



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



MANUELA OLIVEIRA PEREIRA

**PRODUÇÃO DE β -1,3-GLUNACASE POR *RHODOTORULA
ORYZICOLA* ISOLADA DO SEMIÁRIDO BAIANO**

Feira de Santana
2022

MANUELA OLIVEIRA PEREIRA

**PRODUÇÃO DE β -1,3-GLUNACASE POR *RHODOTORULA*
ORYZICOLA ISOLADA DO SEMIÁRIDO BAIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Aparecida de Assis

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Guimarães Benevides

Feira de Santana
2022

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

P493p Pereira, Manuela Oliveira

Produção de β -1,3-Glucanase por *Rhodotorula Oryzicola* isolada do seminário baiano/ Manuela Oliveira Pereira. –, 2022. 79p.: il.

Orientadora: Sandra Aparecida de Assis

Coorientadora: Raquel Guimarães Benevides

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

1. Enzima B-1,3-Glucanase - Produção. 2. *Rhodotorula oryziicola* – Levedura. 3. Levedura – Cultivo – Meio líquido. I. Assis, Sandra Aparecida, orient. II. Benevides, Raquel Guimarães, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 57.081


BANCA EXAMINADORA



Dr.^a Marcia Luciana Cazetta
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)



Dr. Manoelito Coelho Santos Junior
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dr.^a Sandra Aparecida de Assis Rodowanski
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2022

À minha mãe, Maria José, por acreditar, orar e sonhar meus sonhos, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ouvir minhas preces e me fortalecer nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais (Maria José e Nilo) e irmãos (Nilson e Deyse) pelo apoio, amor, palavras de incentivos e colaboração.

À Catiane pela amizade, longas conversas cheias de palavras de encorajamento e por compartilhar momentos de lazer que trouxeram alegria e leveza aos meus dias.

Aos amigos Sarah, Renan e Lidiane que, apesar da distância, se fizeram presentes através das redes sociais, por me ouvir e incentivar a seguir em frente.

Aos colegas do laboratório LAPEM, em especial Matheus, Cleide, Edjane, Alison, Gorete, Cissa, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa, seja pela providência ou preparo dos materiais ou auxiliando nas etapas dos experimentos.

Ao Professor Dr. Eddy por permitir acessar os equipamentos do seu laboratório.

As colegas do LAEN (Laboratório de Enzimologia) em especial Camila e Laryssa pela amizade e colaboração para o desenvolvimento do projeto. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Também gostaria de agradecer as demais colegas, Anny, Sara, Thaise, Alda, Juliana e Patrícia que de alguma forma colaboraram com o meu trabalho.

À profa. Dra. Sandra Assis, pela orientação, pelo conhecimento compartilhado, apoio e paciência durante todo processo.

À profª. Dra. Raquel Benevides, por aceitar a coorientação, abrir as portas do seu laboratório para que parte do projeto fosse desenvolvido e colaborar com sugestões na escrita do documento.

Aos membros da banca pela disponibilidade e considerações.

Agradeço aos professores, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia- PPGBiotec, pela transferência de conhecimento.

Ao secretário do programa pela disposição e ajuda concedida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse projeto de vida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gratidão.

"O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência".

Henry Ford

RESUMO

As enzimas são catalisadores versáteis presentes em células de animais, vegetais e micro-organismos, apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores em diversos bioprocessos. As β -glucanases consistem em um conjunto de enzimas que atuam sinergicamente para degradar glucana, seu potencial é explorado na indústria de bebidas para melhorar características organolépticas de vinhos, na suplementação de rações, no controle biológico e na fabricação de detergentes. O objetivo do trabalho foi produzir e caracterizar a enzima β -1,3-glucanase produzida pela levedura *Rhodotorula oryzzicola* cultivada em meio líquido. A análise de superfície de resposta foi utilizada para determinar os parâmetros de pH e temperatura mais adequados para a atividade enzimática. A termoestabilidade foi estudada em temperaturas de 50 °C a 70 °C, em tempos variando de 0 a 50 min. Foi avaliada a influência de NaCl nas concentrações de 0,2 a 1 M. Um planejamento de mistura simplex centróide foi usado no estudo de estabilização da enzima por uma mistura de conservantes composta por cloreto de sódio (SC), benzoato de sódio (SB) e fosfato monossódico (MSP). As condições ótimas de atividade enzimática foram obtidas na temperatura de 50°C e pH 8,0 com atividade de 0,9601 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Após 30 minutos de incubação em 50, 60 °C e 70 °C atividade enzimática manteve-se em 100%, 94,6% e 62,39%, respectivamente. A presença de NaCl elevou a atividade enzimática em todas as concentrações estudadas. No estudo de conservantes, de acordo com superfície de resposta do modelo cúbico, o melhor resultado foi obtido na proporção de 20% de cloreto de sódio, 70% de benzoato de sódio e 10% de fosfato monossódico. Os resultados mostram que a levedura é capaz de produzir a enzima β -1,3-glucanase e os estabilizantes se mostraram promissores para manter a estabilidade enzimática em preparações.

Palavras-chave: Leveduras. Glucanase. Laminarina. Leveduras. Otimização

ABSTRACT

Enzymes are versatile catalysts present in animal, plant and microorganism cells; they have several properties that make them attractive as catalysts in various bioprocesses. β -glucanases consist of a set of enzymes that act synergistically to degrade glucan, its potential is explored in the beverage industry to improve organoleptic characteristics of wines, in feed supplementation, in biological control and in the manufacture of detergents. The objective of this work was to evaluate and characterize the β -1,3-glucanase activity by the yeast *Rhodotorula oryzoicola* cultivated in liquid medium. Response surface analysis was used to determine the most suitable pH and temperature parameters for enzymatic activity. Thermostability was studied at temperatures from 50 °C to 70 °C, in times ranging from 0 to 50 min. The influence of NaCl at concentrations from 0.2 to 1 M was evaluated. A centroid simplex mixture design was used in the study of enzyme stabilization by a mixture of preservatives composed of sodium chloride (SC), sodium benzoate (SB) and monosodium phosphate (MSP). The optimum conditions of enzymatic activity were obtained at 50°C and pH 8.0 with activity of 0.9601 $\mu\text{mol}/\text{min}$. After 30 minutes of incubation in 50, 60 °C and 70 °C enzymatic activity remained at 100%, 94.6% and 62.39%, respectively. The presence of NaCl increased enzymatic activity in all concentrations studied. In the study of preservatives, according to the response surface of the cubic model, the best result was obtained in the proportion of 20% sodium chloride, 70% sodium benzoate and 10% monosodium phosphate. The results show that yeast is capable of producing the enzyme β -1,3-glucanase and stabilizers have shown promise to maintain enzymatic stability in preparations.

Keywords: Yeasts. Glucanase. Laminarin. Yeasts. optimization

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Comparação do perfil de pH e temperaturas ótimas de hidrolases de fungos.	28
Tabela 2: Termoestabilidade de hidrolases fúngicas.	30
Tabela 3: Comparação do perfil de pH e temperaturas ótimas da β -glucanase de diversas espécies de fungos.	39
Tabela 4: Meio de cultivo YPD- Yeast-Peptone-Dextrose.	43
Tabela 5: Meio de Fermentação YP.	4
Tabela 6: Matriz de Doehlert usada para otimizar as condições ideais de pH e temperatura de β -1,3glucanase de <i>R. orydicola</i> .	45
Tabela 7: Resultado da atividade na Matriz de Doehlert usada para otimizar as condições ideais de pH e temperatura de β -1,3-glucanase de <i>R. orydicola</i>	48
Tabela 7: Análise de variância.	48
Tabela 8: Matriz experimental do projeto de mistura simplex-centróide e resposta múltipla.	49
Tabela 9: Análise de variância para o modelo quadrático obtido usando a resposta múltipla.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Rhodotorula</i> ssp	18
Figura 2: Estrutura molecular dos β 1-3 glucanos e local de ação da β -glucanase	33
Figura 3: Parede celular de fungos	35
Figura 4: Superfície de resposta para temperatura versus pH de incubação.	50
Figura 5: Gráfico de Pareto dos efeitos investigados	51
Figura 6: Efeito de estabilidade de β -1,3-glucanase de <i>Rhodotorula orydicola</i> .	54
Figura 7: Efeito do NaCl na atividade de β -1,3-glucanase de <i>Rhodotorula orydicola</i>	56
Figura 8: a) Gráfico de Pareto, b) Superfície de resposta do modelo cúbico para atividade β -1-3, glucanase do extrato enzimático em função da mistura de conservantes cloreto de sódio, fosfato monobásico, benzoato de sódio	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 FUNGOS	16
3.2 LEVEDURAS	17
3.2.1 <i>Rhodotorula oryzae</i>	18
3.3 ENZIMAS.....	19
3.4 HIDROLASES	20
3.4.1 Enzimas hidrolíticas	20
3.4.2 Produção microbiana de hidrolases	21
3.4.3 Produção de hidrolases por leveduras	25
3.4.4 Caracterização de hidrolases de leveduras.....	26
3.4.5 Termoestabilidade	29
3.4.7 Conservação de hidrolases por adição de conservantes químicos	30
3.5 GLUCANASES	32
3.6 GLUCANOS.....	34
3.6.1 Glucanos fúngicos.....	35
3.7 PRODUÇÃO DE β -1,3-GLUCANASE POR MICRO-ORGANISMOS	36
3.8 MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS	40
3.9 APLICAÇÕES DAS β -1,3-GLUCANASES	40
3.9.1 Produção de bebidas.....	40
3.9.2 Controle biológico.....	41
3.9.3 Produção de rações.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 PROCEDÊNCIA DA LINHAGEM DE LEVEDURA	43
4.2 REATIVAÇÃO.....	43

4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	44
4.3	SUBSTRATOS PARA DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	44
4.4	OTIMIZAÇÃO DE pH E TEMPERATURA ÓTIMOS DE β -1,3-GLUCANASE	45
4.5	QUANTIFICAÇÃO β -1,3-GLUCANASE	45
4.6	DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL.....	46
4.7	ENSAIOS DE TERMOESTABILIDADE DE β -1,3-GLUCANASE	46
4.8	EFEITO DO NaCl SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	46
4.9	ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMA β -GLUCANASE PELA ADIÇÃO DE CONSERVANTE QUÍMICOS.....	46
5	RESULTADOS.....	48
5.1	OTIMIZAÇÃO DE pH E TEMPERATURA ÓTIMOS DE β -1,3-GLUCANASE	48
5.2	TERMOESTABILIDADE	53
5.3	EFEITO DO ÍON NaCl.....	55
5.4	ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMA β -GLUCANASE PELA ADIÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS.....	57
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

O ambiente semiárido apresenta ampla diversidade microbiana, essas comunidades são estudadas para diversos fins e também são reconhecidas como fontes de infinidades de biomoléculas (ANDRADE et al. 2017). Esses micro-organismos são reconhecidos como produtores de novos compostos naturais, que podem ser sintetizados ajudando-o a sobreviver sob condições adversas e extremas (PARADA-PINILLA et al., 2021). Vale destacar que as enzimas são alguns dos produtos mais relevantes, tendo em vista que são catalisadores biológicos que atuam em condições moderadas sendo aplicáveis em diversos ramos industriais (ADHIKARI et al., 219).

Os fungos são micro-organismos amplamente explorados em processos biotecnológicos devido a grande diversidade e distribuição fácil manuseio e produção de tipos distintos de enzimas. A produção pode ser otimizada a fim de potencializar o rendimento e parâmetros como disponibilidade de nutrientes, aeração, pH e temperatura são largamente estudados a fim de encontrar as condições ótimas para que os fungos produzam enzimas de interesse biotecnológico e industrial. Dessa forma, também avaliar quais são as melhores condições físicas e químicas que as enzimas apresentam melhor atividade (PARK et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2020a).

Na literatura há vários registros de fungos unicelulares produtores de enzimas de interesse industrial: leveduras isoladas de ambientes aquáticos da Amazônia expressaram atividade para amilases, proteases, lipases e celulasas (PEIXOTO et al., 2021); *Yarrowia lipolytica* produz lipase extracelular quando cultivada em meio composto por extrato de levedo, peptona e glicose (DA SILVA et al., 2020); *Pichia pinus* é capaz de crescer em resíduos de manga, produzindo as enzimas pectinase e lactase e β -galactosidase; leveduras oleaginosas capazes de produzir celulasas e lipases (VYAS; CHHABRA, 2017); leveduras isoladas do semiárido nordestino foram capazes de produzir glucanases (SANTANA et al., 2018).

O gênero *Rhodotorula* têm sido alvo de investigação quanto à produção de enzimas; já foi demonstrado que a espécie *Rhodotorula glutinis* é capaz de produzir compostos valiosos para a indústria, como pigmentos, lipídios e enzimas (KOT et al., 2016). Já a *R. mucilaginosa* produz enzimas do tipo invertases, proteases e lipases, carotenoides e ácidos graxos (BARBOSA et al., 2018; LÍRIO et al., 2020; KAWAHARA et al., 2013).

Quanto a *R. oryzzicola*, objeto de estudo nesse trabalho, tem se mostrado promissora para a produção de hidrolases como demonstra os trabalhos de Oliveira et al. (2020a) e Santana et al. (2018). Além disso, o uso da espécie desse gênero é justificado pois apresenta crescimento

rápido, sem risco à saúde humana e as enzimas produzidas têm potencial biotecnológico. No entanto, ainda são escassos os estudos para avaliar as melhores condições para otimizar a produção da β -glucanases. As β -glucanases produzidas por micro-organismos são amplamente estudadas para fins comerciais, há relatos que estas enzimas são utilizadas: na melhora no processo de produção e nas características organolépticas das bebidas; melhora a digestibilidade das rações; no controle biológico; e na indústria produção de detergentes (BAUERMEISTER et al., 2015; BOYCE; WALSH, 2018; CHAARI; CHAABOUNI, 2019).

