascas de laranja apresentam 14,4% de celulose, 10,9% de hemicelulose, 1,33% de lignina, e 28,7% de pectina solúvel. Essas fibras solúveis e insolúveis encontradas nas cascas de laranja devem influenciar na indução da celulase desses fungos. Os fungos *A. aculeatus* (0,45 U/ml) e *T. longibrachiatum* (0,29 U/ml) também apresentaram atividades enzimáticas significativas com a casca de laranja. Além disso, o Brasil por ser o maior produtor de laranja do mundo, com 19 milhões de toneladas e 21% da produção mundial em 2009 [33], tem como consequência geração de grandes quantidades de resíduos pelas indústrias processadoras de sucos [34] e [35]. Assim, a utilização de cascas de laranja como fonte de carbono na produção de enzimas por microrganismos é uma excelente destinação para eliminar estes resíduos [36] e [37].

Os valores de atividades celulásicas obtidas com as linhagens deste estudo ainda foram superiores às produzidas por outros fungos como *A. flavus* com serragem (0,0743 U/ml), bagaço (0,0573 U/ml) e sabugo de milho (0,0502 U/ml) [38], o *A. niger* MS82 com grama (0,11 U/ml), sabugo de milho (0,35 U/ml) e bagaço de milho (0,31 U/ml) [39]. Do mesmo modo, o *T. koningii* D-64 produziu 0,4 U/ml de CMCase com farelo de trigo [40],

enquanto que *T. reesei* Rut C-30 em cultivo utilizando uma mistura de celulose com polpa de beterraba (1:1) pré-tratada obtiveram 0,49 U/ml de endoglucanase [41]. Segundo Azin e seus colaboradores [42] as espécies do gênero *Trichoderma* são conhecidas como bons produtores de enzimas lignocelulolíticas.

3.4 Produção de β -glicosidase por fungos na presença de resíduos agroindustriais

O *A. aculeatus* foi o fungo que se destacou na produção de β -glicosidase extracelular entre os cinco fungos deste estudo na presença de resíduos agroindustriais. Os resíduos que induziram significativamente a produção de β -glicosidase extracelular foram: casca de laranja (23,28 U/ml), casca de banana (18,55 U/ml) e trub (14,04 U/ml). O *A. fumigatus* também exibiu atividade beta glicosidásica na presença de trub (6,81 U/ml) e casca de laranja (3,81 U/ml) (Figura 4B). Joo e colaboradores [43] obtiveram β -glicosidase extracelular com *Penicillium pinophilum* utilizando palha de arroz (3,2 U/ml), enquanto que o *Monascus purpureus* NRRL1992 produziu 1,68 U/ml em fermentação submersa com resíduos de uva [44].

Entretanto, os valores de atividade β -glicosidásica intracelular dos fungos desse estudo foram superiores em relação às atividades extracelulares. Do mesmo modo, o fungo *A. aculeatus* se destacou novamente como produtor de β -glicosidase intracelular (Figura 4A). Os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos com a casca de maracujá (192,2 U/ml), casca de banana (164,11 U/ml), farelo de quinoa (158,01 U/ml) e casca de laranja (135,82 U/ml). Segundo Jaramillo e seus colaboradores [45], a casca de maracujá é uma fonte de carbono adequada para o crescimento de fungos e produção de enzimas devido a sua rica composição em pectina. A casca de banana também foi um resíduo promissor, induzindo a produção de β -glicosidase intracelular do *A. aculeatus* e do *T. longibrachiatum* (6,10 U/ml). Este resíduo é composto por 60,2% de carboidratos, 8,1% de proteínas e 8,2% de fibras [46]. Em adição, os fungos *C. sitophila* e *A. fumigatus* também produziram a β -glicosidase intracelular na presença de palha de sorgo (8,38 U/ml) e farelo de soja (8,37 U/ml), respectivamente (Figura 4A).

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que as linhagens do gênero *Aspergillus* foram mais promissoras entre as espécies estudadas neste trabalho. Além disso, os valores de atividade de β -glicosidasas obtidos por essas linhagens estudadas foram superiores em relação aos fungos *A. niger* e *T. reesei* cultivados com farelo de trigo (2,84 e

0,22 U/ml) [2]. Segundo Mrudula e Murugammal (47) os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são conhecidos como bons produtores de celulases. Embora o gênero *Trichoderma* seja um bom produtor de exo e endoglucanases, o mesmo não acontece para as β -glicosidases deste fungo, entretanto, os fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir eficientemente grandes quantidades dessa enzima [48].

3.5 Influência de resíduos agroindustriais na produção de pectinase extracelular por fungos

As atividades pectinolíticas extracelulares foram notavelmente superiores na presença de casca de laranja para os fungos *A. fumigatus* e *T. longibrachiatum* com 45,95 U/ml e 26,43 U/ml, respectivamente. Observou-se que o fungo *C. sitophila* também exibiu produção significativa com farelo de soja (19,95 U/ml) (Figura 5). A atividade máxima obtida pelo *A. fumigatus* deste trabalho foi semelhante à encontrada para *A. oryzae* CCT3940 quando cultivado em fermentação submersa com farelo de trigo e pectina como indutores, que atingiu uma atividade exo-poligalacturonásica de 45 U/ml [49]. Similarmente, Patil e Dayanand [50] obtiveram também atividades de endopectinase (18,9 U/ml) e exopectinase (30,6 U/ml) em fermentação submersa utilizando resíduos de girassol suplementado com 4% de glicose e palha de grama com o *A. niger* DMF 27. Produção de endo-poligalacturonase (0,70 U/ml), exo-poligalacturonase (8,90 U/ml) e pectina liase (41,30 U/ml) também são relatadas com *Penicillium viridicatum* RFC3 utilizando fermentação em estado sólido com mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1) [51].

Vários tipos de cascas de frutas têm sido utilizados como fontes indutoras de pectinase por outros fungos como o *A. niger* e *T. viride* que produziram 1,27 U/ml e 9,01 U/ml, respectivamente, quando crescidos com polpas cítricas [52]. Porém os valores encontrados neste trabalho superam os dados obtidos por estas outras linhagens citadas.

5. Conclusões

Pode-se concluir que o fungo *T. longibrachiatum* e *C. sitophila* possuem grande potencial para produção de xilanase extracelular induzidos por palha de sorgo e casca de maracujá. Coincidentemente, o melhor produtor de β -xilosidase intracelular também foi o fungo *T. longibrachiatum* utilizando palha de sorgo como substrato, entretanto, a produção de β -

xilosidase extracelular foi induzida com cascas de laranja, banana e trub por *A. aculeatus*. O *A. fumigatus* exibiu uma expressiva produção de celulase e pectinase extracelular utilizando casca de laranja. Porém, dentre as cinco espécies de fungos, o *A. aculeatus* foi o maior produtor de enzimas deste estudo, principalmente de β -glicosidases intra e extracelular. Os resíduos que induziram eficientemente a biossíntese da β -glicosidase intracelular do *A. aculeatus* foram casca de maracujá, casca de banana e farelo de quinoa, e para produção de β -glicosidase extracelular as cascas de laranja e de banana. Portanto, vários resíduos agroindustriais testados neste estudo exibiram eficácia como fontes de carbono para crescimento desses fungos, além de promover a indução de enzimas de interesse biotecnológico, conseqüentemente, isso pode contribuir com a diminuição do custo de cultivo e evitar problemas ambientais pela disposição inadequada destes resíduos.

