

Produção de β -Glicosidases por *Aspergillus spp.* em cultivos em estado sólido

Verônica Sayuri Nishida, Roselene Ferreira Oliveira, Cristina Giatti Marques de Souza, Fabíola Dorneles Inácio, Rosane Marina Peralta

Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Bioquímica
CEP 87015-900 Maringá – PR - E-mail: (sayurinishida@gmail.com)

RESUMO

*β -glicosidases são enzimas com largo espectro de aplicações industriais. Associadas às celulases tem grande importância na sacarificação enzimática da celulose para posterior obtenção do etanol de segunda geração. Neste trabalho avaliou-se a produção de β -glicosidases por três espécies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. awamori* e *A. tamarii*) cultivados em estado sólido por 5 e 7 dias, sendo a atividade enzimática expressa em U/g do substrato nas condições do ensaio utilizando diferentes substratos isolados ou combinados. Os extratos brutos das culturas de *A. awamori* destacaram-se como tendo os maiores valores de atividade β -glicosidase. Os dados obtidos neste trabalho indicam que o tipo de substrato e/ou misturas dos mesmos, a espécie de *Aspergillus* e o tempo de cultivo interferiram na produção da β -glicosidase.*

Palavras-chave: β -glicosidase, sacarificação enzimática, etanol de segunda geração.

1. INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glucosídeo-glucohidrolase, EC 3.2.1.21) catalisam a hidrólise de dissacarídeos e glicosídeos conjugados a partir da extremidade não redutora. Podem ser tanto intracelulares quanto extracelulares e são encontradas em todos os domínios de organismos vivos (Archaea, Eubactérias e Eucariontes)^{1,2}. Esta enzima possui inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de bioenergia. Entre muitos potenciais de uso destacamos a hidrólise de compostos cianogênicos presentes em resíduos agro-industriais e a deglicosilação de flavonóides. Dentre todas as aplicações das β -glicosidases, a que mais tem recebido atenção na atualidade é sua participação no processo de sacarificação da matéria orgânica vegetal para produção de etanol de segunda geração, estando neste processo associadas às endo e exo-celulases. Esta biomassa apresenta mais de 60% da sua composição constituída por lignocelulose³. A biomassa lignocelulósica é composta de três componentes principais: lignina, hemicelulose e celulose⁴. Existem várias enzimas que são necessárias para a hidrólise da biomassa vegetal, tais como celulases, xilanases, pectinases, etc., dentre elas destaca-se as celulases, pois esta biomassa é constituída por cerca de pelo menos 40% de celulose⁵. Os principais produtores de celulases são espécies de *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*⁶. Os complexos celulolíticos são formados por três diferentes enzimas: exoglucanase, endoglucanase e β -glicosidase, todas atuando sinergeticamente para a conclusão da hidrólise da celulose em açúcar (sacarificação). As celulases apresentam-se em proporções diferentes nos

fungos. *Trichoderma reesei*, por exemplo, é um bom produtor de celulases mas não produz quantidades significativas de β -glicosidase, que é necessária para a hidrólise completa da celulose. A suplementação de β -glicosidase nas celulases de *T. reesei* tem o objetivo de evitar qualquer inibição causada pelo acúmulo de celobiose ou acúmulo de glicose⁷. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de algumas espécies de *Aspergillus* na produção de β -glicosidasas em cultivos em estado sólido, utilizando diferentes substratos isolados ou combinados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PRODUÇÃO DA ENZIMA:

A produção da enzima foi avaliada utilizando-se três espécies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. awamori* e *A. tamarii*). Os fungos foram mantidos em laboratório através de repiques periódicos em ágar-batata-dextrose. Para produção da enzima, os fungos foram cultivados em estado sólido utilizando-se três diferentes substratos: farelo de trigo, farelo de soja e coroa de abacaxi, isolados ou combinados. A 5 g de substrato adicionou-se um volume de solução mineral de Vogel⁸ para obtenção de umidade igual a 80%. Após esterilização dos meios, foram inoculados aproximadamente 10^6 – 10^9 esporos dos fungos e os cultivos mantidos em estufa a 28° C, durante 5 e 7 dias. Para extração das enzimas, um volume de 20 ml de água foi adicionado às culturas e as misturas foram mantidas a 4° C por 1 h com agitação a cada 15 minutos. As misturas foram filtradas e centrifugadas 10 min a 5.000 rpm e 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram considerados extratos enzimáticos brutos.