A obtenção de enzimas hidrolíticas por micro-organismos é uma excelente alternativa para a produção de β -glucanases, uma vez que os mesmos têm alta capacidade de multiplicação, são adaptáveis a meios com variadas de fontes de carbono, podem produzir várias substâncias químicas, dentre elas, as enzimas, com baixo custo. Além disso, são passíveis de modificações genéticas, capazes de expressar genes exógenos a fim de promover ou potencializar a expressão de genes que codificam enzimas de interesse (LI. et al., 2017; ALI et al., 2019).

Atualmente, são utilizadas técnicas de fermentação para a obtenção de metabólitos, a técnica é aplicada para crescimento de micro-organismos em biorreatores sob condições controladas afim de produzir metabólito de interesse com mais eficiência. O processo fermentativo envolve a adição de meio de cultura que supra as necessidades nutricionais do micro-organismos, o meio é colocado em um biorreator, em seguida adiciona-se o micro-organismos. No final do processo, no caldo fermentativo, obtem-se o acúmulo do metabólito desejado (LIU et al., 2020).

A técnica de fermentação para produção de enzimas se dá por duas técnicas: fermentação em cultivo em estado sólido e fermentação submersa. A fermentação em estado sólido se assemelha ao ambiente nativo do próprio microrganismo, permitindo que os micro-organismos se adaptem melhor. No entanto, o cultivo submerso apresenta maior vantagem pois algumas variáveis são facilmente controladas (KUMAR et al., 2020; ZENG et al., 2018).

A caracterização enzimática é o passo inicial para estudo de enzimas produzidas por micro-organismos, através dela é possível conhecer o potencial de produção do micro-organismo, as condições ideais de cultivo para o melhor rendimento e as condições ideais para a atividade enzimática. Parâmetros como pH, temperatura, adição de sais metálicos e conservantes são comumente avaliados a fim de encontrar as condições físico-químicas ideais a manutenção da atividade.

Apesar de estudos prévios se mostrar em promissores para a produção de enzimas na levedura *Rhodotorula oryzzicola* isolada do semiárido nordestino, não foi extensivamente

estudada quanto à produção de enzimas, sobretudo para glucanases. Desse modo o trabalho teve como finalidade produzir, otimizar e estabilizar a enzima β -glunacase.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar a enzima β -1,3-glucanase a partir da levedura *Rhodotorula oryziicola* isolada do semiárido nordestino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extrato enzimático a partir da fermentação submersa de *Rhodotorula oryziicola*;
- Estudar as melhores condições de pH e temperatura para a atividade enzimática;
- Avaliar a termoestabilidade da enzima;
- Analisar o efeito do cloreto de sódio na atividade da enzima;
- Verificar a conservação do extrato enzimática pela adição de conservantes químicos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNGOS

Os fungos são organismos unicelulares ou pluricelulares, quimio-heterotróficos, anaeróbios ou anaeróbicos facultativos que tem o glicogênio como reserva energética. Atualmente, são conhecidas mais de 100.000 espécies, mas estima-se que o número pode chegar a mais de um milhão (MANDIGAN et al., 2016).

Presente em diversos ambientes, os fungos desempenham importante papel na ciclagem dos nutrientes decompondo substratos orgânicos e inorgânicos. Nas plantas os fungos podem formar associações simbióticas, fornecendo a elas nutrientes essenciais. No entanto, nem todas as associações são harmônicas, em plantas e animais podem parasitar e causar inúmeras doenças (TORTORA et al., 2017).

Os fungos filamentosos são formados por hifas septadas, na maioria dos casos, separando as unidades celulares. Em alguns fungos os septos estão ausentes, formando um filamento contínuo, as hifas cenocíticas, constituída por vários núcleos. As células fúngicas têm membrana plasmática lipoproteica e parede celular rígida constituída de quitina, formada por polímero de *N*-acetilglicosamina (ALTERTHUM, 2020).

Os fungos destacam-se pela ampla capacidade de secretar enzimas hidrolíticas, contribuindo muito para ciclagem de nutrientes, circulação de carbono e nitrogênio. Assim, são indispensáveis para a manutenção dos ecossistemas e da circulação de materiais em nosso planeta (YOSHIMI et al., 2016).

Leveduras são fungos unicelulares que apresentam formas esféricas, ovais ou cilíndricas, caracterizadas por se reproduzir assexuadamente por meio de brotamento ou gemulação (MANDIGAN et al., 2016), encontradas em praticamente todos os substratos. A plasticidade das leveduras está associada à sua diversidade metabólica e bioquímica, capazes de assimilar variados compostos orgânicos, garantindo ampla dispersão a diferentes ecossistemas (BRANDÃO et al., 2011). Esses micro-organismos são utilizados desde a antiguidade na fabricação de bebidas alcólicas, na panificação e, mais recentemente, para sintetizar biomoléculas como enzimas.

3.2 LEVEDURAS

As leveduras são organismos eucariotos pertencentes ao Reino Fungi. Possuem formas globosas, esféricas, ovoides ou alongadas, são unicelulares, constituídos por parede celular rígida, núcleo envolvido por membrana nuclear, aclorofilados, sua reprodução é sexuada por meio de células especializadas denominadas esporos. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo unicelular e não formam corpo de frutificação. Assim como os fungos filamentosos, as leveduras são encontradas em diversos tipos de ambientes (TORTORA et al., 2017).

As leveduras ocorrem em diversos climas: com baixas temperaturas (VERO et al., 2012); ambientes tropicais (KHUNNAMWONG; LIMTONG, 2018); semiárido e desértico (OLIVEIRA et al. 2013; ORO et al., 2016). O mesmo é observado nos vegetais, tendo em vista que são encontradas em diversas partes das plantas como na superfície de folhas, flores, frutos e no interior dos seus tecidos (BOUGREAU et al., 2019; DAYO-OWOYEMI et al., 2014), também podem ser isolados de solo, mares, lagos e rios (YURKOV, 2018; TSUJI et al., 2019; YUN et al., 2021).

Elas são representantes dos filos Ascomycotas e Basidiomycotas que se distinguem através das estruturas sexuadas, ascos nos ascomycetos e basídios nos basidimycetos. Outras características como fisiológicas, bioquímicas e moleculares, espectrometria de massa por tempo de voo permitem a separação dos clados (AGUSTINI et al., 2018; KUMAR; MUGUNTHAN, 2018; FERREIRA et al., 2019).

As leveduras são capazes de degradar diferentes compostos e deles extrair energia necessária para sua sobrevivência; essa capacidade biossintética permite que sejam exploradas para fins biotecnológicos devido à capacidade de produzir biomoléculas, um atributo que permite que sejam utilizadas para diversos fins na esfera industrial como, por exemplo, na produção de enzimas.

Trabalhos relatam a busca por novas fontes de enzimas hidrolíticas produzidas por leveduras em diferentes ambientes. Cshlander et al. (2017) purificaram proteases de leveduras durante o crescimento em suco de uva. Chreptowicz et al. (2019) isolaram dezesseis cepas de leveduras pigmentadas de amostras ambientais pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Cystobasidium*, a maioria das leveduras isoladas biossintetizaram lipases extracelulares, proteases e celulasas. Do mesmo modo, Lara et al. (2014) isolaram leveduras associadas à madeira em decomposição e do bagaço de cana-de-açúcar, e observaram que setenta e cinco dos trezentos e cinquenta e oito isolados produziram xilanases.

Pesquisadores investigaram a ação de enzimas hídrolíticas produzidas por leveduras em diversos processos, tais como: controle biológico, na degradação de glucanos presentes nas paredes celulares de fitopatógenos; na indústria de bebidas durante o processo de vinificação com objetivo de extrair compostos das cascas das uvas a fim de liberar compostos fenólicos bem como na produção de cerveja para melhorar a filtração do mosto; na indústria de biocombustíveis utilizando resíduos industriais para produzir biocombustíveis de segunda geração (SHWENTKE et al., 2014; LIU et al., 2017).

Na literatura há relatos quanto à produção de enzimas hidrolíticas pelo gênero *Rhodotorula* (SANTANA et al., 2018; CHAUD et al., 2016; TASKIN, 2013). No entanto, quando se trata da espécie *Rhodotorula oryzaicola*, isolada do semiárido baiano, há poucos registros (DE OLIVEIRA et al., 2020a).

3.2.1 *Rhodotorula oryzaicola*

O gênero *Rhodotorula* (Figura 1) foi descrito pelo microbiologista canadense Francis Charles Horrison em 1930, o nome do gênero origina-se da palavra rhodos (vermelho em grego) e torula (forma diminutiva feminina do termo neolatino- protuberância). São fungos do filo basidiomiceto, não formam ascósporos, pertencente à família Sporidiobolales e à subfamília Rhodotorulodeae; são isoladas de amostras de solo, fezes, alimentos e ar; crescem em temperaturas de 18 a 22 °C, *in vitro* apresentam crescimento reduzido em temperatura superior a 33 °C. Além disso, pertencem às leveduras oleaginosas devido a grande quantidade de lipídeos que sintetizam (KOT et al., 2016).



Figura 1: *Rhodotorula ssp*
Fonte: HOF (2016).

As leveduras deste gênero são pigmentadas formando colônias róseas, laranjas, salmões e vermelhas. A pigmentação colorida das células deve-se a grande quantidade de carotenoides que as protegem dos raios solares; elas também são boas produtoras de lipídios e ácidos graxos como ácido oleico, linoleico e palmítico (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014; KOT et al., 2016).

Estudos relatam que o peso seco celular das leveduras pode corresponder de 20 a 80% de lipídeos. Essa condição tem levado os cientistas a desenvolverem vários estudos relacionados à produção de carotenoide por leveduras (AGEITOS et al., 2011). Das 600 espécies de levedura conhecidas, apenas 30 foram caracterizadas como capazes de acumular mais de 25% de seu peso seco com lipídios, neste grupo estão incluídas: *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulan* e *Yarrowia lipolytica* (LI et al., 2008; BEOPOULOS et al., 2009).

Além de lipídios, as leveduras desse gênero produzem várias enzimas de interesse industrial. De Oliveira et al. (2020a) ao estudarem proteases produzidas por *R. oryzae*, os autores notaram que as enzimas apresentavam elevada atividade enzimática em pH levemente ácido e estabilidade em altas temperaturas.

3.3 ENZIMAS

As enzimas são moléculas orgânicas complexas produzidas pelas células, onde atuam como catalisadores, sua eficiência é superior a qualquer catalisador sintético ou inorgânico. A atividade enzimática está relacionada à sua natureza catalítica, elas apresentam elevado grau de especificidade aos seus respectivos substratos, aceleram a interconversão entre substrato e produto, atuam sob condições ideais de pH e temperatura (AALBERS; FRAAIJE, 2019; ROBINSON, 2015).

As enzimas são moléculas orgânicas formadas pela junção de aminoácidos, como toda proteína, possuem estruturas: primária, composta pela sequência de aminoácidos; secundária, correspondente a interação entre os aminoácidos adjacentes, os tipos mais comuns são: α -hélice, folha- β e coils; terciária, que provoca dobramentos devido a interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que confere seu sítio ativo e atividade, e; quaternária, corresponde a interações entre cadeias polipeptídicas (ORLANDELLI et al., 2012; NELSON; COX, 2011; ROCHA; DA CRUZ, 2020).

Os trabalhos preliminares envolvendo enzimas datam de 1700 quando pesquisadores estudaram a digestão de carne por secreção gástrica, seguida de estudos relacionados à conversão de açúcar em amido no século seguinte. Quando, em 1850, Louis Pasteur descobriu que as leveduras são as responsáveis por realizar a catálise de açúcar em álcool, mas foi Eduard Buchner que identificou que são as moléculas que desempenham esse papel. Posteriormente, Frederick W. Kuhne nomeou essas moléculas como enzimas (NELSON; COX, 2014).

As enzimas são catalisadores potentes altamente específicos uma vez que catalisam a conversão de um tipo de molécula de substrato em molécula de produto. Para que haja a formação de um produto as enzimas precisam ser ativadas. A ativação se dá por meio da interação entre enzima e substrato, este se liga a região específica da enzima chamada sítio ortostérico. O sítio ortostérico trata-se de uma cavidade aberta na superfície da molécula constituída de grupos R de aminoácidos os quais ligam-se ao substrato com alta especificidade por meio de ligações fracas como pontes de hidrogênio, interações iônicas e outras interações importantes (ROBINSON, 2015).

O complexo enzima-substrato necessita de uma energia adicional para reagir, a função catalítica das enzimas resulta das interações entre elas e seus cofatores. Estes são componentes químicos adicionais que favorecem a catálise, tais como íons metálicos bivalentes como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} ou moléculas orgânicas não-proteicas. Os íons metálicos ligam-se ao grupo R de aminoácidos da cadeia proteica. Já as moléculas orgânicas atuam como aceptores de átomos de grupos funcionais retirados do substrato (TORRES, 2020).

As enzimas classificadas em seis grandes classes: oxidorreductases (EC1), reações oxirredução; transferases (EC2), reações de transferências de grupos entre moléculas; hidrolases (EC3), hidrólise, onde a água é o receptor de grupos transferidos; liases (EC4), reação de adição e remoção de grupos; isomerasas (EC5), rearranjos moleculares; ligases (EC6), condensação de duas moléculas associada à hidrólise de uma molécula de grande energia. (NELSON; COX, 2014).