6. Referencias

- [1] Graminha EBN, Gonçalves AZL, Pirota RDPB, Balsalobre MAA, Da Silva R, Gomes E. Review: Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition Anim Feed Sci Technol 2008;144:1–22.
- [2] Sukumaran RK, Singhanian RR, Mathew GM, Pandey A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. Renew. Energy 2009;34:421–424.
- [3] Delabona PS, Farinas CS, da Silva MR, Azzoni SF, Pradella JG. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. Bioresour Technol. 2012;107:517–21.
- [4] Sharma M, Kumar A. Xylanases: An Overview. Brit Biotechnol J. 2013;3(1):1-28.
- [5] Smeets EMW, Faaij APC, Lewandowski IM, Turkenburg WC. A bottom-up assessment and review of global bio-energy potentials to 2050. Prog Energ Combust Sci. 2007;33:56-106.
- [6] Ahmed S, Riaz S, Jamil A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. Appl Microbiol Biotechnol 2009; 84:19–35.
- [7] Sales MR, Moura RB, Silva MF, Macedo GR, Porto ALF. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species. Ann Microbiol 2011;61:917–924.
- [8] Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JÁ, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol 2005;67:577–591.
- [9] Soares MMCN, Silva R, Carmona EC, Gomes E. Pectinolytic enzymes production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. World J Microbiol Biotechnol 2001;17:79-82.
- [10] Gummadi SN, Panda T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. Process Biochem 2003;38:987-996.
- [11] Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochem 2005;40:2931-2944.
- [12] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and application. Academic Press. 1990

- [13] Wiseman A. Handbook of Enzyme Biotechnology. Ltd John Wiley & Sons, editors, 1975, pp. 148.
- [14] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the production of reducing sugar's. *Analyt. Chem* 1959;31:426-620.
- [15] Rezende MI, Barbosa; AM, Vasconcelos AFD, Endo AS. Xylanase production by *Trichoderma harzianum rifai* by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002;33:67-72.
- [16] Kar S, Mandal A, Mohapatra PK, Mondal KC, Pati BR. Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Braz. J. Microbiol* 2006;37:462-464.
- [17] Girio FM, Fonseca C, Carneiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lucasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol* 2010;101:4775-4800.
- [18] Bajaj BK, Manhas K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatal Agric Biotechnol* 2012;1:330–337.
- [19] FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Coarse Grains. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/ai466e/ai466e04.htm>>. Acessado em janeiro de 2014.
- [20] Rodrigues JAS, Santos FG, Schaffert RE, Ferreira AS, Casela CR, Tardin FD. Técnica Circular, Embrapa Milho e Sorgo, 2008:107.
- [21] Vázquez M, Oliva M, Téllez-Luis SJ, Ramírez JA. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresour Technol* 2007;98:3053–3060.
- [22] Pinheiro ER, Silva IMDA, Gonzaga LV, Amante ER, Teófilo RF, Ferreira MMC, Amboni RDMC. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresour Technol* 2008; 99:5561–5566.
- [23] Embrapa. Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. From: http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p¼pesquisa-culturas_pesquisadasmaracuja.php&menu.
- [24] Salgado JM, Bombarde TAD, Mansi DN, Piedade SMS, Meletti LMM. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic mice. *Ciênc Tecnol Aliment* 2010;30:784-789.

- [25] Yapo BM. Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *J Agr Food Chem* 2009;57:1572-1578.
- [26] Do Espírito Santo AP, Perego P, Converti A, Oliveira MN. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. *Food Sci. Technol* 2012, 47:393-399.
- [27] Seixas FL, Fukuda DL, Turbiani FRB, Garcia PS, Petkowicz CLDeO, Jagadevan S, Gimenes ML. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids* 2014;38:186-192.
- [28] Knob A, Beitel SM, Fortkamp D, Terrasan CRF, Almeida AF. Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. *Biomed Res Int* 2013, Article ID 728735, 8.
- [29] Oliveira LA, Porto ALF, Tambourgi EB. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresour Technol* 2005; 97:862-867.
- [30] Lemos JLS, Bon EPS, Santana MdeFE, Junior NP. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. *Braz J Microbiol* 2000;31:206-211.
- [31] Knob A, Carmona EC. Cell-associated acid β -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. *N Biotechnol* 2009;26(1-2):60-67.
- [32] Bicu I, Mustata F. Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresour Technol* 2011;102:10013–10019.
- [33] Citrusbr. Produção de laranja e suco. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp>>. Acesso em 02 jul. 2014.
- [34] Wilkins MR, Widmer WW, Grohmann K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Proc Biochem* 2007;42:1614–1619.
- [35] Rezzadori K, Benedetti S, Amante ER. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. *Food Bioprod Process* 2012;90:606–614.
- [36] Rivas B, Torrado A, Torre P, Converti A, Domínguez JM. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *J Agric Food Chem* 2008;56:2380–2387.
- [37] Siles JA, Li Q, Thompson I. Biorefinery of waste orange peel. *Crit Rev Biotechnol* 2010; 30(1): 63–69.

- [38] Ojumu TV, Solomon BO, Betiku E, Layokun SK, Amigun B. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in saw dust, bagasse and corn cob. Afr. J. Biotechnol. 2003;2:150–152.
- [39] Sohail M, Siddiqui R, Ahmad A, Khan SA. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. New Biotechnol 2009;6:437–441.
- [40] Wang Z, Ong HX, Geng A. Cellulase production and oil palm empty fruit bunch saccharification by a new isolate of *Trichoderma koningii* D-64. Process Biochem 2012;47:1561-1571.
- [41] Olsson L, Christensen TMIE, Hansen KP, Palmqvist EA. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme Microb Tech 2003;33:612–619.
- [42] Azin M, Moravej R, Zareh D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. Enzyme Microb Tech 2007;40:801–805.
- [43] Joo A-R, Jeya M, Lee K-M, Lee K-M, Moona H-J, Kim Y-S, Lee J-K. Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. Process Biochem 2010;45:851–858.
- [44] Daroit DJ, Silveira ST, Hertz PF, Brandelli A. Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. Process Biochem 2007; 42:904–908.
- [45] Jaramillo PMD, Gomes HÁ, De Siqueira RFG, Homem-de-Mello M, Filho EXF, Magalhães PO. Liquid–liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system. Sep Purif Technol 2013;120:452–457.
- [46] Karthikeyan A, Sivakumar N. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. Bioresour Technol 2010;101:5552–5556.
- [47] Mrudula S, Murugammal, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. Braz J Microbiol 2011;42:1119-1127.
- [48] Flachner B, Reczey K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. Chem Biochem Eng Q 2004;18(3):303–307.
- [49] Malvessi E, Da Silveira MM. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Braz arch biol technol 2004;47:693-702.

- [50] Patil SR, Dayanand A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresour Technol* 2006; 97:2054–2058.
- [51] Silva D, Tokuioshi K, Martins ES, Da Silva R, Gomes E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochem* 2005;40:2885–2889.
- [52] De Gregorio A, Mandalari G, Arena N, Nucita F, Tripodo MM, Lo Curto R.B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresour Technol* 2002;83:89–94.

FIGURAS

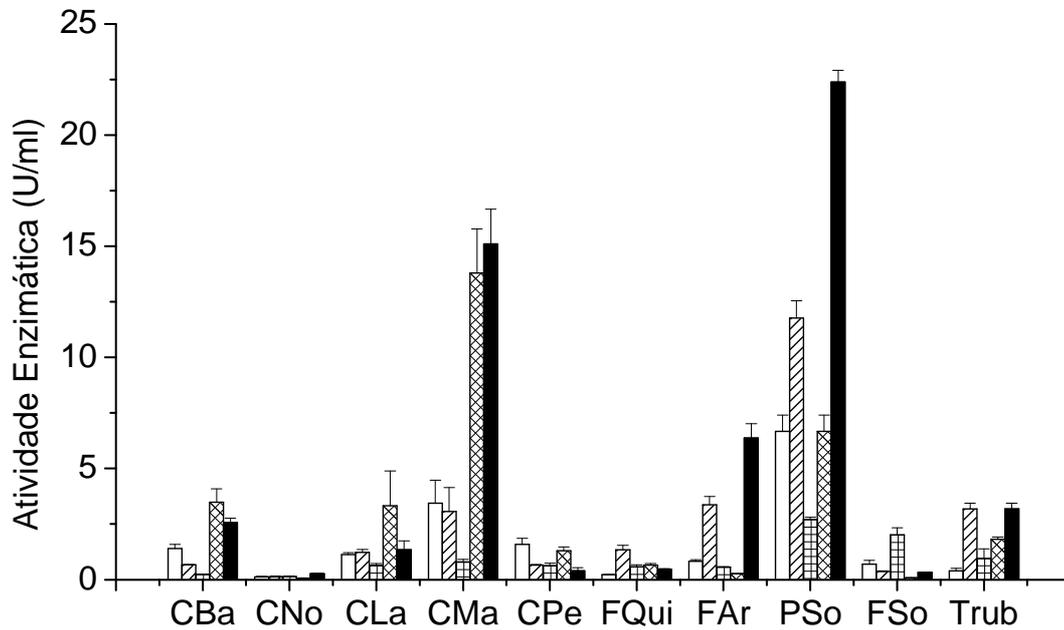


Figura1. Produção de xilanase extracelular pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*, *T. longibrachiatum*. CBA Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAR palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