2.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE β -GLICOSIDASE:

A atividade da β -glicosidase foi avaliada utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 e 40° C. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por min. A atividade enzimática foi expressa em U/g do substrato nas condições do ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos se desenvolveram em todos os substratos testados. Na Tabela 1 foi apresentado a atividade enzimática para os substratos isolados e algumas combinações de dois substratos. Os extratos brutos das culturas de *A. awamorii* destacaram-se como tendo os maiores valores de atividade beta-glicosidase. Os três extratos com maiores atividades foram obtidos nos cultivos de 7 dias com farelo de trigo (14,43 U/g substrato) e nos cultivos de 7 e 5 dias com misturas de farelo de soja e coroa de abacaxi, 13,37 U/g de substrato e 10,37 U/g substrato, respectivamente. Se avaliarmos a produtividade das culturas, entretanto, que leva em consideração também o tempo de cultivo, os melhores resultados foram obtidos nos cultivos de 5 dias com a mistura de farelo de soja e coroa de abacaxi (2,07 U/g substrato . dia⁻¹).Os

extratos brutos de *A. niger* e *A. tamaraii* tiveram valores semelhantes de atividade beta-glucosidase.

Ng e colaboradores⁹ analisaram a atividade de β -glicosidase de 42 fungos regionais, e os seis melhores produtores dessa enzima apresentaram atividade no intervalo de 2,0 U/ml – 2,5 U/ml, enquanto Leite e colaboradores¹⁰ registraram, em resíduos industriais, a atividade máxima dessa enzima de 1,3 U/ml por *Aureobasidium pullulans* e 7,0 U/ml por *Thermoascus aurantiacus*. No presente trabalho, a maior atividade encontrada foi por *A. awamori* 3,6 U/ml (farelo de trigo) e 3,34 U/ml (misturas de farelo de soja e coroa de abacaxi), mostrando que as atividades encontradas são relevantes, tornando o presente trabalho viável para estudos posteriores.

Tabela 1. Atividade de β -glicosidase (U/g de substrato) nos cultivos em estado sólido de *Aspergillus* spp. com três tipos de substratos isolados ou combinados e tempos de cultivo de 5 e 7 dias.

Substrato e tempo de cultivo	<i>A. niger</i>	<i>A. awamori</i>	<i>A. tamaraii</i>
FT - 5 dias	2,54 \pm 0,07	6,53 \pm 0,03	5,08 \pm 0,13
FT - 7 dias	7,62 \pm 0,10	14,43 \pm 0,01	6,48 \pm 0,05
FS - 5 dias	2,41 \pm 0,06	9,49 \pm 0,02	0,64 \pm 0,02
FS - 7 dias	4,07 \pm 0,03	9,37 \pm 0,22	1,27 \pm 0,01
CA - 5 dias	3,98 \pm 0,06	6,28 \pm 0,26	2,97 \pm 0,01
CA - 7 dias	3,93 \pm 0,08	7,18 \pm 0,01	3,26 \pm 0,00
FT 80% + CA 20% - 5 dias	2,67 \pm 0,11	9,59 \pm 0,23	3,38 \pm 0,22
FT 80% + CA 20% - 7 dias	3,15 \pm 0,17	7,53 \pm 0,48	3,38 \pm 0,22
FT 80% + FS 20% - 5 dias	2,70 \pm 0,11	6,87 \pm 0,23	NR
FT 80% + FS 20% - 7 dias	2,29 \pm 0,20	8,74 \pm 0,32	NR
FS 80% + CA 20% - 5 dias	NR	10,34 \pm 0,37	NR
FS 80% + CA 20% - 7 dias	NR	13,37 \pm 0,21	NR
FS 80% + FT 20% - 5 dias	NR	7,73 \pm 0,36	NR
FS 80% + FT 20% - 7 dias	NR	8,06 \pm 0,16	NR

FT=farelo de trigo; FS=farelo de soja; CA=coroa de abacaxi; NR=não realizado

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos revelam que das três espécies de *Aspergillus*, *A. awamori* apresentou maior potencial produtor de beta-glucosidase. Novos estudos estão sendo realizados para avaliar as características físico-químicas das enzimas.

5. REFERÊNCIAS

- (1) CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cell. Mol. Life Sci.** v.67, p.3389–3405, 2010.

- (2) PERALTA, R. M.; KADOWAKI, M. K.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**. v.146, p.291-295, 1997.
- (3) LIU, J.; YUAN, X.; ZENH, G.; SHI, J.; CHEN, S. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**. v.41, p.2347-2351, 2006.
- (4) TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**. v.101, n.13, p.4744-4753, 2010.
- (5) SINGHANIA, R., R.; PATEL, A.; SUKUMARAN, K., R., K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**. v.127, p.500-507, 2013.
- (6) GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.59, p.618-628, 2002.
- (7) ARANTES, V.; SADDLER, J., N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**. v.4, n.3, p.1-16, 2011.
- (8) VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genet. Bull.** v.13, p.42-43, 1956.
- (9) I-SON NG, SHAU-WEI TSAI, YU-MING JU, SU-MAY YU, TUAN-HUA DAVID HO. Dynamic synergistic effect on *Trichoderma reesei* cellulases by novel β -glucosidases from Taiwanese fungi. **Bioresource Technology**. v. 102, p.6073-6081, 2011.
- (10) LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**. v.43, p.391-395, 2008.