3.4 HIDROLASES

3.4.1 Enzimas hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas constituem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise de reações de hidrólises de diversos substratos, como proteínas, ácidos nucleicos,

polissacarídeos, lipídios, aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos (DELGADO-GÁRCIA et al., 2019). A versatilidade dessas enzimas tornou-as elemento chave nos diversos processos industriais como, por exemplo, na produção de bebidas e alimentos, bioenergia, têxteis, detergentes entre outros (ALLIED MARKET RESEARCH, 2020).

As hidrolases atuam especificamente na hidrólise de ligações covalentes usando água e entre elas estão incluídas as peptidases, que atuam nas ligações amidas em peptídeos; endoglucanases e amilases, que clivam ligações glicosídicas na celulose e no amido; poligalacturonases, que atuam no complexo heteropolissacádico de pectina (NEVES-JUNIOR et al., 2020).

Glicosil hidrolase (GH) ou glicosidase é uma subclasse de enzimas que catalisam principalmente o metabolismo dos carboidratos *in vivo*. Nesse grupo encontra-se o sistema CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*) que classificou 128 famílias de GH, sendo enzimas são responsáveis pela degradação da parede celular vegetal, correspondendo, portanto, a enzimas ativas em carboidratos (CHEN et al., 2020).

As glicosil hidrolases podem ser classificadas de diferentes maneiras, tais como; a forma que atuam nos substratos em *exo* - e *endohidrolases* - refere-se à capacidade de uma glicosil hidrolase de clivar o substrato no final ou no interior da cadeia; pela numeração do E.C, baseado nas reações químicas que as enzimas catalisam e classificação baseada em sequência usando métodos algorítmicos para atribuir sequências às várias famílias (CASEIRO et al., 2022).

Os grupos as mais estudadas nas hidrolases são: celulases, que atuam sinergicamente para liberar oligossacarídeos curtos; glucanases, que hidrolisam α e β glucanos; xilanases que catalisam a hidrólise da ligação β -1-4 de xilano da hemicelulase; quitinases hidrolisam o polímero linear de quitina (RONCERO; DE ALDANA, 2019; BERLEMONT, 2017; CHADHA et al., 2019).

3.4.2 Produção microbiana de hidrolases

Em micro-organismos, algumas hidrolases são produzidas para permitir que fungos parasitem outros organismos a partir da degradação de polissacarídeos presentes na parede celular. Além disso, as hidrolases participam de processos fisiológicos como morfogênese e divisão celular (LE; YANG et al., 2019). Nas indústrias, as enzimas também desempenham

grande importância pois contribuem para aumentar a vida útil, funcionalidade, cor, aroma, sabor, valor nutricional dos produtos (ERMIS, 2017).

Enzimas produzidas por fontes microbianas ganharam muita atenção da indústria em relação às derivadas de plantas e animais, pois são mais estáveis e toleram condições extremas. Leveduras e bolores contribuem com mais de 50% das enzimas industriais, bactérias com 30%, animais 8% e cerca de 4% de fontes vegetais (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; THAPA et al., 2019).

Atualmente, várias hidrolases são produzidas por fermentação para fins industriais. As condições de cultivo podem ser ajustadas para melhorar o desempenho dos micro-organismos durante o processo fermentativo, que pode ser realizado em meio líquido ou sólido. Nesses processos, micro-organismos são inseridos em biorreatores contendo meio de cultivo com fonte de carbono específicas para induzir a síntese das enzimas desejadas (CHAARI; CHAABOUNI 2019).

O alto custo do processo é um fator limitante para o uso de enzimas nas indústrias, nesse sentido, métodos alternativos como uso de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa para mitigar esses gastos. Dessa forma, pesquisadores estudam a aplicação de resíduos como farelo de arroz, serragem, bagaço de cana, cevada, amido, farelo de trigo, farinha de milho, penas de frango e torta de algodão como fonte de carbono para induzir a síntese enzimática de fungos pelo processo de fermentação em meio sólido (POORNIMA et al., 2020; PEREIRA et al., 2019; DE MORAIS, 2016).

A fermentação em meio sólido é adequada para fungos filamentosos uma vez que esses organismos são capazes de crescer em meios com baixa atividade de água; o substrato além de oferecer os nutrientes necessários também serve como suporte para as células microbianas. No entanto, não é tão recomendada para micro-organismos como leveduras (CHAARI; CHAABOUNI., 2019; SHARMA, et al., 2017).

A produção de enzimas por bactérias e leveduras, geralmente, ocorre por fermentação submersa onde vários parâmetros como pH do meio, temperatura, composição de nutrientes, concentração do inóculo, concentração de oxigênio dissolvido e tempo incubação pode ser otimizados para potencializar a síntese (DORIYA et al., 2016).

A taxa de produção de enzimas fúngicas depende de vários parâmetros, como: pH, toda enzima tem um pH ótimo onde estão mais ativas; Temperatura, é um fator crítico que deve ser controlado para potencializar a produção; aeração, o meio é agitado para fornecer oxigênio por meio da interfase ar-líquido; fonte de carbono e o nitrogênio, atuam como estimulantes essenciais para o crescimento de micro-organismos e produção de enzimas; tempo de

incubação, que varia de acordo com os micro-organismos (BHARATHI; RAJALAKSHMI 2019; BENTIL et al., 2018; SHARMA et al., 2017).

Narayanan et al. (2016) produziram queratinase desacetilase a partir de *Aspergillus flavus* sob condições otimizadas a partir de métodos estatísticos, as condições ótimas para fermentação submersa, sob agitação, incluem meio composto por: 30 g/L de glicose, 40g/L de extrato de levedura, 15g/L peptona, 7g/L MgCl₂; pH inicial de 7 e; temperatura de 37°C. O rendimento máximo foi de 57,69 U.

A produção de celulases e hemicelulases por *Streptomyces térmitum* utilizando biomassa lignocelulósica (bagaço, palha de cana-de-açúcar, casca de cacau) foi estudada por De Sales et al. (2017). Os autores observaram que o bagaço de cana favoreceu a produção de endoxilase. Nanjundaswamy e Okeke (2020), ao avaliar diferentes substratos de biomassa para a produção de celulases e hemicelulases, o pó de papel surgiu como um bom substrato para produção de enzimas, usando uma cepa de *Trichoderma SG2*, sendo mais significativo para a produção de enzimas que hidrolisam biomassas em fermentação submersa.

Infanzón-Rogrigues et al. (2020) estudaram a produção de endoglucanase e β -glucosidade por *Fusarium verticillioides* ITV03, através da utilização de planejamento experimental, onde as fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio e extrato de leveduras) foram as variáveis independentes para a otimização. Posteriormente, eles também avaliaram as fontes de carbono. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que a concentração composta por 0,6 g/L de ureia, 1,2 g/L de sulfato de amônio e 0,6 g/L de extrato de levedura resultou na atividade de 0,27 U/mL para endoglucase. Quanto a fonte de carbono, o bagaço de sorgo doce deslignificado produziu as maiores atividades de endoglucanase (0,28 U/mL e β -glucanase (0,12 U/mL).

A produção de inulinase por *Aspergillus niger* como diversas fontes tais como glicose, frutose, xilose, lactose, sacarose, inulina, melão de beterraba, extrato de alfarroba, maltrina e soro de leite em pó, como indutor no meio de crescimento foi analisada por Germec e Turchan (2019). A atividade enzimática foi significativamente mais alta quando usado o melão de beterraba, que apresentou atividade de 383,73 U/mL a 30 °C, 200 rpm e pH 5,0 em 10 dias.

Bagewadi et al. (2017) avaliaram a produção de enzimas do complexo celulolítico produzida por *Trichoderma Harzianum* HZN11, a partir de variadas fontes lignocelulósicas previamente tratadas com hidróxido de sódio, utilizadas como fonte de carbono em fermentação em meio sólido. Os pesquisadores observaram que todas as fontes foram eficientes para produzir enzimas do complexo lignocelulósico, no entanto, o sorgo doce é uma fonte mais eficiente com relação aos outros substratos.

De Oliveira et al. (2020) utilizaram *Moorella spinosa* para obtenção de proteases através do planejamento experimental onde pH (5,5 a 7,5) e temperatura (40-80 °C) foram as variáveis independentes para a otimização. O meio de cultivo foi enriquecido com peptona a 2% para estimular a síntese de protease, mantido a 28 °C a 100 rpm durante 10 dias. Os pesquisadores observaram que as variáveis influenciaram positivamente na atividade enzimática chegando a produzir $8,6 \times 10^3$ U/mL com condições ótimas de pH e temperatura em 6,0 e 60 °C, respectivamente.

Souza et al. (2017) testaram a produção de protease termoestável por *Aspergillus foetidus*, em fermentação submersa utilizando dois sistemas: 1) frasco de agitação; 2) biorreator de tanque agitado, utilizando meio de cultivo composto por diferentes fontes nitrogênio (caseína, peptona, extrato de levedura). As melhores condições para a produção ocorreram em frasco agitado a 28 °C, pH 7,0, 150 rpm em tempo de fermentação de 168 h. A atividade máxima ($63,7 \text{ U mL}^{-1}$) ocorreu na presença de peptona a 2%, os pesquisadores destacam que quanto maior o teor de nitrogênio no substrato, maior atividade de protease ácida.

De acordo com os estudos citados, os pesquisadores não pouparam esforços para potencializar a produção enzimática a partir de modificações de parâmetros essenciais. Vale ressaltar que micro-organismos podem apresentar condições específicas para crescimento e a síntese enzimática, a síntese pode ser direcionada, por exemplo, a partir das fontes de carbono e nitrogênio disponíveis. Os pesquisadores destacaram também que a maior fase de produção ocorre na fase estacionária (SILVA et al., 2017). As hidrolases são as mais abundantes e os principais alvos quando se trata de estudos enzimáticos porque são os biocatalisadores mais utilizados e, entre as diversas aplicações incluem: degradação de pesticidas, manipulação de DNA, fabricação de produtos de limpeza, processamento de alimentos, processamento de couro, produção de papel.

As leveduras, fungos unicelulares encontrados em diversos ambientes, são potenciais produtores de enzimas. A produção de enzimas por leveduras é desejável devido a facilidade no manuseio, controle dos processos, baixo custo de produção, diversidade de espécies. As enzimas produzidas por leveduras que colonizam regiões extremas, como ambientes de escassez hídrica, podem apresentar características distintas com potencial biotecnológico (De OLIVEIRA et al., 2020).

3.4.3 Produção de hidrolases por leveduras

As leveduras têm despertado o interesse de pesquisadores devido à capacidade de excretar enzimas extracelulares. Além disso, têm ampla distribuição, apresentam requisitos nutricionais simples, ciclos de fermentação curtos, maior estabilidade térmica e diversidade nas atividades catalíticas bem como pode alcançar índices extraordinários de síntese enzimática a partir de manipulação genética (VYAS; CHHABRA 2017).

As hidrolases são comumente encontradas em quaisquer organismos eucariotos e procariotos, no entanto as leveduras são usualmente estudadas por ser um organismo eucarioto unicelular presente em vários ambientes, os principais grupos estudados são *Candida*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Aureobasium*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomycopsis* e *Hanseniaspora* (LIU; KOKARE et al., 2017; HONG, et al., 2019).

Carvalho et al. (2021) investigaram leveduras isolados de ambientes lóticos quanto a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas. Foram isoladas 75 leveduras, 83% delas demonstraram capacidade de secretar amilase, celulasas e proteases. Sendo as espécies *Diffluens naganishia* e *Mycotoxinivorans apiotrichum* maiores produtoras de enzimas.

Em estudo realizado por Vyas e Chhabra (2017) a levedura *Cystobasidium oligophagum* isolada de solo rico em celulose, quando cultivada em meio contendo apenas carboximetilcelulose (CMC) produziu endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase, as atividades enzimáticas foram de 2,27, 1,26 e 0,98 U mL⁻¹, respectivamente.

Santharam et al., (2019) otimizaram as condições de aeração e agitação em cultivo de *Kluyveromyces marxianus* para produção de inulina. Os pesquisadores observaram que agitação ≤ 100 rpm ocorre baixa transferência de oxigênio e conseqüentemente interferiu de forma negativa na produção de enzimas, mas se a agitação for >150 rpm ocorre perda de biomassa e assim leva a redução na produção enzimática.

Abu et al. (2017) utilizaram a metodologia de superfície e resposta para avaliar as melhores condições de síntese de lipase a partir de *Pithia guilliermondii*, das seis condições físicas avaliadas por Plackett-Burman Design, identificaram que o pH, volume ou concentração do inóculo e o tempo de incubação exerceram efeitos significativos na produção de lipase.

A β -glicosidase produzida por *Pichia guilliermondii* (atualmente, *Meyerozyma guilliermondii*) utilizando farelo de trigo como substrato em fermentação em estado sólido, foi estudada por Da Silva et al. (2019). O micro-organismo foi crescido em meio composto por 5

gramas de farelo de trigo no qual foi adicionado 11 mL de solução salina composta por K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, para obter 70% de teor de umidade. Os autores utilizaram 0,02% de biomassa fresca por grama de substrato, incubados a 28 °C durante 6 dias. A atividade máxima foi observada em temperatura de 55°C e pH 3,5-5,5.

Trapala et al. (2020) estudaram as enzimas exoinulinases que pertencem a família glicosil hidrolases produzidas por *Kluyromyces maxianus* isolada de biomassa de agave. Para avaliar a capacidade de o micro-organismo produzir a enzima os pesquisadores utilizaram diferentes fontes de carbono (frutose, sacarose, fruto-oligossacarídeo linear e agave) incubado a 30 °C por 24 h sob agitação orbital a 150 rpm. A atividade mais alta ocorreu quando o agave foi utilizado como substrato. Os pesquisadores destacam que a levedura dessa espécie tem grande potencial biotecnológico uma vez que apresenta crescimento rápido, capacidade de utilizar variadas fontes de carbono e produzir diversas enzimas extracelulares.