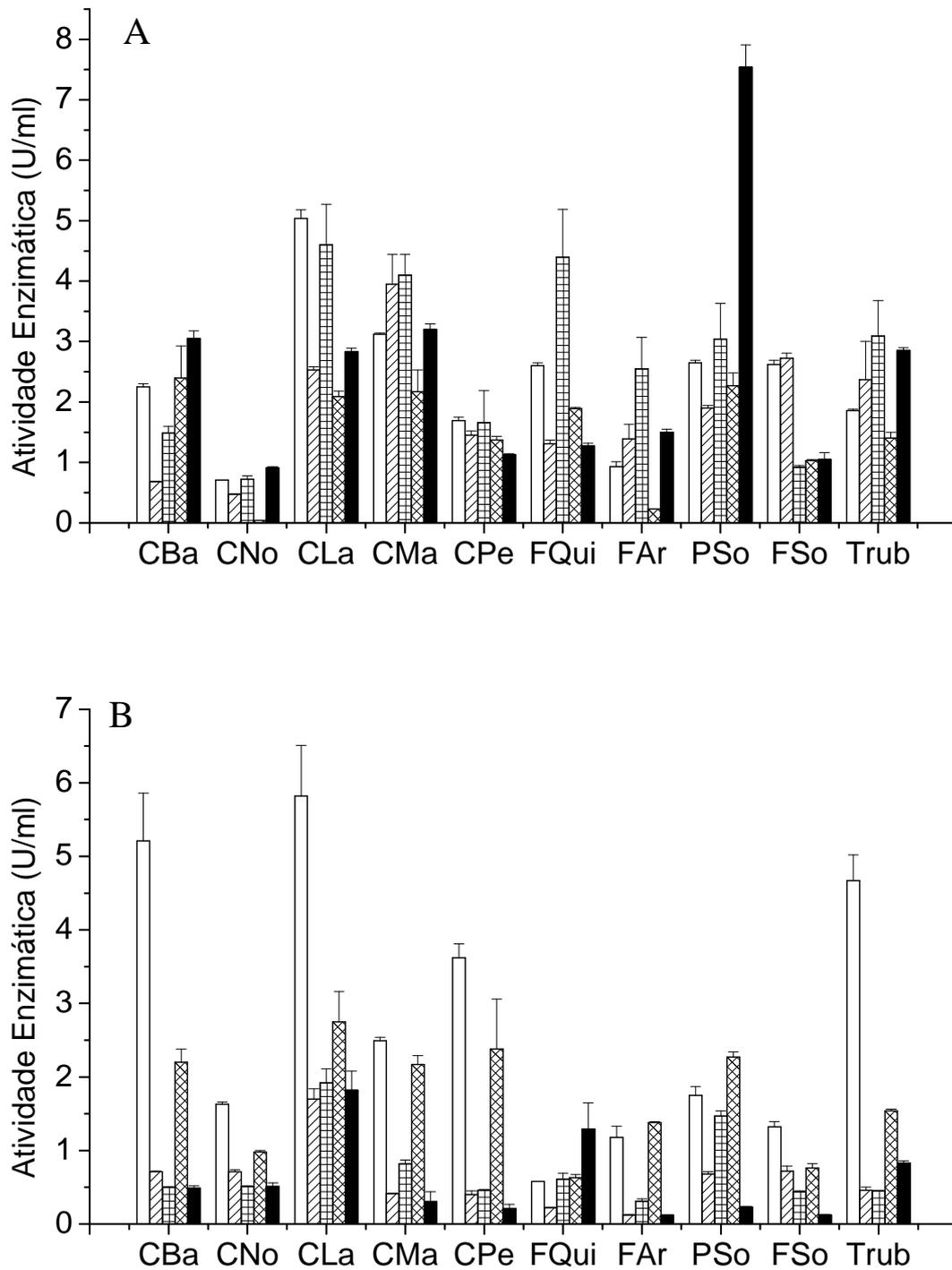


Figura 2. Produção de β -xilosidase intra (A) e extracelular (B) pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*; *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAr palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

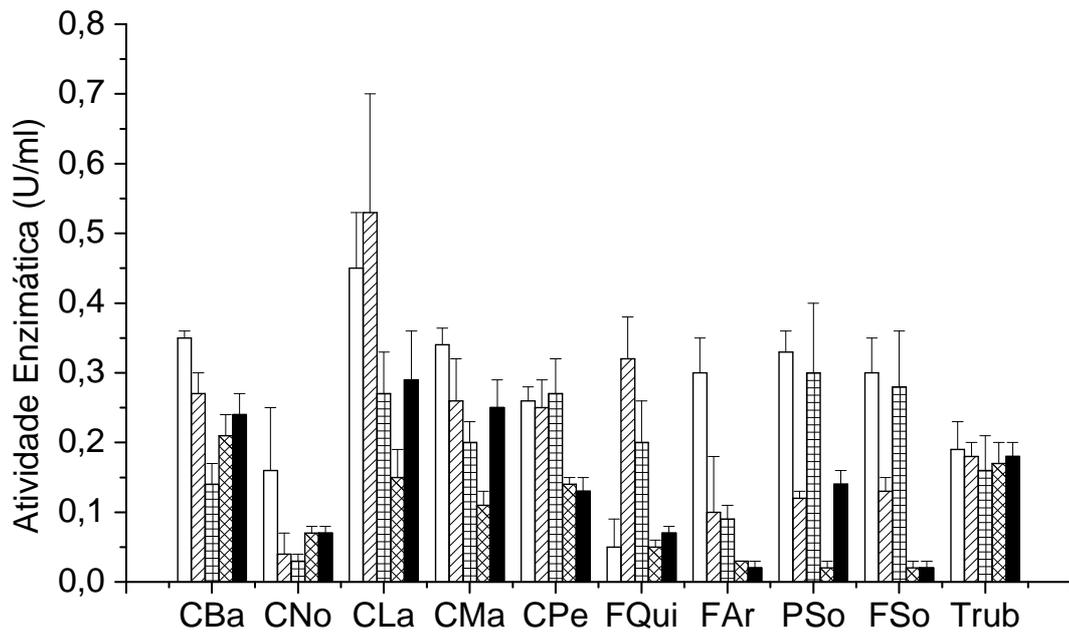


Figura 3. Produção de celulase extracelular pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*; *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAr palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

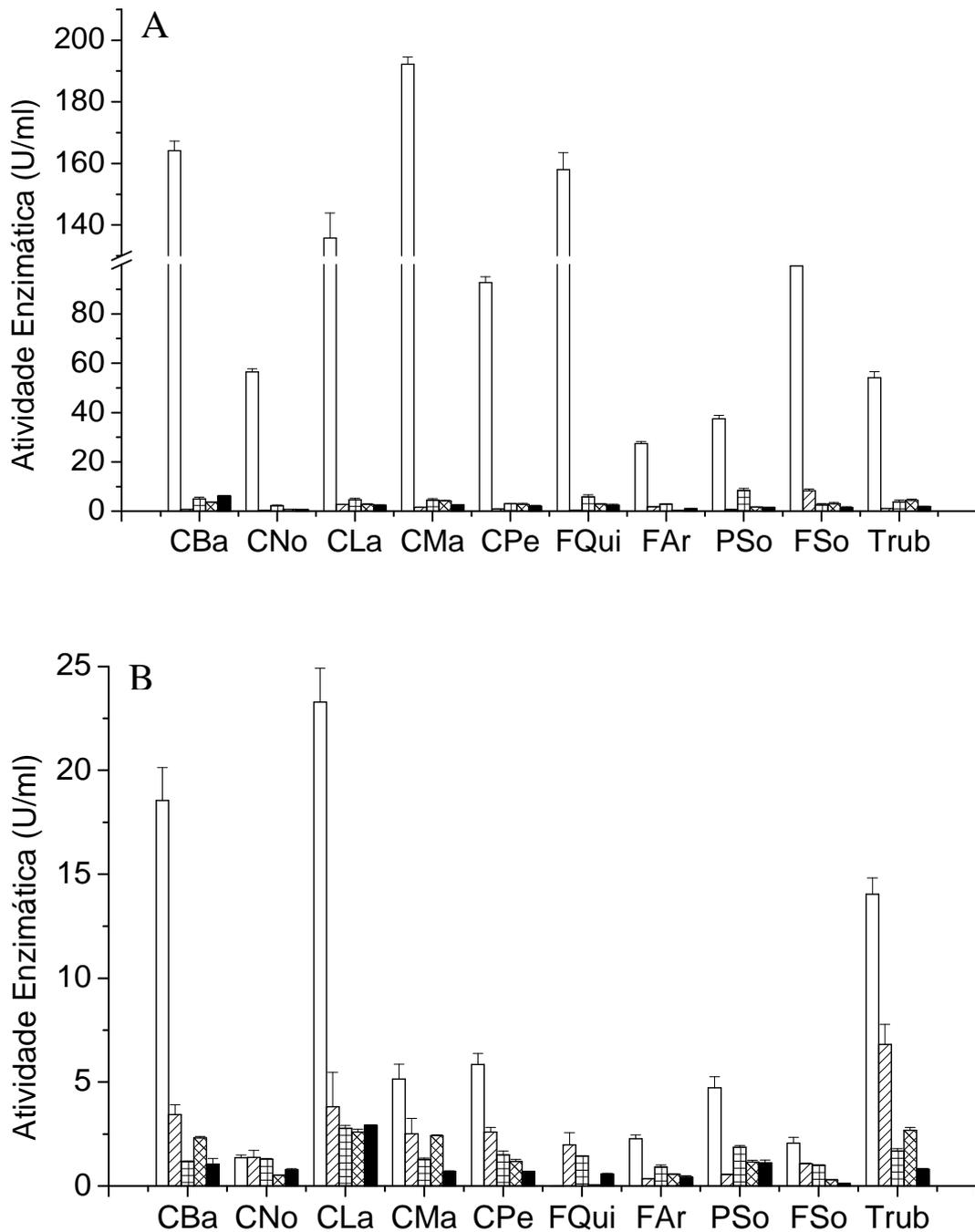


Figura 4. Produção de β -glicosidase intra (A) e extracelular (B) pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*, *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAR palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