A espécie *Rhodotorula glutinis* também é relatada como sendo fonte potencial de β -glicosidase com propriedades desejáveis a serem exploradas na hidrólise enzimática de biomassa. Segundo Rani et al., (2015) leveduras dessa espécie, isoladas de vegetais em decomposição, expressaram alto nível de β -glicosidase na superfície celular.

3.4.4 Caracterização de hidrolases de leveduras

A produção de enzimas extracelulares microbianas e sua atividade são fortemente influenciadas pela composição do meio de cultivo, principalmente carbono e fonte de hidrogênio, fatores físico-químicos: pH, temperatura, aeração e tempo de incubação. Entre vários parâmetros vale destacar que a temperatura, pH e presença de indutores são considerados essenciais para a produção (SOUZA et al., 2017).

De Oliveira et al. (2020a) purificaram e caracterizaram proteases produzidas por *Rhodotorula orydicola*. A enzima apresentou maior atividade em pH 6,5 e temperatura de 63 °C. A enzima manteve 90% da atividade em temperatura de 50-60 °C. A incubação na presença de $BaCl_2$ na concentração de 0,01 M aumentou a atividade.

Freitas et al. (2020) caracterizaram uma glicosil hidrolase produzida por *Kluveromyces lactis* que apresentou valores otimizados em temperatura de 40 °C e pH de 6,5 a 7,0 (imobilizada). Segundo o autor, o valor de pH é dependente dos grupos funcionais de aminoácidos presente no sítio ortostético, o microambiente e a polaridade da solução solvente (BANERJEE; RAY, 2017).

Da Silva (2019) purificaram e caracterizaram uma β -glicosidase produzida por *Pichia guilliermondii* (atualmente, *Meyerozyma guilliermondii*). Os valores encontrados pelos autores para pH e temperatura ótimas foram entre 3,5-5,5 e 55 °C, respectivamente. A enzima exibiu 90-100% da atividade inicial por 72 h em 20, 25 e 30 °C. No entanto, ocorreu uma perda progressiva de atividade após atingir 60 °C. A enzima teve sua atividade aumentada na presença dos íons metálicos Ba²⁺, Ca²⁺ e K⁺, enquanto Co²⁺, Fe³⁺, Al³⁺ Mn²⁺ diminuíram a atividade enzimática.

Pan et al. (2020) caracterizaram uma amino hidrolase purificada de *Rhodospiridium diobovatum* Q 95, a enzima apresentou pH e temperatura ótima na faixa de 2,5-6,5 e 40 °C, com mais de 70% da atividade observada a 25-60 °C. No entanto, não detectada atividade residual em temperatura superior a 65 °C. Além disso, os pesquisadores observaram que os íons Mn²⁺, Co²⁺ na concentração de 1 mM promoveram aumento da atividade, já os Cu²⁺, Al³⁺, Ba²⁺, Ca²⁺ na concentração de 10 mM reduziram a atividade.

Trapalha et al. (2020) produziram, purificaram e caracterizaram exoxilanase de *Kluyveromyces marxianus* ISO3. A enzima tem temperatura e pH ótimo em 50 °C e 5,5 respectivamente, permanecendo estável na faixa e de 25 a 60 °C e de 3,5 a 7,5. No entanto, quando exposta a 70 °C a perda total de atividade ocorre após 10 min, a ausência de atividade também foi observada em pH menor que 3,5.

Além das leveduras, há diversos estudos envolvendo hidrolases produzidas por fungos (Tabela 1), as enzimas apresentaram valores de pH entre 2 e 8, em sua maioria acidolífica, e temperatura entre 28 e 88 °C, condições favoráveis para a indústria, pois reduz o risco de contaminação por micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Vale ressaltar que com o advento da engenharia genética e uso da tecnologia do DNA recombinante é comum encontrar trabalhos envolvendo expressão de genes exógenos em leveduras ou bactérias, a fim de simplificar e potencializar a síntese de enzimas (RUNGRATTANAKASIN et al., 2018).

Tabela 1. Comparação do perfil de pH e temperaturas ótimas das hidrolases de diversas espécies de fungos.

Fungos	Hidrolases	pH e temperatura ótimos	Referências
<i>Aspergillus foetidus</i>	Protease	5,0; 55 °C	SOUZA et al., 2017
<i>Aspergillus niger</i>	β -glucosidase	5,6; 40 °C	ZHAO et al., 2020
<i>Aspergillus niger</i>	Inulinase	4, 8; 60 °C	GERMEC; TURHAM, 2019

<i>Aspergillus tritici</i> WZ99.	Glucoamilase	4,0-5,0; 45 °C	XIAN; FENG., 2018
<i>Cryptococcus albidus</i>	Naringinase	5,0; 60 °C	BORZOVA et al., 2018
<i>Eupenicillium parvum</i> 4-14	Xilanase EpXYN1	5,5; 75 °C	LONG et al., 2018
<i>Fusarium verticillioides</i> ITV03	β -glucanase endoglucanase	5; 60 °C 4; 60 °C	INFANZON-RODRIGUEZ et al., 2020
<i>Glaciozyma antarctica</i>	Dienelactona hidrolase	8,0; 10 °C	HASHIM et al., 2018
<i>Komagataella pastoris</i> X33	Protease	4,5; 40 °C	THERON et al., 2017
<i>Morella spesiosa</i>	Protease	6,78; 60,88 °C	DE OLIVEIRA et al., 2020b
<i>Mrakia</i> sp.	Gelatinase	7; 36 °C	YUIVAR et al., 2019
<i>Neurospora intermedia</i>	Amilase Xilanase	5,0; 65 °C	SHAHRYARI et al. 2019
<i>Papiliotrema flavescens</i>	α -gaçactosidase	4,8; 60 °C	STRATILOVÁ et al., 2018
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Xilanase	2,0; 28 °C	FAÚNDEZ et al., 2019
<i>Pichia pastoris</i>	Endo- (1,4) β -glucanases)	5,5; 55 °C	RYKOV et al ., 2019
<i>Pichia pastoris</i> GS115	α -l-arabinofuranosidase	3,5-4,0; 55-60 °C	TU et al., 2019
<i>Pichia pastoris</i> x33	Xilanase	5; 55 °C	OUEPHANIT et al., 2019
<i>Pichia stipitis</i>	Xilanase	6,0; 50 °C	DING et al., 2018
<i>Trichoderma</i> SG2	Celulase Xilanane	5; 50 °C 6; 50 °C	NANJUNDASWAMY; OKEKE, 2020

Nos estudos é possível observar que os pesquisadores buscam explorar, em sua maioria, as condições ótimas das hidrolases que atuam na despolimerização da celulose bem como de outras enzimas envolvidas em processos industriais. Os pesquisadores buscam alternativas para

a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares redutores para produção de bioenergia como uma alternativa para mitigar danos ambientais, a partir de uso de fontes renováveis (JAIN et al., 2018). Além das condições ótimas de pH e temperatura, a termoestabilidade é um critério que precisa ser cuidadosamente avaliada, uma vez que elas serem usadas em condições adversas que exige tolerância e estabilidade a variação de temperatura.

3.4.5 Termoestabilidade

A termoestabilidade enzimática é um fator importante a ser considerado na seleção de enzima para a aplicação em processo industrial uma vez que oferece menor risco de contaminação, fácil armazenamento e transporte, permite maior tempo de hidrólise dessa forma reduz o custo da enzima (JAIN et al., 2015). Diferentes estratégias de engenharia genética e tecnologia de DNA recombinante são utilizadas para manter a estabilidade térmica das enzimas, tais como formação de ligação dissulfeto, substituição de aminoácidos, comparação de homologia de sequências com outras enzimas produzidas por mesófilos e termófilos (BANERJEE; RAY, 2017).

Geralmente, os processos industriais ocorrem em elevadas temperaturas como por exemplo na fabricação de rações para animais e para produção de cerveja, no qual as enzimas precisam resistir à etapa de revestimento das rações a mosturação da bebida (ALI et al., 2019). Já na produção de suco, as inulinases termoestáveis são desejáveis, pois, a inulina tem baixa solubilidade em temperatura ambiente, além disso, há grande risco de contaminação nessas condições (YIAN et al., 2012).

A termoestabilidade também é desejável na conversão de amido industrial, pois a conversão industrial do amido envolve a desramificação do amido pela pulalanase, enzima que hidrolisa as ligações α -1-6-glicosídicas do polissacarídeo produzindo maltotriose e oligossacarídeos lineares, em temperatura superior a 60 °C. Dessa forma, pesquisadores buscam enzimas com boa termoestabilidade seja na seleção de potenciais micro-organismos termofílicos ou na modificação das moléculas com substituição de aminoácidos ou adição de ligações dissulfetos (PANG et al., 2020).

Xilanases, enzimas responsáveis pela hidrólise de xilanos, são aplicáveis em diversos processos industriais como nas indústrias de biocombustível, papel e celulose, têxtil, de alimentos e rações. A sacarificação dos polímeros de carboidratos para produzir açúcares simples, por exemplo, ocorre em altas temperaturas e pressão na indústria de biocombustíveis,

para os demais processos industriais a termoestabilidade de xilanases também é característica desejável (KUMAR et al., 2018).

A termoestabilidade de β -glucanases é necessária para o tratamento do malte durante a produção de vinho e cerveja: β -glucanes sensíveis ao calor são inativadas durante o processo, deixando muitos β -glucanos não hidrolisados que causa: aumento da turbidez e viscosidade, dificulta a filtração e reduz o rendimento do produto final (JANG et al., 2021).

A temperatura é um valor relevante para a caracterização enzimática; as hidrolases apresentam ampla faixa de termoestabilidade que varia entre 50 e 90 °C como observado na tabela abaixo (tabela 2).

Tabela 2: Termoestabilidade de hidrolases fúngicas

Fungos	Termoestabilidade	Referência
<i>Aspergillus niger</i> . A42	60 °/33,6min	GERMEC; TURHAN 2019
<i>Fomitopsis meliae</i> CFA 2	70 °C/ 11, 36 h	PATEL; SHAH 2021
<i>Fusarium verticillioides</i> ITV03	50 °C/150.68 h	ÍNFANZÓN-RODRÍGUEZ et al., 2020
<i>Moorella speciosa</i>	50-90 °C / 1h	DE OLIVEIRA et al., 2020b
<i>Streptomyces geysiriensis</i>	60 °C/3h	POORNIMA et al., 2020
<i>Thermoascus aurantiacus</i> RCKK	70 °C/6h	JAIN et al., 2015

Além de fatores primordiais como temperatura, pH e termoestabilidade, também é necessário conhecer mecanismos que tem o poder de potencializar e estabilizar a enzima a fim de melhorar seu desempenho. Várias estratégias são adotadas para manter a estabilidade como por exemplo a imobilização que se dá por métodos físicos e químicos, no método físico as interações entre enzima e suporte se dá por meio de ligações fracas, já no método químico a interação entre a enzima e o suporte é mais forte por meio de ligações covalentes (GONÇALVES FILHO et al., 2019).

3.4.7 Conservação de hidrolases por adição de conservantes químicos

Conservantes químicos são substâncias usadas para prevenir mudanças em alimentos durante armazenamento e transporte, tem como função retardar o crescimento microbiano e

evitar reações químicas indesejáveis que levem à degradação dos alimentos (GOKOGLU et al., 2019).

Os conservantes têm sido aplicados também no estudo de estabilidade enzimática, como propósito de melhorar o tempo de ação da enzima, requisito importante para fins industriais. Alguns conservantes têm em sua composição íons metálicos que atuam como cofatores que se associam às enzimas para que elas desenvolvam suas funções, podendo se ligar aos aminoácidos de forma covalente ou se associar durante a catalise de forma não covalente. Conservantes como cloreto de sódio, fosfato monobásico e benzoato de sódio são constituídos de íons de Na, sal metálico que quando empregado em substratos enzimáticos aumentam a atividade enzimática (AMIRPOUR et al, 2015).

Os metais são essenciais para o bom funcionamento dos processos biológicos, dessa forma são indispensáveis para a enzimas funcionarem adequadamente, entre as funções desempenhadas por eles podemos destacar: ajudar na conformação adequada do sítio ativo das enzimas e atuar na estabilização das proteínas e para mediar o transporte de elétrons (WANG te al., 2020; ALTINKAYNAK et al., 2020).

Vasconcellos et al. (2016) descreveram a caracterização de enzimas (hemi) celulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e descobriram que em concentrações de 2 mM dos íons metálicos Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} aumentaram a atividade enzimática, sendo que a Mn^{2+} apresentou maior performance aumentando a atividade em até 57%. No entanto, o Cu^{2+} apresentou efeito negativo mais acentuado demonstrando redução de 60% da atividade. Já os íons de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} não apresentaram nenhum efeito significativo em qualquer uma das concentrações estudadas. Segundo Santana et al. (2018) os íons bivalentes BaCl_2 também são capazes de promover a estabilização de proteases.

Altinkaynak et al. (2020) avaliaram os efeitos dos íons metálicos, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} e Mg^{2+} para a atividade de lipases, e chegaram à conclusão que os íons Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , estimularam a atividade enzimática pois, sabe-se que os íons metálicos atuam como cofatores e protegem a estrutura das enzimas através da construção de pontes entre os resíduos de aminoácidos.

O Benzoato de sódio é um conservante sintético obtido a partir da reação de hidróxido de sódio com ácido benzoico, atua com agente micostático com a finalidade de prevenir crescimento de fungos e leveduras. Já o ácido benzoico com seus sais de cálcio, sódio e potássio além de apresentar ação antifúngica também atuam contra bactérias (AMIRPOUR et al., 2015).

As enzimas de origem microbiana geralmente requerem mecanismos adaptativos para uso em processos fabris e industriais, onde as condições diferem das condições naturais.

Embora os avanços tecnológicos apontem variadas soluções no campo da engenharia de enzimas, soluções que envolvam baixos custos também são viáveis (HEUX et al., 2015).

3.5 GLUCANASES

As β -glucanases são hidrolases que promovem a despolimerização de β -glucanos na natureza, com base no tipo de ligação glicosídica que clivam, também podem ser agrupados em quatro categorias principais: as β -1,3-1,4-glucanases (liquenases, EC 3.2.1.73), as β -1,4-glucanases (celulases, EC 3.2.1.4), as β -1,3-glucanases (laminarinases, EC 3.2.1.39), e as β -1,3(4)-glucanases (EC 3.2.1.6) (LI et al., 2020; KIM et al., 2019; JAIN et al., 2021).

As β -1,3-glucanases são enzimas que catalisam a hidrólise de glucanos do tipo β -1-3-glucana (EC 3.2.1.58), elas atuam em substratos compostos por sequências lineares de unidades de glicose, unidas através de ligações glicosídicas do tipo (β -1,3) contendo uma extremidade terminal não redutora. Dessa forma, podem atuar na degradação da parede celular de fungos e atuam contra uma variedade de polissacarídeos (SONG et al., 2010; ALVAREZ et al., 2015).

As β -glucanases foram sistematicamente classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) pelo tipo de ligações β -glucosídicas que hidrolisam e pelos padrões de ação hidrolítica contra substratos específicos (Figura 2). Elas são classificadas em dois grupos principais com base em seus padrões de ação: as exo- e as endo-glucanase (USOLTSEVA et al., 2020).

As exo-glucanases catalisam a hidrólise da cadeia de β -glucano clivando sequencialmente os resíduos de glicose da extremidade não redutora e liberando glicose como o único produto de hidrólise. Já as endo-glucanases clivam ligações β em locais aparentemente aleatórios ao longo da cadeia de polissacarídeos, liberando oligossacarídeos menores (ALI et al., 2019). As exo- β -1,3-glucanases de glucanos são classificadas como EC3.2.1.58, enquanto as endo- β -3.2.1 glucanases são do tipo EC.3.2.1.39 (WU et al., 2018; LI et al., 2020).

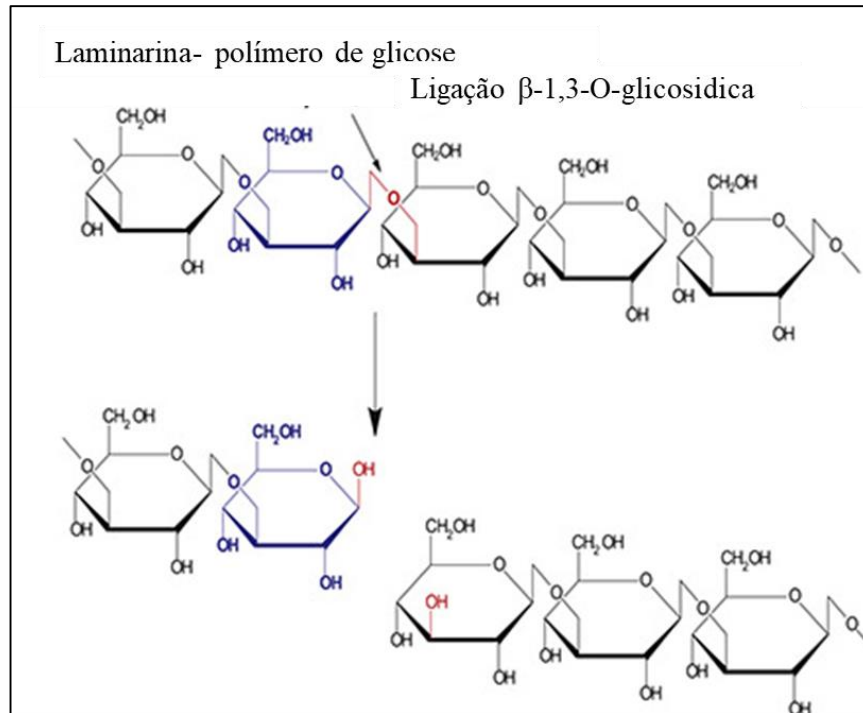


Figura 2: Esquemática do local de clivagem da molécula de β -glucano.

Fonte: LINTON et al., 2019

As glucanases desempenham papéis distintos em diferentes organismos. Nas plantas, por exemplo, possuem mecanismos específicos contra a infecção por meio de suas respostas de defesa, produzem diversas enzimas como as glucanases, que é um importante mecanismo de biocontrole de micro-organismos (SUN et al., 2020).

As β -1,3-glucanases são enzimas amplamente distribuídas e são encontradas em todos os reinos da natureza viva de arqueias a eucariotos. No geral, já foram isolados e caracterizados cerca de 84 1,3- β -D-glucanases de bactérias, 136 de organismos marinhos e fungos terrestres, 58 de plantas superiores e 27 de animais (USOLTSEVA et al., 2020).

Nas bactérias, as pesquisas relataram atividade antagonista dessas enzimas, ou seja, sua capacidade de produção de hidrolases como um mecanismo chave de inibição do crescimento de patógeno (SAKDAPETSIRI et al., 2016). Em leveduras, como nas encontradas em *Histoplasma capsulatum*, as β -glucanases também estão envolvidas na degradação de polissacarídeos das paredes celulares de outros fungos (GARFOOT et al., 2017). Segundo Li et al. (2020) essas enzimas transformam glucanos de alto peso molecular em fragmentos de oligossacarídeos de baixo peso molecular para reduzir açúcares que pode ser utilizado por eles.

A produção de glucanases por fungos facilita as etapas autolíticas necessária para processos fisiológicos essenciais, como morfogênese, reciclagem de componentes da parede celular e a sobrevivência da célula em condições de privação de nutrientes (RIBEIRO et al.

2019). Estudos relatam que endo-1,3- β -glucanase ancorada em glicosilfosfatidilinositol em um fungo ascomiceto *Ustilago esculenta* está envolvida na estrutura da parede celular interna (NAKAJIMA et al., 2012).

As algas também são conhecidas por produzir glucanases, *Euglena* sintetiza beta-glucana como polissacarídeo de armazenamento. Acredita-se que endo-1,3- β -glucanases e exo-1,3- β -glucanases participam da degradação do paramylon para gerar glicose como fonte de carbono (TAKEBA et al., 2015).

As glucanases atuam sobre ligações específicas de glucanos, dessa forma para cada tipo de glucano há um tipo específico de enzima.

3.6 GLUCANOS

Os glucanos são polissacarídeos formados por resíduos de açúcares simples unidos por ligações glicosídicas dos tipos α e β , diferindo uns dos outros na repetição das unidades de monossacarídeos, no tamanho da cadeia, nos tipos de ligações que unem as unidades e no grau de ramificação. Alguns apresentam cadeia simples, com apenas um tipo de ligação, outros apresentam cadeias ramificadas com diferentes ligações glicosídicas, presentes como elementos estruturais nas paredes celulares da levedura, fungos e cereais (RUIZ-HERRERA; ORTIZ-CASTELLANOS, 2019; CHAARI; CHAABOUNI, 2019).

Alguns alfa-glucanos são solúveis em água e atuam como reserva energética, por exemplo, o glicogênio nas células animais e de fungos. Já os beta-glucanos são formados por estruturas cristalinas, insolúveis em água e em quase todos os solventes. São encontrados em plantas a exemplo da celulose e nos fungos diferentes β -1,3-glucanos (RUIZ-HERRERA, 2019). Com base no tipo de ligação glicosídica, os β -glucanos podem ser divididos em quatro grupos: β -1,3-1,4-glucano (liquenano), β -1,6-glucano (celulose), β -1,3-glucano (laminarina) e β -1,3(4) -glucano (CHAARI; CHAABOUNI, 2019).

Os glucanos de leveduras e fungos filamentosos compartilham uma estrutura comum: cadeia central formada por unidades β -glucopiranosil ligadas (1 \rightarrow 3), ao longo das quais estão dispersas aleatoriamente cadeias de unidades conectadas por ligações (1 \rightarrow 6). Estes (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -glucanos são altamente ramificados; frequentemente estão presentes como uma camada de parede interna e às vezes são covalentemente associados a outros polímeros de parede celular (DU et al., 2019).

3.6.1 Glucanos fúngicos

Fungos miceliais e leveduriformes compartilham entre si a estrutura dos glucanos: a cadeia principal é formada por unidades de β -1,3-D-glucopiranosil, ao longo das quais outras cadeias são ligadas por ligações do tipo β -D-1,6 glucopiranosil, ilustrado na Figura 3. Os glucanos fúngicos do tipo alfas estão presentes na parede celular, onde são elementos estruturais e, também, são encontrados dispersos no citoplasma formando grânulos de glicogênio; eles são constituídos por polímeros de glicose unidos por ligações α 1-3, α -1-4 e α 1-6 e servem como reserva energética. Juntos com as glicoproteínas, os α -glucanos moldam as células fúngicas formando uma barreira que isola as células do meio externo (ZLOTKO et al., 2019).

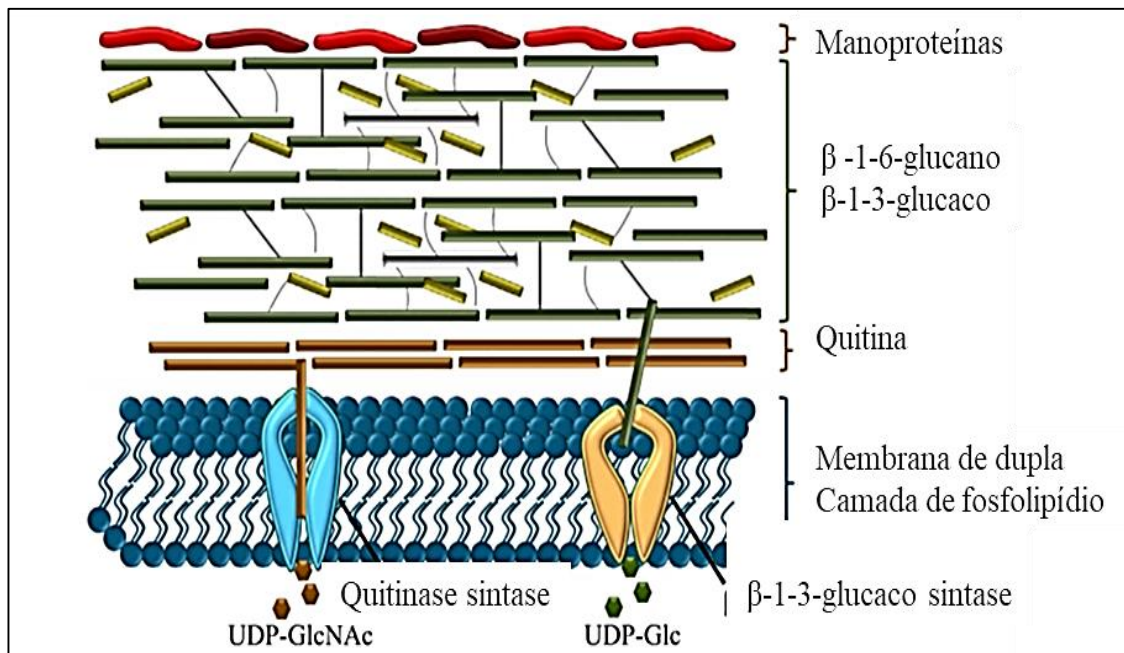


Figura 3: Estrutura da parede celular de fungos

Fonte: FESEL et al. 2016

O segundo grupo, e mais abundante, são os β -glucanos homopolímeros de glicose ligados por ligações glicosídicas entre resíduos de glicopiranosose que atuam como elementos estruturais da parede celular de diversos fungos, dessa forma conferem rigidez e integridade da parede celular, apresentam baixa solubilidade em água e alto peso molecular (RUTHES, 2015).

Os beta-glucanos fúngicos têm chamado atenção da comunidade científica devido às suas propriedades bioativas. Diversos estudos demonstram que estes polissacarídeos apresentam inúmeros efeitos benéficos como antitumoral, antiinflamatório, antimutagênico,

hipocolesterolêmico e hipoglicêmico (ZHANG et al. 2005, RIEDER; SAMUELSEN, 2012; DU et al., 2015; ZHU et al., 2015)

3.7 PRODUÇÃO DE B-1,3-GLUCANASE POR MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos são uma das principais fontes de produção de enzimas, eles apresentam características atrativas e custo reduzido na produção, dessa forma, permitem o cultivo destes em grande escala e em curto período. Inclui ainda o fato de a produção não estar vinculada às condições sazonais e geográficas específicas, bem como haver a possibilidade de se utilizar matérias-primas de baixo custo (ZIMMER et al., 2009; LUZ et al., 2016).

As leveduras têm muitos fenótipos vantajosos, como alta capacidade de secreção enzimática, alta taxa de crescimento em variadas fontes de carbono, potencial para compartimentalizar reações em organelas, capacidade de realizar muitas modificações pós-transcricionais, fáceis de cultivar em pequenos ou grandes biorreatores, fácil purificação do produto e ausência de suscetibilidade a agentes infecciosos como bacteriófagos, ou seja, apresentam características atraentes tornando-as especialmente adequadas para amplas aplicações em diferentes setores biotecnológicos (WAGNER; ALPER, 2016).

A produção de enzimas por micro-organismos pode ser estudada basicamente por meio de dois métodos de cultivo: fermentação em estado sólido (FS) caracterizada por pouca ou completa ausência de água, dessa forma o substrato sólido apresenta características que se assemelham as condições sob as quais a maioria dos fungos estão habituados; Fermentação submersa (FSm) ocorre em meio líquido, é a principal forma de produção de enzimas devido ao fácil controle dos parâmetros e boa base tecnológica para escalonamento para o nível industrial (STEUDLER et al., 2019; LIU et al., 2020).