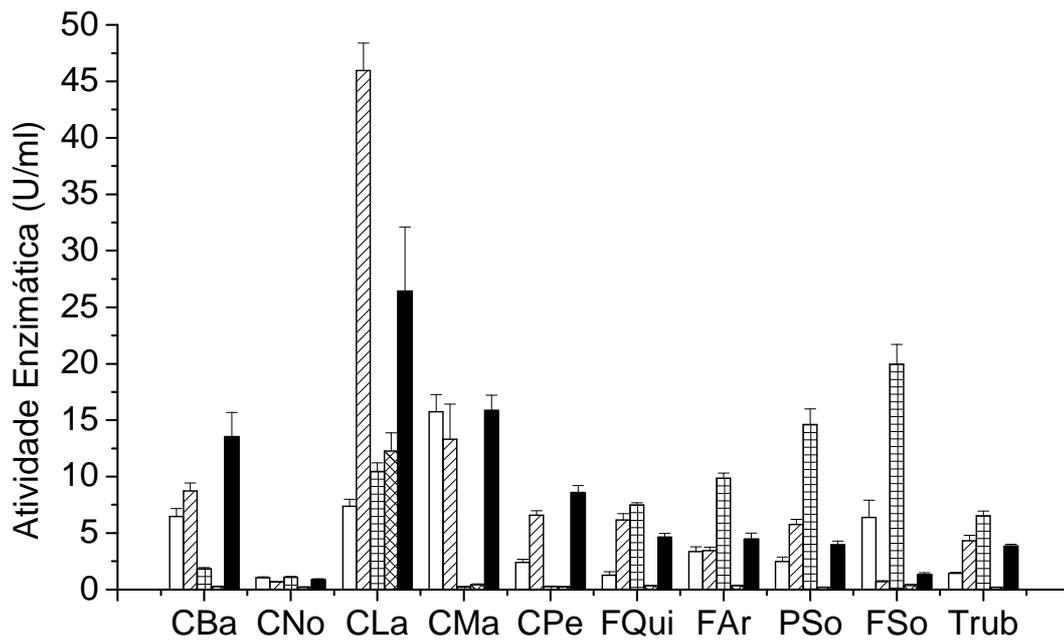


Figura 5. Produção de pectinase extracelular pelos fungos filamentosos em cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais. Legenda: *A. aculeatus*; *A. fumigatus*; *C. sitophyla*; *G. virens*, *T. longibrachiatum*. CBa Casca de banana; CNo casca de nozes; CLa casca de laranja; CMa casca de maracujá; CPe Casca de pera; FQui farelo de quinoa; PAr palha de arroz; PSo palha de sorgo; FSo farelo de soja.

CAPITULO 3:

Produção, Purificação e caracterização de beta-frutofuranosidase do fungo

Aspergillus flavus

Diandra de Andrades³, Marina Kimiko Kadowaki^{1,2}

1. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Rua Universitária 2069, Jardim Universitário, 85819-110 Cascavel, PR, Brasil

2. Autor para correspondência: marinakk@gmail.com

Resumo:

Elevada produção de beta-frutofuranosidase foi obtida com o fungo *Aspergillus flavus* isolado recentemente da Mata Atlântica em cultivo de 48 horas na presença de farelo de soja ou trub (resíduo de cervejaria) tanto em cultivo líquido quanto em estado sólido. Esta beta-frutofuranosidase obtida de cultivo em estado sólido de farelo de soja foi parcialmente purificada por coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Sephadex, com rendimento final de 19%, com massa molecular aparente de 37 KDa por SDS-PAGE e 45 KDa na forma nativa. O pH e a temperatura ótima de atividade da enzima foram de 5,0 e 60°C, respectivamente. A enzima foi estável com 70% de atividade residual após 12 horas na faixa de pHs ácido (5,0 e 5,5), enquanto que nas temperaturas de 45°C a 55°C a enzima mostrou estabilidade superior a 50%.

Palavras chave: *Aspergillus flavus*, farelo de soja, Mata Atlântica e trub

Abstract:

High production of beta-fructofuranosidase was obtained from *Aspergillus flavus* isolated recently from the Atlantic Forest of Parana from cultivation of 48 hours supplemented of soybean meal or trub (brewery residue) both in liquid culture and in solid state. This beta-fructofuranosidase obtained from cultivation in the solid state cultivation supplemented with soybean meal was partially purified by ion-exchange chromatography column DEAE-Sephadex, reaching a final yield of 19%, an apparent molecular mass of 37 kDa by SDS-PAGE and 45 kDa as native. The optimal pH and temperature for activity of the enzyme were 5.0 and 60°C respectively. The enzyme was stable at 70% residual activity after 12 hours at a range of acidic pH values (5.0 and 5.5), whereas at temperatures of 45°C to 55°C the enzyme showed higher stability than 50%.

Keywords: *Aspergillus flavus*, soybean meal, Atlantic Forest and trub

1. Introdução

A β -frutofuranosidase (Ffase) (EC 3.2.1.26), ou comumente denominada de invertase é responsável pela hidrólise irreversível da ligação β 1-2 de carboidratos como a sacarose, originando uma mistura em quantidades iguais de glicose e frutose [1]. A mistura destes monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, e apresentam vantagens na aplicação industrial com índice de dulçor superior a sacarose, além de seus produtos não cristalizarem [2]. A invertase possui importância comercial em indústrias de alimentos, principalmente para a produção de doces e chocolates com o centro liquefeito, em indústrias sucroalcooleiras, e na produção de ácido láctico [3, 4]. Na indústria de alimentos o uso dessa enzima é bastante comum devido a sua alta especificidade e a não geração de subprodutos tóxicos, o que pode ocorrer se usar catalisadores sintéticos ou ácidos para catalisar as reações [5]. Além disso, a inverase é empregada no processamento de alimentos como: fermentação do melaço de cana de açúcar, na produção de alimento para abelhas melíferas e na produção de rações para bezerros [6, 4]. Existem inúmeras isoformas de invertase, classificadas como ácidas, neutras ou alcalinas de acordo com o seu pH ótimo [7]. As funções de cada isoforma ainda não estão devidamente elucidadas, porém é mais provável que estejam envolvidas na regulação da entrada da sacarose por diferentes vias [8, 9]. As β -frutofuranosidases podem ser incluídas nas famílias GH32 (invertases ácidas), GH68 (invertases ácidas) e GH100 (invertases neutras/alcalinas), de acordo com o banco de dados CAZY (<http://www.cazy.org>) [1].

A invertase tem sido obtida de plantas e microrganismos diversos, como bactérias e leveduras [9]. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais extensivamente estudado capaz de sintetizar duas invertases: uma glicosilada e periplasmática, e outra citosólica, não glicosilada que pode ser secretada ou não [10]. As invertases de outras leveduras como *Rhodotorula glutinis* [11] e *Candida utilis* [12] também tem sido relatadas. No entanto, os fungos filamentosos mostram maior potencial para a produção de invertases, como por exemplo, as produzidas por *Penicillium chrisogenum* [13], *A. fumigatus* [14], *A. ochraceus* [9], *A. niveus* [15], *A. caespitosus* [16], *A. phoenicis* [1], *Paecilomyces variotti* [17] e *A. niger* [18].

As principais fontes de carbono utilizadas para a produção de beta-frutofuranosidase em fungos ou leveduras são a sacarose, e alguns substratos não convencionais, como por exemplo, resíduos agroindustriais [4]. A utilização de resíduos

agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar, farinha de mandioca, e sabugo de milho [9, 16], resíduos de processamento de alimentos [19], além de cascas de frutas como abacaxi, limão doce, romã, laranja e mosambi [6] tem sido citados na literatura como indutores de invertases. A utilização destes resíduos é uma alternativa atraente, visto que o Brasil é uma das economias com base agrícola mais importante do mundo. Além disso, esta grande produção agroindustrial é responsável pela geração de quantidades muito elevadas de resíduos que causam graves problemas ambientais [20]. Dentro desse contexto, o presente estudo teve como objetivo a produção, purificação e caracterização da invertase de *Aspergillus flavus* utilizando resíduo agroindustrial como fonte de carbono.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo e manutenção

O fungo foi isolado a partir de amostras de solo coletadas no Refúgio Biológico Bela Vista – Foz do Iguaçu – Estado do Paraná – Brasil (25° 26'37, 27" SE, 54° 33'12, 08" O), conforme metodologia padronizada pelo projeto da rede SISBIOTA – BRASIL. A identificação taxonômica foi realizada pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, PE-Brasil com base nas características micro e macro-morfológicas. O fungo foi mantido em tubos contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) a 4°C.

2.2 Identificação taxonômica

2.2.1 Extração de DNA genômico e Reação de PCR

O isolamento do DNA genômico do fungo foi realizado a partir da massa micelial obtida de cultivo líquido de 1 a 2 dias suplementado com glicose 1%. O micélio do fungo foi coletado por centrifugação (5.000 x g, 10 min), lavado duas vezes com água fria estéril e o pellet utilizado para extração do DNA pelo método de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB). A extração de DNA dos fungos foi realizada empregando a metodologia descrita por White *et al.* [21]. O fragmento de DNA da região ITS foi amplificada com o par de oligonucleotídeos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' direto) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

reverso). A mistura da reação em cadeia de polimerase (PCR) foi: 0,6 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM deoxinucleotídeos, 1,5 mM $MgCl_2$, 5x green GoTaq® Flexi buffer (Promega) e 2,5 U de GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega). As condições dos ciclos de PCR consistiram de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s e 72°C por 45 s, seguido de uma fase final de extensão a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1,0% Tris-acetato-EDTA (agarose 1,0%, 0,04 M Tris-acetato e 1 mM EDTA), e revelados com brometo de etídio e visualizados sob iluminação UV. A purificação dos produtos de PCR e a determinação das seqüências utilizando os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 foram realizadas pela empresa Helixxa® (Campinas-SP, Brasil). As seqüências determinadas (ITS1, ITS2 e 5.8S) foram comparadas com outras seqüências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) empregando a ferramenta básica de alinhamento local (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> website). A árvore filogenética foi construída a partir da seqüência das regiões de *A. flavus* e comparada com seqüências de outras linhagens de fungos obtidos a partir de banco de dados do NCBI com auxílio do programa MEGA.

2.3 Condições de cultivo e obtenção de enzimas

O meio líquido mineral utilizado para a produção das enzimas foi composto de (gramas por litro): Extrato de levedura, 5; $(NH_4)_2SO_4$, 2.8; KH_2PO_4 , 4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.9; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.9. O cultivo submerso (FSM) foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml de meio estéril suplementado com 1% de fonte de carbono alternativo (Casca de banana, casca de laranja, casca de maracujá, casca de nozes, casca de pera, farelo de quinoa, farelo de soja, palha de arroz, palha de sorgo e trub). Os resíduos agroindustriais foram adquiridos no comércio local, e utilizados sem qualquer pré-tratamento. Para as culturas em cultivo sólido (FES) foram utilizados 5,0 g de fonte de carbono alternativa, umidificados com meio mineral estéril. Os frascos Erlenmeyer foram selados e autoclavados a 121°C. Após o inóculo de 1 ml da solução de esporos (10^5 esporos/ml), as culturas foram incubadas (incubadora tipo B.O.D.) a 28°C em condições estacionárias por períodos de tempo convenientes.

2.4 Obtenção dos extratos enzimáticos

As culturas foram filtradas após o crescimento com o auxílio de bomba de vácuo e funil. O filtrado obtido livre de células foi utilizado para determinação da atividade enzimática extracelular. O extrato intracelular foi obtido a partir do micélio congelado em freezer -20°C, macerado em gral de porcelana, ressuspensão em água destilada gelada e centrifugado a 6000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O filtrado foi dialisado por uma noite a 4°C, contra tampão utilizado para o ensaio.

O extrato bruto de cultivo em estado sólido foi obtido adicionando-se 40 mL de água destilada gelada agitados em shaker a 120 rpm durante 60 minutos, a 4°C. Após esse período, as culturas foram filtradas com bomba de vácuo em funil Büchner, o filtrado obtido foi utilizado para quantificação enzimática.

2.5 Ensaio enzimático

A atividade de β -frutofuranosidase foi determinada utilizando 0,2 M de sacarose em tampão acetato de sódio (50 mM pH 5,0), a 55°C, por 10 min. A reação foi interrompida com adição do ácido 3,5'-dinitrosalicílico (DNS), e os açúcares redutores quantificados pelo método de Miller [22]. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm, utilizando glicose como padrão. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 micromol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

2.6 Purificação

O extrato bruto enzimático equilibrado com tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,5 foi aplicado na coluna de DEAE celulose (Sigma, 2 x 20 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão e eluída em fluxo de 1,5 ml/min, com um gradiente linear de NaCl (0,05 a 1,0 M). Três mililitros de cada fração foram coletados e posteriormente a proteína (A_{280}) e atividade enzimática foram dosadas. As frações que apresentaram atividade invertásica foram reunidas, dialisadas em água destilada a 4°C por 18 h, e aplicadas em segunda coluna de DEAE Sephadex equilibrada com o mesmo tampão. A proteína foi eluída com um gradiente de 0,05-0,8 M de NaCl. Os tubos contendo atividade β -frutofuranosidásica

foram reunidos, dialisados e liofilizados para análise por eletroforese e caracterização enzimática.

2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A pureza e o peso molecular da enzima purificada foram determinados por SDS-PAGE como descrito por Laemmli [23] na concentração de 10% de acrilamida. As eletroforeses foram realizadas em tampão Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3, sob corrente de 40 mA e 120V. Como marcadores de massa molecular foram utilizados as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor da tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). A coloração do gel foi segundo o método descrito por Blum e colaboradores [24]. A massa molecular da invertase foi estimada através do coeficiente de migração da proteína em relação aos padrões (Rf).

2.8 Análise de Zimograma

O zimograma da invertase foi executado conforme a metodologia descrita por Liao et al. [25] com algumas modificações. Após a corrida eletroforética por SDS -PAGE o gel foi dividido em duas partes. Uma parte, contendo as amostras e marcador molecular foi corada com Coomassie Brilliant Blue R - 250. A outra parte do gel foi incubada durante 30 min em 0,5% (v/v) de Triton X-100 em temperatura ambiente. Após lavagem em água destilada, o gel foi incubado em solução de sacarose 0,3 M dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,5, por 30 minutos a 40°C. Em seguida, o gel foi corado com cloreto de trifetil tetrazólio a 0,5% dissolvido em NaOH 0,25 M, aquecido a 100°C. A reação foi interrompida com ácido acético 5%.

2.9 Efeito do pH e temperatura na atividade da enzima

O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi determinada através da incubação da enzima com diferentes tampões: McIlvaine (pH 2,2 – 8,0), Tris-HCl (pH 8,5 – 9,0) e carbonato-bicarbonato (pH 9,5 – 10,0). A enzima foi pré-incubada em banho de gelo em

soluções tampões por diferentes períodos (0,25-12 horas). A atividade residual foi determinada utilizando o ensaio padrão, como mencionado no item 2.5.

Para avaliar a temperatura ótima de atividade da enzima, o ensaio foi conduzido a várias temperaturas de incubação que variaram de 30 a 80°C. A estabilidade térmica da enzima foi determinada através da pré-incubação da enzima a diferentes temperaturas que variaram de 45°C a 65°C por diferentes intervalos de tempo (0,25 a 12 horas). A cada intervalo, alíquotas da amostra incubada foram retiradas e posteriormente ensaiadas para atividade invertásica.

2.10 Reprodutibilidade dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos são uma média destes três experimentos independentes.