Na fermentação em estado sólido o resíduo industrial pode ser utilizado como fonte de carbono para produção de enzimas. Dessa forma a produção torna-se menos onerosa tendo em vista que resíduos industriais como palhas de trigo e arroz, farelo de trigo e bagaço de cana são matérias-primas abundantes. Além disso, a fermentação em estado sólido tem menor risco de contaminação e maior produtividade. No entanto, parâmetros como temperatura, pH, tamanho do inóculo devem ser criteriosamente controlados (RAZA et al., 2018).

Os substratos sólidos podem ser divididos em seis categorias: (1) açucarados, como sorgo e bagaço de cana, para a produção de celulasas e xilanasas; (2) amiláceo, como farelo de trigo, adequado para amilases; (3) lignocelulósico, como cascas de frutas, palha e serragem, adequados para celulasas, xilanasas, lacases e peroxidases; (4) rico em proteínas, tais como

resíduos de soja, adequados para proteases; (5) oleoso, como azeite, para a produção de lipases; e (6) transportadores inertes, como espuma de poliuretano (STEUDLER et al., 2019).

No entanto, industrialmente a produção de enzimas por micro-organismos é realizada através de fermentação submersa em biorreatores onde estes crescem em meio apropriado sob condições controladas. Os processos fermentativos de produção mais utilizados são: fermentação contínua, batelada alimentada e batelada simples (ALTERTHUM, 2020).

Na fermentação em meio líquido, condições operacionais como temperatura, taxa de alimentação, consumo de oxigênio são criteriosamente controlados. Uma vez completada a fermentação, vários processos de centrifugação, filtração, precipitação e purificação separam a enzima do substrato (SINGHANIA et al., 2010).

Na natureza, bactérias e fungos são grandes produtores de enzimas, mas para produção de enzimas comerciais os fungos filamentosos são os mais explorados, destacando-se os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Por outro lado, algumas bactérias e actinomicetos foram recentemente relatadas como bons produtores de enzimas hidrolíticas.

Yamaguchi e colaboradores (2017) ao estudarem as fontes de enzimas da empresa *Amano Enzyme Inc.* observaram que as fontes enzimáticas de fungos filamentosos e bactérias (em números quase iguais) são responsáveis por mais de 90% destes micro-organismos, enquanto os 10% restantes compreendem leveduras e basidiomicetos.

As β -glucanases são produzidas por diferentes micro-organismos e sob variadas condições. Gao et al. (2020) ao estudar atividade enzimática de endo- β -1,3-glucanase em *Trichoderma harzianum* observaram que o uso de paquimarano como única fonte de carbono resultou em uma atividade de endo- β -1,3-glucanase de 86,1 U / mL e uma razão de $E_{\text{endo}} / E_{\text{total}}$ de 0,43, que foi de 3,2 e 1,65 vezes maior em relação aos valores do controle (glicose como única fonte de carbono), devido ao efeito indutivo da paquimarana como polissacarídeo.

Micro-organismos do gênero *Trichoderma* produzem quantidades relativamente grande de endo- β -glucanase e exo- β -glucanase, mas baixos níveis de β -glucosidase, enquanto os do gênero *Aspergillus* produzem quantidades relativamente alta de endo- β -glucanase e β -glucosidase com baixos níveis de produção de exo- β -glucanase (SINGHANIA et al., 2010).

Schmaltz et al. (2021) aplicaram tratamento com ultrassom para aumentar a produção de β -glucanase por *Beauveria bassiana* (IBCB 66) cultivado em fermentação submersa. A melhor estratégia consistiu com a exposição no ultrassom durante 5 min a 24 h de fermentação com uma potência de 195 W (frequência fixa de 24 kHz), o tratamento promoveu aumento de 46% para β -1,3-glucanase.

Manavalan et al., (2015) avaliaram a produção de endoglucanase a partir de *Ganoderma lucidum* usando diferentes tipos de biomassas de lignocelulose. Os pesquisadores chegaram à conclusão de que o meio contendo farelo de trigo foi o que ofereceu melhor condição de crescimento para a produção de endoglucanase de *G. lucidum*, rendendo cerca de 25 U/ml após 15 dias de incubação.

Peng et al (2009) utilizaram *Williopsis saturnus* WC91-2, levedura marinha, para obtenção de β -glucanase. O meio para a produção de β -1,3-glucanase consistiu em 1,0% extrato de levedura, peptona 2,0%, glicose 2,0%, NaCl 2,0% e 15% de glicerol ajustado para pH 4,5 com Na_2HPO_4 - 50,0 mM tampão de ácido cítrico. Após a hidrólise da laminarina usando o β -1,3-glucanase purificada os resultados mostram que apenas monossacarídeos e dissacarídeos foram liberados da laminarina, demonstrando que o β -1,3- purificado glucanase era do tipo exo- β -1,3-glucanases.

Estudos recentes revelaram que gêneros de leveduras como o *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Sporobolomyces* e *Aureobasidium*, são produtores de diferentes tipos de celulasas. No entanto, apresentam menor produção quando comparadas a fungos filamentos, salvo aquelas que passaram por manipulação genética (VYAS; CHCABRA, 2017).

Leveduras extraídas de diferentes substratos estão sendo estudadas para testar o potencial celulolítico com a finalidade de identificar a diversidade e o potencial desses micro-organismos frente a produção de celulasas. Herculano et al. (2011) isolaram três espécies de leveduras em resíduos de mamona, ao analisarem a atividade enzimática constataram que a espécie *Rhodotorula glutinis* URM5724 mostrou-se promissora para a produção de endoglucanase.

Santana et al. (2018) estudaram a atividade enzimática da β -1,3-glucanase produzida por *Rhodothorula oryzzicola* utilizando glicose como fonte de carbono e laminarina 1% para detectar a ação enzimática sobre o substrato, eles constataram que os valores considerados ótimos para temperatura e pH são, respectivamente, 96°C e 4,7.

Zhang et al. (2019) produziram β -1,3-glucanase de trigo expressa com sucesso em *Pichia pastoris* X-33 recombinante. A β -1,3-glucanase exibe atividade ótima em pH 6,5, permanecendo relativamente alta em pH 5,5-8,0. A temperatura ótima de reação de β -1,3-glucanase é de 50 °C, retendo aproximadamente 84,0% da atividade residual após tratamento térmico a 50 °C por 1 h. A tabela 3 apresenta o perfil das temperaturas e pHs ótimos de fungos produtores de β -glucanases.

Tabela 3. Comparação do perfil de pH e temperaturas ótimas de β -glucanases de diversas espécies de fungos

Fungos	Temperatura ótima °C	pH	Fonte
--------	----------------------	----	-------

ótimo			
Leveduras			
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	55	5,5	LOPES et al., 2014
<i>Pichia anomala</i>	50	5,5	JIJAKLI et al., 1998
<i>Pichia anomala</i>	50	5,5	JIJAKLI et al., 1998
<i>Pichia. pastoris</i>	60	5	SHARMA et al., 2017
<i>Rhodotorula. oryzoicola</i>	96	4,7	SANTANA et al., 2018
<i>Williopsis saturnus WC</i>	40	4,0	PENG et al., 2009
Filamentosos			
<i>Agaricus bisporus</i>	45	4,5	GÁLAN et al., 1999
<i>Humicola insolens YI</i>	55	5,5	JINYANG et al., 2017
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	40	5	SENA et al., 2011
<i>Paecilomyces Termophile</i>	60	6,5	ALI et al., 2019
<i>Paecilomyces thermophila</i>	70	7,0	CHUA et al., 2010
<i>Rhizomucor miehei</i>	60	5,5	TANG et al., 2012

Carreiro et al. (2019) avaliaram a capacidade de 150 linhagens de leveduras isoladas de frutos de palmeiras do cerrado Tocantinenses produzir enzimas capazes de degradar celulose. Os pesquisadores observaram que linhagens incubadas a 40 °C, apresentaram bons indicativos de atividade enzimática, a partir desses resultados constataram a produção de endoglucanase e celulase total em alguns isolados.

Várias técnicas genéticas estão sendo utilizadas para potencializar a produção de enzimas celulolíticas, através de modificações nos próprios genes e inserções de genes oriundos de fungos multicelulares em leveduras. Wei e colaboradores (2014) estudaram a expressão dos genes de endo-glucanase II e celobiohirolase II de *Trichoderma reesei* em *Yarrowia lipolytica*, apesar de ser amplamente utilizada para a produção de enzimas industriais (GOTTSCHALK et al., 2010).

3.8 MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS

De acordo com um estudo Research and Markets, 2018, o valor de mercado global de enzimas estava estimado em USD 7,082 milhões em 2017 e está projetado para atingir USD 10,5 milhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024 e cerca de 70% do mercado de enzimas tem origem microbianas. O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para indústria química e enzimas para pesquisa) (RIGOLDI et al., 2018).

Apesar dos diversos estudos envolvendo produção enzimática, apenas uma fração minúscula de todas as enzimas conhecidas foram empregadas para aplicações comerciais. Por causa da economia e de vantagens técnicas e éticas sobre enzimas de fontes animais e vegetais, atualmente busca-se enzimas de fontes microbianas por serem mostrarem uma fonte segura e diversificada. (PRASAD; ROY 2018).

3.9 APLICAÇÕES DAS β -1,3-GLUCANASES

3.9.1 Produção de bebidas

Na indústria do vinho e sucos são usadas enzimas hidrolíticas para romper a parede celular da uva e liberar compostos fenólicos e aromáticos. O uso de enzimas exógenas é aplicado com intuito de superar problemas relacionados à insuficiência da atividade enzimática endógena, uma vez que, as condições de vinificação oferecem um ambiente hostil podendo inibir as atividades enzimáticas (ZIETSMAN et al., 2015).

As leveduras são as principais fontes de enzimas hidrolíticas, mas durante o processo de vinificação a comunidade microbiana sofre alterações à medida que o processo fermentativo evolui. Na pré-fermentação leveduras aeróbias e fungos semelhantes a leveduras que vivem na superfície das bagas representam a maior parte da microbiota (CLAUS; MOJSOV, 2018; VARELA; BORNEMAN, 2017). Entretanto, as espécies aeróbicas dos gêneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Zygosaccharomyces*, declinam à medida que avança o processo fermentativo em resposta a queda dos níveis de oxigênio e concentrações crescentes de etanol, que posteriormente, são substituídas por leveduras fermentativas, como *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella* sp., mas diminuem em número à medida que os níveis de etanol aumentam (VARELA et al., 2019).

As preparações enzimáticas com β -1,3-glucanase aplicada no processo de vinificação são utilizadas por várias razões, como melhorar a liberação de componentes presentes na casca da uva, liberando compostos fenólicos precursores de aroma, melhorando características dos vinhos (SCHWENKE et al., 2014). Além disso, β -1,3 e 1,4-glucanases também são utilizadas na indústria cervejeira para reduzir a viscosidade e turbidez do mosto de cerveja, aumentar a taxa de filtração, aumentar o rendimento e produzir malte cervejeiro de alta qualidade (CHAARI et al., 2014).

3.9.2 Controle biológico

O desenvolvimento de métodos de controle biológico de fitopatógeno surge como uma alternativa aos fungicidas químicos, estes apresentam aspectos negativos tendo em vista que os patógenos, com o passar do tempo, passam a desenvolver resistência. Além disso, o uso de pesticidas químicos pode provocar dano ambiental. Vários fungos e bactérias têm sido caracterizadas como antagonistas a certos patógenos, como por exemplo *Wicherhamomys anamalis* contra *Fusarium oxysporum* (HONG et al., 2017).

As leveduras apresentam vários mecanismos de defesa contra patógenos, como competição por nutrientes e espaço, parasitismo, secreção de compostos antifúngicos como proteicas extracelulares com ação hidrolítica. Leveduras que produzem tais substâncias são capazes de promover morte de outras leveduras e de fungos filamentosos (HONG et al., 2017).

A parede celular das leveduras é formada por proteínas, polissacarídeos e quitina. Os glucanos são os principais componentes da parede celular de fungos, por essa razão enzimas hidrolíticas como as β -glucanases degradam a parede celular de diversos fungos. Desse modo, a relação entre a expressão enzimática e a atividade antifúngica desempenha um papel muito importante para o controle biológico (ZHANG et al., 2019; HONG et al., 2017).

Jijakli e Lepoivre (1998) isolaram e testaram a atividade exo-1,3-glucanase de *Pichia anomala* uma levedura antagonista de *Botrytis cinerea*, fungo que causa podridão cinza em maçãs. A maior atividade registrada ocorreu em meio constituído de parede celular fúngica como única fonte de carbono, quando comparada as cultivadas em meio contendo glicose e laminarina. A glucanase purificada mostrou *in vitro* efeito inibidor no crescimento do tubo germinativo de *B. cinerea*, na germinação de conídios e causou alterações morfológicas, como vazamento de citoplasma e inchaço celular.

As frutas cítricas também são acometidas por doenças causadas por fungos. Izgu et al. (2011) testaram uma exo- β -1,3-glucanase como agente antifúngico contra a podridão do morfo azul e verde causador da podridão de citrus após a colheita, ao submeter esporos dos fungos do gênero *Penicillium* a ação enzimática, observou-se que provocou lentidão no crescimento do micélio.

Liu et al. (2018) identificaram isolados de leveduras capazes de controlar a antracnose da uva causada por *C. gloeosporioides*. Algumas linhagens apresentam atividade antagonista contra *C. gloeosporioides*, estas foram avaliadas quanto à produção e eficácia de compostos antifúngicos, para determinação *in vitro* da atividade antagônica. Os resultados revelaram que as linhagens *S. cerevisiae* selecionadas produziram compostos antifúngicos, inibiram a germinação de conídios e produziram enzimas β -1,3- glucanases.

3.9.3 Produção de rações

As β -glucanases podem auxiliar na dieta de animais monogástricos, como aves domésticas, uma vez que esses animais não apresentam aparatos enzimáticos para degradar glucanos quando incorporados na dieta, a exemplo de trigo e cevada. A adição de β -glucanase pode melhorar o consumo da ração, regular a microbiota cecal e aumentar a taxa de conversão alimentar (CHAARI; CHAABOUNI 2019).

Abdallh et al. (2020) observaram em seu trabalho que aves alimentadas com rações a base de farelo de algodão suplementada com glucanases se mostraram eficazes para promover o ganho de peso nas aves e que a inclusão de enzimas exógenas adequadas nas dietas melhorou o ganho de proteína.

Zhang et al. (2018) estudaram a expressão de genes exógenos de enzimas hidrolíticas expressas em porcos, chegaram à conclusão de que os porcos transgênicos expressaram simultaneamente três enzimas microbianas, β -glucanase, xilanase e fitase em suas glândulas salivares. Esses porcos tinham aumento significativo do crescimento e redução do nitrogênio fecal e níveis de fósforo. A adição de enzimas exógenas tem como objetivo suprir a carência dessas enzimas, uma vez que animais monogástricos não apresentam genes que codificam tais enzimas, dessa forma, permite melhorar a extração dos nutrientes presentes na dieta desses animais.

Diante das inúmeras vantagens que envolve a utilização dessas enzimas como recurso biotecnológico é válido investigar a produção de glucanases produzidas por leveduras

principalmente aquelas que vivem em condição ambiental extrema, uma vez que estas podem apresentar características diferenciais devido às condições em que os micro-organismos estão expostos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDÊNCIA DA LINHAGEM DE LEVEDURA

A linhagem de leveduras *Rhodotorula orizycola* foi disponibilizado pelo Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, Universidade Estadual de Feira de Santana (Feira de Santana, BA, BR). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia (LAEN) do Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). O micro-organismo foi mantido em placas contendo meio Ágar YM (Yeast & Mold) (Acumédia®) em geladeira (4-8 °C) até o uso.

4.2 REATIVAÇÃO

As leveduras foram repicadas em Ágar YM (Acumedia®), descrito na tabela 4, previamente esterilizado em autoclave vertical AVM Marte Científica (São Paulo, Brasil) a 121 °C por 15 min, e mantidas incubadas em BOD ABC-LAB (São Bernardo dos Campos, São Paulo, Brasil) a 28°C, por 72 h, conforme Lima et al. (2009). Após esse período, foi realizada ativação das leveduras em meio YM em três repiques contínuos, a cada 24 horas, as placas foram armazenadas em BOD a 28 °C para crescimento.

Tabela 4: Composição do meio de cultivo Yeast & Mold (YM)

Fórmula	Quantidade
Extrato de levedura	3 g
Extrato de malte	3 g
Peptona	5 g
Glicose	10g
Ágar	20 g
Água	q.s.p. 1000 mL

Fermentação submersa

O pré-inóculo de *R. oryzae* foi diluído em solução salina (0,45% p/v) esterilizada em autoclave (121 °C), 15 min. A fim de quantificar as células diluídas, 10% (v/v) do crescimento foram inoculados em frasco com meio YPD- Yeast-Peptone-Dextrose conforme Swangkeaw et al. (2009), Tabela 5. A fermentação ocorreu em frascos fechados mantidos sob agitação em incubadora refrigerada orbital (Tecnal® TE-424) a 120 rpm 28 °C por 120 h.

Tabela 5: Composição do meio de Fermentação YPD

Reagente	Volume
Glicose	20,0 g/L
Extrato de leveduras	10g/L
Peptona	20g/L
Água	q.s.p 1000 mL

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O produto da fermentação com o extrato enzimático foi centrifugado a 9000 rpm (13.969 x g), a 4 °C por 15 minutos em centrífuga modelo Hettich® Universal 320R (Tuttingen, Alemanha), a fim de separar o sobrenadante das células. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em papel de filtro (0,16 mm de espessura) e armazenados em refrigerador (0 °C) até o uso.

4.3 SUBSTRATOS PARA DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A dosagem da atividade β -glucanase foi realizada utilizando laminarina como substrato (Sigma-Aldrick®, St. Louis, MO, EUA). A laminarina é um beta glucano extraído, geralmente, de algas pardas da espécie *Laminarina digitata*. É formada a partir de várias unidades de glicose não ramificada ligados entre si por ligações β -1,3 glicosídica.

4.4 OTIMIZAÇÃO DE pH E TEMPERATURA ÓTIMOS DE β -1,3-GLUCANASE

O efeito do pH e temperatura ótimos foi estudado usando o Planejamento Experimental Doehlert, totalizando nove experimentos (Tabela 6). O pH foi avaliado em 5 níveis (6,0 a 10 (ponto central em 8) e temperatura em 3 níveis (30, 50 e 70, ponto central em 50°C). Os erros experimentais foram avaliados de acordo com a replicação do ponto central. Os dados experimentais foram plotados e ajustados em modelos e a significância estatística de cada um dos termos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) usando Design Statistica, versão 7.0.

Tabela 6: Matriz de Doehlert usada para otimizar as condições ideais de pH e temperatura de β -1,3-glucanase de *R. oryzae*

Amostras	pH	Temperatura
1	7	70
2	9	70
3	6	50
4C	8	50
5C	8	50
6C	8	50
7	10	50
8	7	30
9	9	30

4.5 QUANTIFICAÇÃO β -1,3-GLUCANASE

A atividade da β -glucanase foi avaliada de acordo com o método de Miller [28] utilizando laminarina como substrato padrão. A atividade da endoglucanase foi testada com 1% (v/v) de laminarina em tampão fosfato (10 mM, pH 8) e determinação dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Após a reação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Varian Cary® 50 uV-Vis Varian, Inc. São Paulo, Brazil com absorvância de 540 nm usando curva de calibração de glicose. A atividade de glucanase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de açúcar redutor (equivalente a glicose) por minuto nas condições de ensaio.

4.6 DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL

A dosagem foi realizada conforme método descrito por Bradford (1976), adicionando-se 100 μ L de amostra enzimática a 5,0 ml de reagente de Bradford. Após 5 min de reação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro Varian Cary® 50 uV-Vis Varian, Inc. São Paulo, Brazil com absorvância de 595 nm. A quantidade de proteína total foi calculada usando uma curva de calibração padrão de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich®), num intervalo de concentração de 0-100 μ g/L.

4.7 ENSAIOS DE TERMOESTABILIDADE DE BETA-1,3-GLUCANASE

A estabilidade térmica foi estudada incubando o extrato bruto em diferentes temperaturas (50, 60 e 70 °C) e tempos (0, 10, 20, 30, 40 e 50 min). Após o aquecimento, as amostras foram refrigeradas durante 30 minutos em seguida avaliadas quanto à sua atividade residual em pH 8 a 50 °C.

4.8 EFEITO DO NaCl SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito do íon NaCl (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mol/L) na atividade foram estudados em diferentes concentrações. A atividade β -1,3-glucanase foi determinada pelo ensaio padrão como descrito anteriormente.

4.9 ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMA β -1,3-GLUCANASE PELA ADIÇÃO DE CONSERVANTE QUÍMICOS

Um planejamento de mistura simplex centróide foi usado para avaliação de uma mistura de conservantes composta por cloreto de sódio (SC), benzoato de sódio (SB) e fosfato monossódico (MSP). Para obter um modelo matemático, nove experimentos foram realizados, incluindo duas repetições do ponto central utilizadas para estimar o erro experimental. Os modelos foram capturados utilizando uma resposta múltipla (MR), baseada a partir da atividade enzimática considerando o tempo de incubação de 24, 48 e 72 h. A MR foi calculada conforme a Equação 1.

$$MR = \frac{Act(24 h)}{MaxAct(24 h)} + \frac{Act(48 h)}{MaxAct(48 h)} + \frac{Act(72 h)}{MaxAct(72 h)} \quad (1)$$

Nesta equação, Act é a atividade enzimática em um experimento individual e MaxAct é o valor máximo da atividade observada no conjunto de experimentos. Os modelos matemáticos foram obtidos a partir da análise de variância (ANOVA). A significância estatística da regressão e inexistência de falta de ajuste foram considerados em combinação com a estimativa dos coeficientes de determinação (R^2 e R^2 -determinado) (Bezerra et al. 2019, 2020). Os dados experimentais foram processados no software Statistica (versão 12, StatSoft, Tulsa, EUA) com nível de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5.1 OTIMIZAÇÃO DE pH E TEMPERATURA DE β -1,3-GLUCANASE

A otimização é amplamente utilizada para se determinar as condições em que a atividade das enzimas microbianas é máxima. Vários fatores são relevantes para a produção de enzimas tais como substratos (fontes de carbono e nitrogênio), aeração, bem como, fatores físicos e químicos que também podem influenciar a atividade catalítica da enzima; neste sentido, o estudo buscou avaliar as condições ótimas de temperatura e o pH para atividade enzimática.

Os parâmetros foram avaliados utilizando a metodologia de superfície de resposta como ferramenta para otimização sendo possível assim, obter a estimativa apropriada da relação resposta/fator de estudo. O planejamento fatorial fracionário 2^2 foi utilizado para a triagem das duas variáveis com três repetições no ponto central.

A matriz de Doehlert foi aplicada para encontrar as condições ótimas para atividade catalítica máxima de β -1,3-glucanase de *Rhodotorula oryzoicola*. Os resultados experimentais obtidos com o projeto Doehlert para essas variáveis são apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Resultado da Matriz de Doehlert usada para otimizar as condições ideais de pH e temperatura de β -1,3-glucanase de *R. oryzoicola*.

Amostras	pH	Temperatura (°C)	Atividade ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
1	7 (-0.5)	70 (+0.866)	0,24
2	9 (+0.5)	70 (+0.866)	0
3	6 (-1.0)	50 (0.0)	0,11
4 (CP*)	8 (0.0)	50 (0.0)	0,96
4 (CP*)	8 (0.0)	50 (0.0)	0,96
4 (CP*)	8 (0.0)	50 (0.0)	0,96
5	10 (+1.0)	50 (0.0)	0
6	7 (0.0)	30 (-0.866)	0,52
7	9 (+0.5)	30 (-0.866)	0,18

*CP: Ponto central

O modelo se ajustou aos dados experimentais do presente estudo obtidos na otimização de β -1,3-glucanase, que descreve a superfície de resposta, bem como a linha de contorno, foi baseada na equação abaixo, onde (U) corresponde à atividade enzimática (unidades), T corresponde à temperatura, pH corresponde ao pH.

$$\text{Atividade (U)} = -17,4974 + 3,3244.\text{pH} - 0,2158.\text{pH}^2 + 0,1014.\text{Temperatura} - 0,0012.\text{Temperatura}^2 + 0,0012.\text{pH}.\text{Temperatura}$$

De acordo com a análise de variância (ANOVA) (Tabela 8), os dados experimentais se ajustaram ao experimento ($p < 0,05$). A análise baseada no teste de Fisher (F) indicou que a equação ajustada foi estatisticamente significativa ($F_{\text{calculado}} = 19,25 > F_{\text{tabulado}} = 9,01$) e que a falta de ajuste ($F_{\text{calculado}} 0,0000 < F_{\text{tabelado}} 0,0003$) mostrou conformidade entre o modelo de resposta prevista e nos valores experimentais em cada uma das variáveis analisadas. O coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,96, e indicou que 96% da variação total na atividade residual foi explicada.

Tabela 8: Análise de variância.

Tabela Anova					
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	1,259060	5	0,251811928	19,2557771	9,01
Resíduo	0,039232	3	0,013077215		
Falta de ajuste	0,036820	1	0,036820	0,000000	0,000399
Puro erro	0,002411	2	0,001206		
SQ total	1,298291	8			
$r^2 = 0,96978$					

SQ soma dos quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno representam de forma gráfica os resultados (Figuras 4a e 4b).

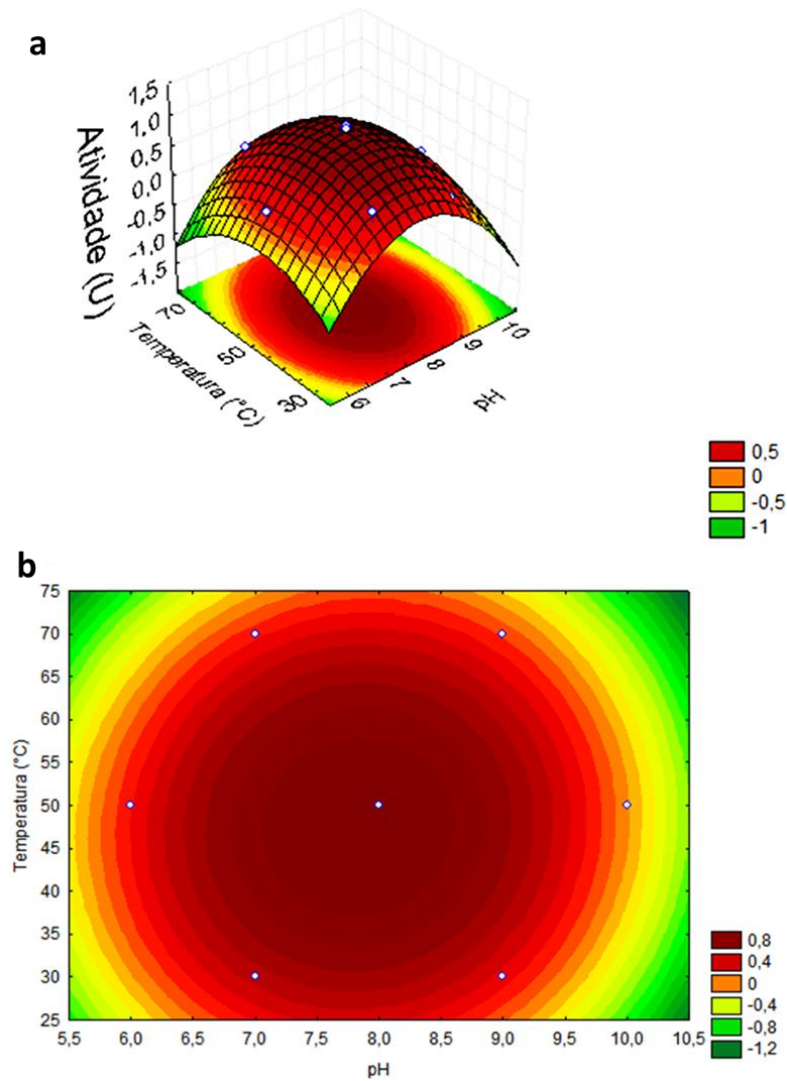


Figura 4:a) Superfície de resposta para otimização de temperatura x pH na atividade β -1,3-glucanase de *R. oryzoicola*; b) Gráfico de contorno da metodologia de superfície de resposta de temperatura x pH para atividade β -1,3-glucanase de *R. oryzoicola*

%.