3. Resultados e Discussão

3.1 Identificação taxonômica de *A. flavus*

O fungo *A. flavus* recentemente isolado da Mata Atlântica do Oeste do Paraná – Brasil, foi identificado taxonomicamente pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco por métodos de análise morfológica. Paralelamente, o sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal do fungo foi realizado, e a sequencia de 529 pb mostrou 100% de similaridade com outras espécies de *A. flavus* (Figura1). Atualmente esta sequencia encontra-se depositada e disponível com acesso KJ470626 no banco de dados do NCBI (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> website).

3.2 Produção da β -frutofuranosidase em cultivo sólido e submerso com diferentes fontes de carbono

Os maiores valores de atividade invertásica intracelular em cultivo submerso foram obtidos quando o fungo foi cultivado em meio suplementado com casca de banana, tanto em cultivo agitado (10,49 U/ml), quanto em cultivo estacionário (10,55 U/ml). Para a atividade extracelular a melhor produção foi obtida em meio suplementado com farelo de

soja (12,71 e 8,59 U/ml), seguido dos resíduos de Trub (6,12 e 4,61 U/ml) e palha de sorgo (5,13 e 7,29 U/ml), em cultivo agitado e estacionário, respectivamente. Atividades muito baixas foram detectadas quando a casca de pera e a casca de nozes foram utilizadas como fonte de carbono em cultivo submerso (Figura 2). Resultados semelhantes foram encontrados para o fungo *Cladosporium cladosporioides* que obteve atividade significativa de β -frutofuranosidase quando crescido em cascas de frutas como romã, abacaxi, limão e laranja [6].

A maior produção de β -frutofuranosidase em cultivo no estado sólido foi obtida na presença de farelo soja (53,36 U/ml) e o resíduo cervejeiro trub (32,04 U/ml), enquanto que a palha de arroz e a casca de nozes foram os piores indutores deste tipo de cultivo. Deste modo, pode-se observar que o farelo de soja e o trub foram os resíduos agroindustriais de maior destaque na produção de β -frutofuranosidase pelo *A. flavus* e a atividade máxima alcançada com o cultivo sólido foi cerca de 5 vezes superior em relação ao cultivo submerso (Figura 2). A produção de Ffase em cultivo sólido utilizando farelo de trigo também tem sido estudada com *A. caespitosus* e *Fusarium sp.* [16, 26], pelo *C. cladosporioides* com cascas de frutas [6], e também com a levedura *S. cerevisiae* utilizando resíduos de cenoura [19]. No entanto a utilização da FES como método de cultivo para a produção de Ffase ainda é pouco explorada.

A produção máxima da Ffase foi de 179 U/ml no prazo de 48 horas de cultivo, e manteve esta produção da enzima por um longo período, ocorrendo declínio apenas próximo ao décimo dia de cultivo (dados não mostrados). O curto tempo de produção enzimática do *A. flavus* foi semelhante ao encontrado para a levedura *S. cerevisiae*, porém a produtividade do fungo estudado foi 21 vezes superior ao da levedura produzida por fermentação submersa (8,35 U/ml) [27]. Segundo Kaur e Sharma [28] esta rápida produção da enzima é uma propriedade adequada nos processos industriais e representa, portanto, uma vantagem sobre os outros microrganismos conhecidos.

3.3 Purificação da β -frutofuranosidase

A invertase do *A. flavus* foi eluída da primeira coluna de troca iônica DEAE-celulose entre as concentrações de 175 e 225 mM de NaCl (Figura 3A). Após os procedimentos de diálise, a amostra com atividade enzimática foi aplicada na segunda coluna de DEAE-sephadex (Figura 2B). Pode-se observar que após as duas colunas de

DEAE a invertase teve rendimento de 19,24% (Tabela 1). A enzima purificada apresentou homogeneidade eletroforética parcial em SDS-PAGE 10% (Fig 3B-C), com uma massa molecular aparente de 37 KDa (SDS-PAGE) e 45 KDa em zimograma. Este resultado mostra massa molecular abaixo do que usualmente é encontrado na literatura, como a invertase de *Aspergillus ochraceus* com 79 KDa [9], de *Pichia anomala* com 86,5 kDa [29], e de *Fusarium solani* com 65 kDa [30].

3.4 Influência do pH e da Temperatura

A β -frutofuranosidase produzida por *A. flavus* exibiu um pH ótimo de 5,0 (Figura 4), demonstrando grande semelhança as β -frutofuranosidases produzidas por *S. cerevisiae* [31], *Aureobasidium pullulans* [32], *Chrysonilia sitophila* [33] e *Fusarium sp.* [25]. A enzima estudada reteve sua atividade residual acima de 70% durante 12 horas tanto em pH 5,0 quanto em pH 5,5, demonstrando uma alta estabilidade frente a estes pHs (Figura 5). Para o pH 4,5 a meia-vida foi de aproximadamente 9 horas, enquanto que nos pHs 6,0 e 6,5 a meia-vida diminuiu para 3 horas.

A temperatura ótima da β -frutofuranosidase deste estudo foi de 60°C (Figura 7), assim como *A. niveus* [15], *A. ochraceus* [9] e *A. caespitosus* [16]. A β -frutofuranosidase deste *A. flavus* apresentou temperatura ótima superior ao das invertases comerciais, BIOINVERT[®] da QUEST INTERNATIONAL e das marcas FLUKA[®] e SIGMA[®] que possuem temperatura ótima de 55°C [34]. Na figura 8, está representado o comportamento da β -frutofuranosidase do *A. flavus* que manteve mais de 60% de sua atividade após 12 horas de incubação a 45°C, enquanto que nas temperaturas de 50°C e 55°C a estabilidade foi próxima dos 50%. Porém em temperaturas superiores a 60°C a meia-vida foi de aproximadamente 2 horas. Esta característica exibida pela enzima é vantajosa para aplicações biotecnológicas em que a estabilidade catalítica térmica de até 50°C é um fator relevante para a indústria [35].

4. Conclusões

A produção de β -frutofuranosidase pelo fungo *A. flavus* alcançou excelentes níveis tanto em cultivo líquido quanto em cultivo sólido quando suplementados com o farelo de soja ou trub como fontes de carbono, porém a produção enzimática do cultivo sólido foi 5

vezes superior ao cultivo líquido. A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono alternativa em substituição a carboidratos puros como a sacarose, em curto período de tempo para produção da β -frutofuranosidase torna o fungo um candidato promissor para futuro uso em processos biotecnológicos. Além disso, a Ffase do *A. flavus* apresentou alta estabilidade em pHs ácidos (4,5, 5,0 e 5,5) e em temperaturas de 45°C a 55°C as quais são condições favoráveis para aplicação industrial.

5. Referencias

- [1] Rustiguel CB, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LHS. A novel silver-activated extracellular β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis*. J Mol Catal B: Enzym 2010; 67(1-2):10-15.
- [2] Bayramoglu G, Akgol S, Bulut A, Denizli A, Arica MY. Covalent immobilization of invertase onto a reactive film composed of 2-hydroxyethyl metacrylate and glycidyl metacrylate: properties and application in a continuous flow system. Biochem Eng J 2003;14:117-126.
- [3] Vitolo M, In: Said S, Pietro RCLR. editor. Legis Suma. Enzimas como agentes biotecnológicos, São Paulo; 2004. p. 207-221.
- [4] Kadowaki MK, Simao RCG, Da Conceição Silva JL, Osaku CA, Guimaraes LHS. Biotechnological Advances in Fungal Invertases. In: Polizeli MLTM. editor. CRC Press. Biotechnological Advances in Fungal Invertases. Vol. 1. 2013. p. 1-30.
- [5] Sanjay G, Sugunan S. Invertase Immobilized on montmorillonite: reusability enhancement and reduction in leaching. Catalysis Communications 2005;6:81-86.
- [6] Uma C, Gomathi D, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Gopalakrishnan VK. Production and properties of Invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SmF using pomegranate peel waste as Substrate. Asian Pac J Trop Biomed 2012:1-7.
- [7] Winter H, Huber SC. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. Crit Rev Biochem Mol Biol 2000;35(4):253-89.
- [8] Vargas W, Cumino A, Salerno GL. Cyanobacterial alkaline/neutral invertases. Origin of sucrose hydrolysis in the plant cytosol? Planta. 2003;216(6):951-60.
- [9] Guimarães LHS, Terenzi HF, Polizeli MLTM, Jorge JA. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. Enzyme Microb Tech 2007;42:52-57.
- [10] Herwig U. et al. Physicochemical interactions between atrazine and clay minerals. Appl Clay Sci 2001;18(5-6):201-222.
- [11] Rubio MC, Runco R, Navarro AR. Invertase from a strain *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry 2002;61:605-609.

- [12] Belcarz A, Ginalska G, Lobarzewski J, Penel C. The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochim. Biophys. Acta* 2002;1594:40-53.
- [13] Nuero OM, Reyes F. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillium manufacture. *Lett Appl Microbiol* 2002;34:413-416.
- [14] Gill PK, Manhas RK, Singh P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresour Technol* 2006;97(7):894-902.
- [15] Guimarães LHS, Somera AF, Terenzi HF, Polizeli MLTM, Jorge JA. Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochem*, 2009;44:37–241.
- [16] Alegre ACP, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LHS. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. *Braz J Microbiol* 2009;40:612-622.
- [17] Giraldo MA, Silva TM, Salvato F, Terenzi HF, Jorge JA, Guimaraes LHS. Thermostable invertases from *Paecilomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World J Microbiol Biotechnol* 2012;28:463–472.
- [18] Madhan SSR, Sathyavani R, Niket B. Production and partial purification of invertase using *Cymopogan caecius* leaf powder as substrate. *J. Microbiol* 2010;50:318-324.
- [19] Rashad MM, Nooman MU. Production, Purification and Characterization of Extracellular Invertase from *Saccharomyces Cerevisiae* NRRL Y-12632 by Solid-State Fermentation of Red Carrot Residue. *Aust J Basic Appl Sci* 2009;3(3):1910-1919.
- [20] Soccol CR, Vandenberghe LPS. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J* 2003;13(2-3):205-218.
- [21] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and application*. Academic Press, 1990.
- [22] Miller, GL. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:424-426.

- [23] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680 – 685.
- [24] Blum H, Beier H, Gros HJ. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrilamides gels. *Eletrophoresis* 1988;81:93-9.
- [25] Liao H, Xu C, Tan S, Wei Z, Ling N, Yu G, Raza W, Zhang R, Shen Q, Xu Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Bioresour Technol* 2012;123:117–124.
- [26] Shaheen I, Bhatti HN, Ashraf T. Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium sp.* Under solid-estate fermentation . *Int J Food Sci* 2008;43:1152-1158.
- [27] Shafiq K, Ali S, Haq I. Effect of different Mineral nutrients on invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* GCB-K5. *Biotechnology* 2002;1:40-44.
- [28] Kaur N, Sharma AD. Production, optimization and characterization of extracellular invertase by an actinomycete strain. *J Sci Ind Res* 2005;64:515-519.
- [29] Rodriguez J, Perez JA, Ruiz T, Rodriguez L. Characterization of the invertase from *Pichia anomala*. *Biochem J* 1995; 306: 235-239.
- [30] Bhatti HN, Asgher M, Abbas A, Nawaz R, Sheikh MA. Studies on kinetics and Thermostability of a Novel Acid Invertase from *Fusarium solani*. *J Agr Food Chem* 2006;54:4617-4623.
- [31] David AE, Wang NS, Yang VC, Yang AJ. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *J Biotechnol* 2006;125:395–407.
- [32] Yoshikawa J, Amachi S, Shinoyama H, Fujii T. Purification and Some Properties of β -Fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. *J. Bios Ci. Bioeng* 2007;103(5):491–493.
- [33] Patil M, Bhamre R, Patil U. Invertase production from *Aspergillus spp* M1 isolated from honeycomb. *Int J Applied Bioresearch* 2012;4:1-5.
- [34] Said S, Pietro RCLR. editor. *Legis Summa. Enzimas como agentes biotecnológicos.* Ribeirão Preto; 2004. p. 244.
- [35] Vafiadi C, Christakopoulos P, Topakas E. Purification, characterization and mass spectrometric identification of two thermophilic xylanases from *Sporotrichum thermophile*. *Process Biochemistry* 2010;45:419–424.

FIGURAS

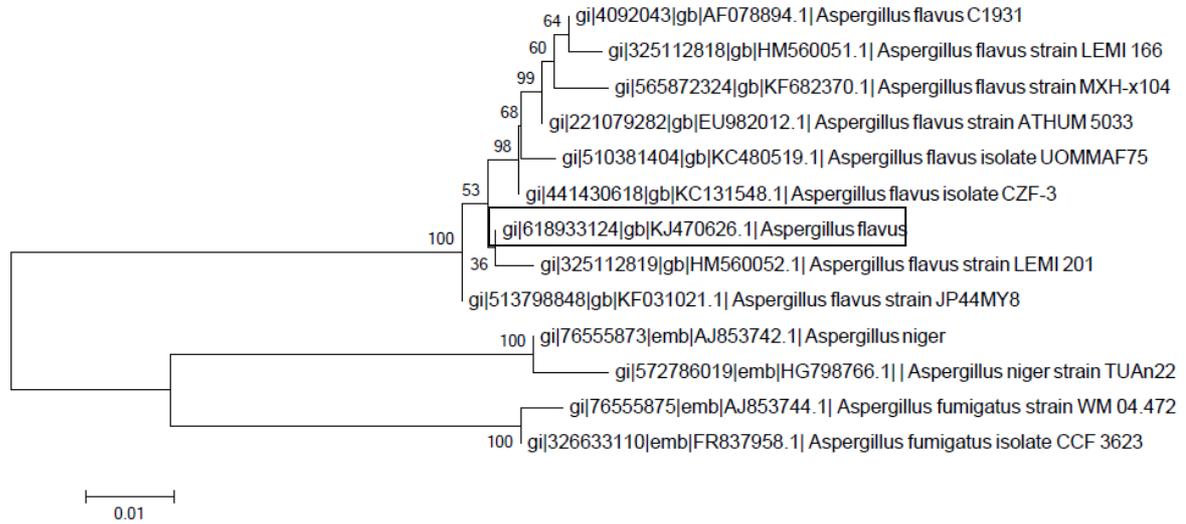


Figura 1. Árvore filogenética construída a partir de sequência das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do *A. flavus* em comparação com sequências de outras linhagens de fungos obtidas a partir do banco de dados do NCBI e com auxílio do programa MEGA.

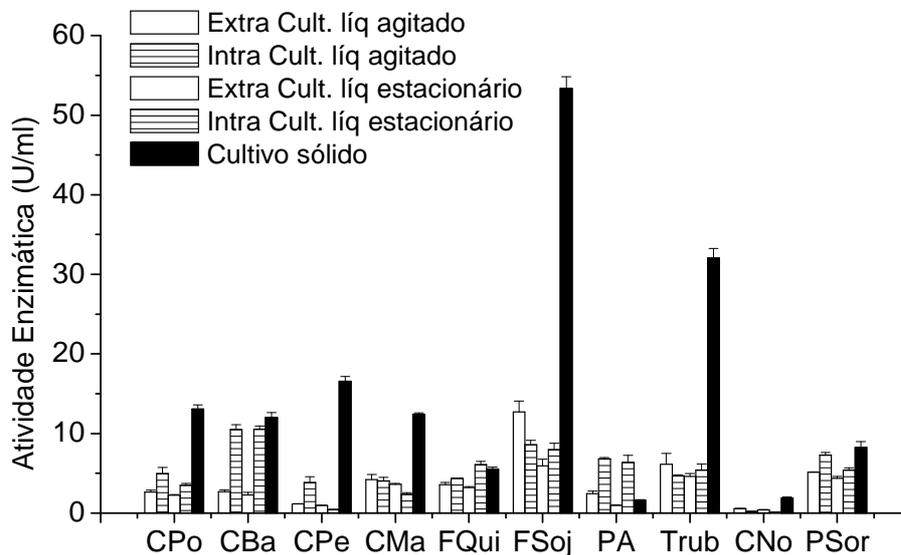


Figura 2. Influência da fonte de carbono na produção de β -frutofuranosidase em diferentes tipos de cultivo. Legenda: CPo casca de Pokan; CBa Casca de banana; CPe Casca de pêra; CMa Casca de Maracujá, FQui Farelo de Quinoa; FSoj Farelo Soja; PA Palha Arroz; CNo Casca de Nozes; PSor Palha de Sorgo.

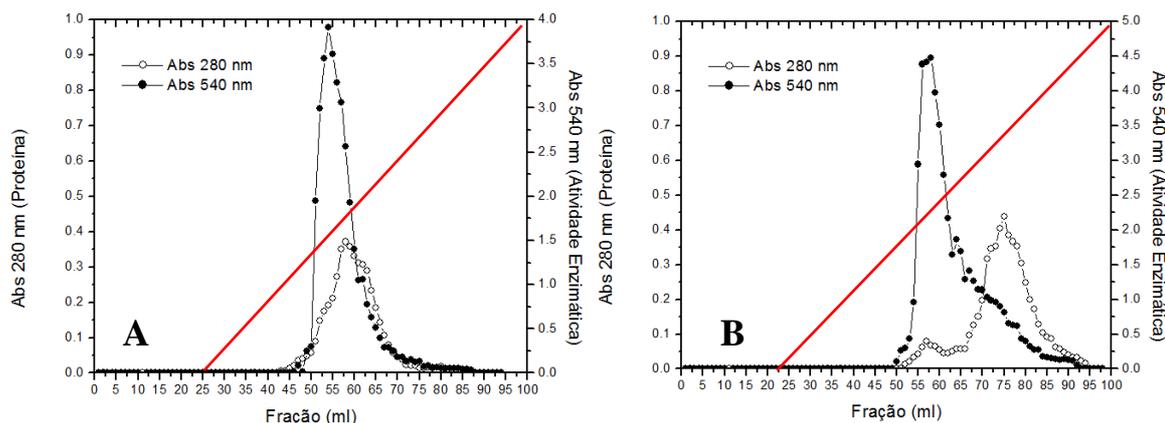


Figura 3. Perfil cromatográfico da β -frutofuranosidase do *A. flavus* em DEAE celulose (A) e em DEAE sephadex (B) equilibradas com tampão Acetato de sódio 20mM (pH 5,5) e eluídas com NaCl (0-1M). Símbolos: (○) atividade invertásica; e (●) proteínas à 280nm.

Tabela 2 Etapas de purificação da β -frutofuranosidase produzida por *A. flavus*

Etapas	Atividade Enzimática total (U/totais)	Proteína (mg total)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Recuperação (vezes)
Extrato bruto	1934	2011	0,96	100	1,0
1ªDEAE-Celulose	682	191	3,57	35,26	3,71
2ªDEAE-Sephadex	372,7	5,35	69,66	19,27	72,41

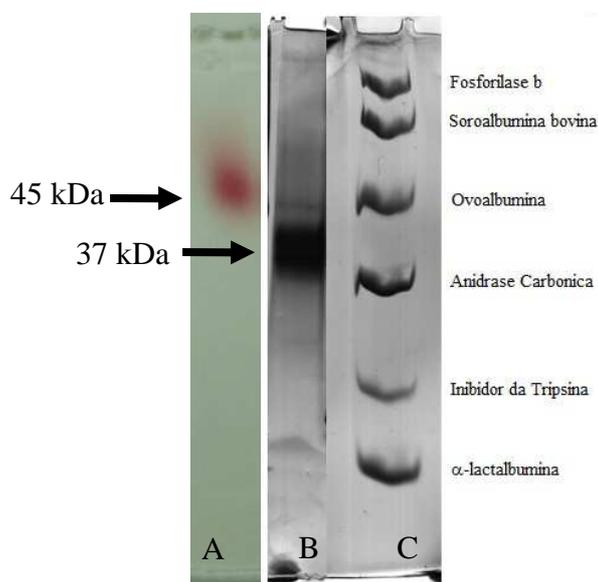


Figura 4. Perfil eletroforético da invertase produzida por *A. flavus* em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Zimograma de invertase (A) e reveladas com prata (B-C). Massa molecular dos marcadores: Fosforilase b (97kDa), Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa), Inibidor da tripsina (20,1kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

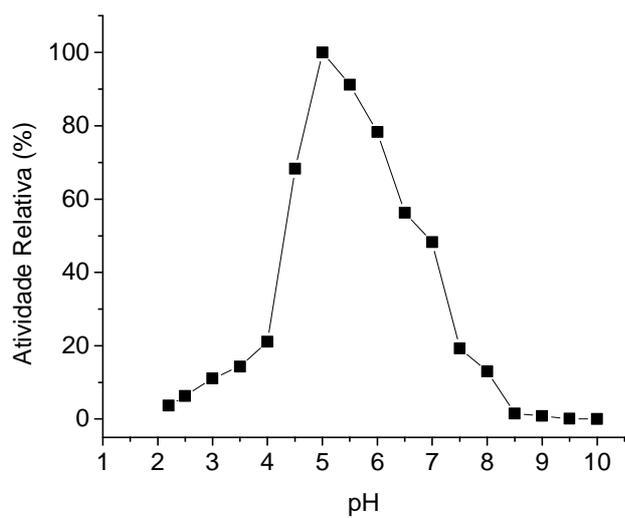


Figura 5. Efeito do pH na atividade da β -frutofuranosidase de *A. flavus*.

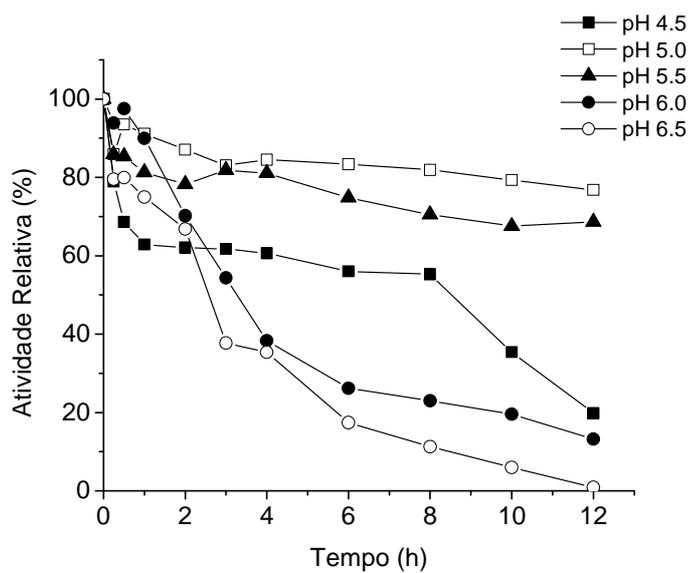


Figura 6. Estabilidade ao pH da invertase de *A. flavus*. A enzima foi incubada em tampão McIlvaine nos diferentes valores de pHs (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5).

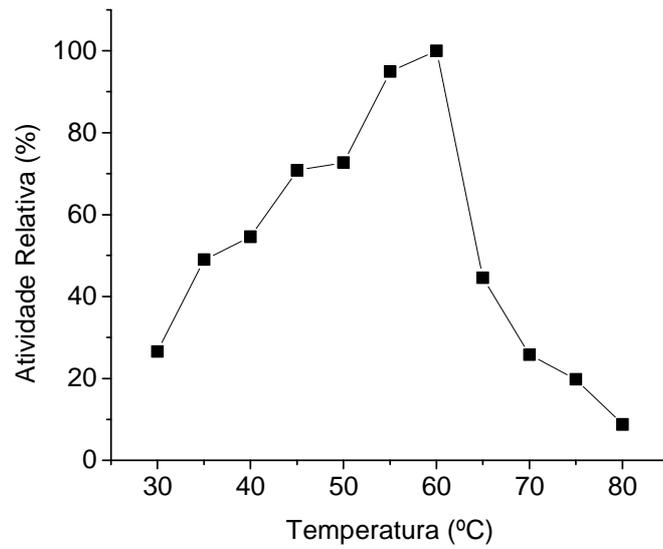


Figura 7. Efeito da temperatura na atividade da β -frutofuranosidase de *A. flavus*.

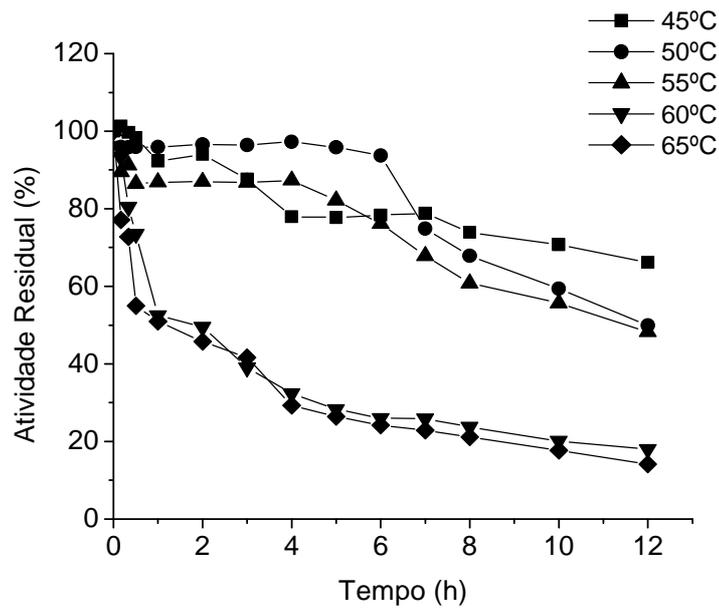


Figura 8. Estabilidade térmica da invertase de *A. flavus*. A enzima foi incubada com tampão McIlvaine (pH 5) em diferentes temperaturas.