No gráfico de pareto (Figura 5), pode-se observar o efeito das variáveis investigadas. Aqueles que ultrapassaram a linha tracejada são significativos, enquanto os fatores que não ultrapassaram a linha não são significativos, portanto, não influenciaram a atividade da enzima ao nível de significância de 95%. No estudo, pode-se observar que a temperatura e o pH influenciaram positivamente na atividade enzimática.

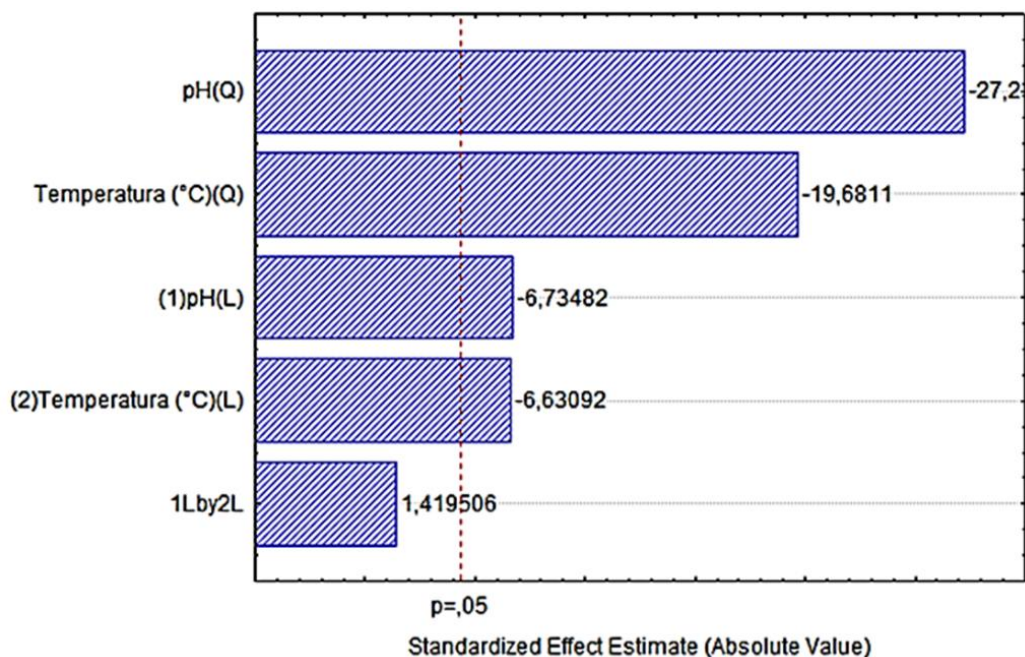


Figura 5. Diagrama de Pareto para interação das variáveis analisadas usando a matriz de Doehlert. Influência do pH e da temperatura na atividade β -1,3-glucanase da enzima de *R. oryzae*.

A partir da construção dos gráficos dos ensaios de otimização de temperatura e pH ótimos das amostras contendo as enzimas pelo software Statistica 6.0, pôde-se analisar que efeitos de temperatura e pH na atividade enzimática são significativos. A atividade de β -1,3-glucanase apresentou valores ótimos em pH 8 e temperatura 50 °C, com atividade enzimática igual a 0,9601 U/mL ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

A metodologia de superfície de resposta também foi testada por Santana et al. (2018) para otimizar a temperatura e pH inicial para a produção de β -1,3- glucanase pela *R. oryzae*, em fermentação submersa utilizando glicose como fonte de carbono. Inicialmente os pesquisadores avaliaram o crescimento da levedura concomitantemente à produção de β -glucanase e, observaram que a maior atividade, 1,23 UA/ml ($\mu\text{mol}/\text{min}$), ocorreu após 48 h na fase exponencial. No estudo realizado, a atividade enzimática foi avaliada após 120 h, o período prolongando de fermentação pode levar a redução de células viáveis reprimindo a quantidade de enzimas liberadas no meio extracelular o que pode justificar a diferença no rendimento da atividade enzimática nos dois estudos. Além disso, as leveduras usadas diferem em relação ao local de isolamento e na sequência identificada.

Lopes et al. (2014) otimizaram as condições de pH e temperatura para a atividade de β -glucanase produzida por *Kluyveromyces marxianus*, também utilizando metodologia de superfície de resposta. Os autores observaram que essas variáveis influenciam significativamente a atividade enzimática demonstrando que as melhores condições foram

observadas em pH e temperatura de 5,5 e 53 °C, respectivamente. Os autores descobriram que em pH superior a 5 houve o decréscimo da atividade enzimática, indicando que a β -glucanase produzida por esta levedura tem melhor desempenho em condições ácidas. O oposto observado nesta pesquisa em que a condição ótima ocorre em pH alcalino. Isso comprova que as condições ótimas de temperatura e pH variam entre as espécies de leveduras.

Ao estudar endo- β -1,4-glucanase monoespecífica pertencente à família 5 da glicosil hidrolase (GH5) derivada de análise de metagenoma, Wierzbicka-Woś et al. (2019) observaram que as enzimas também são mais ativas em condições ligeiramente ácidas, a maior atividade enzimática ocorreu em pH 6,5, porém, apresenta alta tolerância à variação de pH permanecendo estável na faixa de pH 4,5-8,5; com relação à temperatura a atividade mais elevada foi observada a 40 °C, mas CelRH5 é psicotolerante, sendo mais ativa e estável em temperatura abaixo de 30 °C.

Zhang et al. (2019) estudaram uma β -1,3-glucanase de trigo expressa em *Pichia pastoris* X-33 e, concluíram que a β -1,3-glucanase exibe atividade ótima em pH 6,5, permanecendo relativamente alta em pH 5,5–8,0. A temperatura ótima de reação foi registrada em 50 °C, retendo aproximadamente 84,0% da atividade residual após tratamento térmico a 50 °C por 1h. A expressão de enzimas exógenas em *P. pastoris* oferece muitas vantagens, incluindo sua facilidade de uso em relação a outros sistemas de expressão eucariótica, a possibilidade de expressão de proteínas exógenas em grande quantidade e sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais eucarióticas (Xu et al., 2006).

Wang et al. (2007) descreveram as condições ótimas para a β -1,3-glucanase isolada e caracterizada de fungo *Trichoderma koningii* ZJU-T. A temperatura e o pH ótimo da reação para a β -glucanase foram 100 °C e 2,0, respectivamente. A β -glucanase apresentou maior estabilidade em altas temperaturas e menores valores de pH quando comparada às demais β -glucanases já estudadas. Em estudos anteriores realizados por Monteiro et al., (2006) com β -1,3-glucanase produzida pela mesma espécie de fungo, os pesquisadores observaram que a enzima também foi altamente ativa em condições ácidas, com um pH ideal de 4,2 e a atividade máxima em 50 °C. Geralmente, as β -1,3-glucanases de *Trichoderma* têm pH ótimo em uma faixa ácida de 4,0 e 6,2 e, em geral, apresentam alta atividade na faixa de temperatura de 40-60 °C e a estabilidade diminuiu drasticamente após 60 °C.

A otimização dos parâmetros de pH e temperatura de β -1,3-glucanase de *Rhodotorula oryzzicola* não corrobaram em sua plenitude com as β -glucanases produzidas por leveduras, uma vez que o pH ótimo apresentando neste trabalho encontra-se em pH alcalino, o oposto é

observado nas glucanases estudadas por outros pesquisadores. No entanto, a temperatura ótima encontra-se na faixa dos trabalhos já apresentados.

Yang et al. (2014) em seu trabalho obtiveram β -glucase alcalina produzida pelo fungo termofílico *Malbranchea cinnamomea*, onde o pH ótimo da enzima foi 10. Os autores destacam que enzimas ativas em pH alcalino são atraentes para várias indústrias com o destaque para as de produção de detergentes, indústrias de papel e celulose onde os processos ocorrem na faixa de pH alcalino. Nesse sentido, a β -1,3-glucanase produzida por *R. oryzae* surge como uma alternativa para uso industrial uma vez que organismos unicelulares apresentam elevada taxa de reprodução em curto intervalo de tempo, além disso, com o advento da engenharia genética as condições de síntese enzimática podem ser potencializadas.

5.2 TERMOESTABILIDADE

Nas reações catalisadas por enzimas, o aumento da temperatura, até certo ponto, leva ao aumento da velocidade de reação, porém, elevadas temperaturas também aumentam a possibilidade de desnaturação da enzima. Nesse sentido, a termoestabilidade é um dos principais fatores a ser considerado na seleção de enzimas para fins industriais (PACHECO; MENDES, 2021).

A Figura 6 mostra a termoestabilidade do extrato enzimático de β -1,3-glucanase em função do tempo de incubação, na faixa de temperatura de 50 a 70 °C, onde é possível observar que a atividade enzimática se manteve em 100% e 94,6% nas temperaturas de 50 °C e 60 °C, respectivamente, após 30 min. A atividade residual em 70 °C pelo mesmo período manteve-se em 62,39%.

A presença de β -glucanases estáveis em temperaturas superiores a 50 °C em leveduras *Kluyveromyces marxianus* foi relatado por Lopes (2014), no entanto, esses autores constataram que temperaturas superiores a 60 °C causaram redução da atividade enzimática. Resultado equivalentes foram relatados por Rodríguez-Mendoza et al. (2019) ao estudar termoestabilidade de exo- β -1,3-glucanase *Thielavia terrestris*.

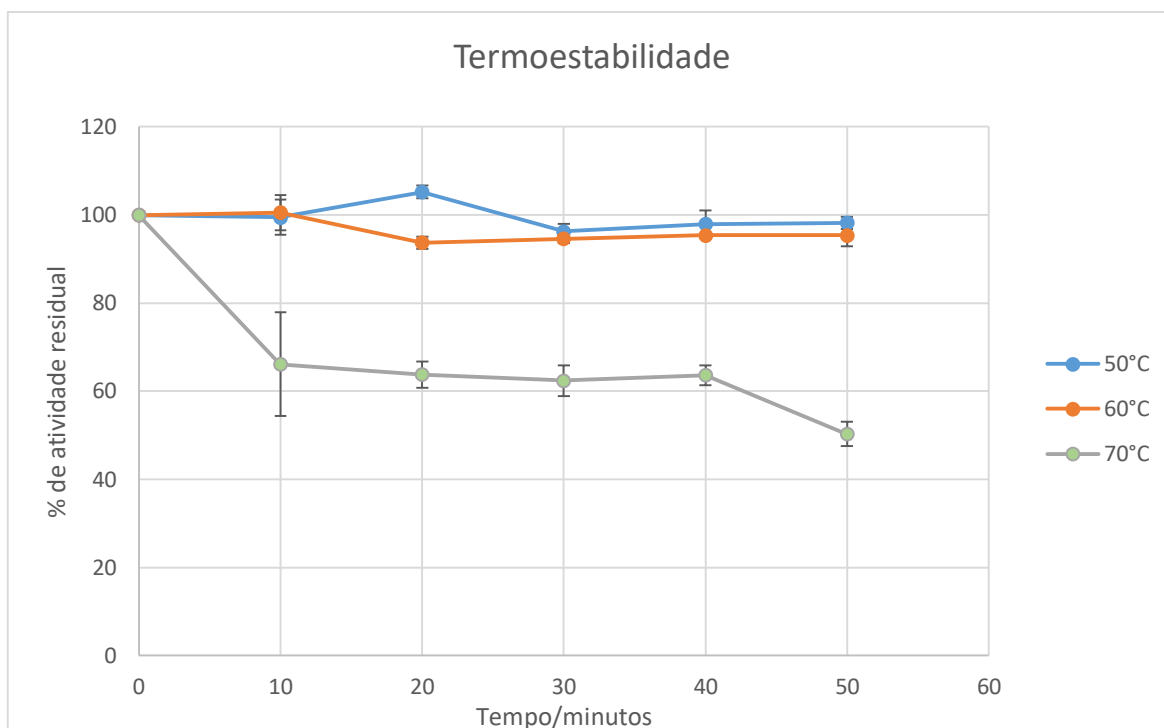


Figura 6. Efeito de estabilidade de β -1,3-glucanase de *Rhodotorula oryzae*. A reação enzimática foi realizada em pH 8 usando solução tampão (fosfato 0,10 mol/L) em temperatura de 50 °C. A atividade foi expressa em atividade residual (%).

Os experimentos realizados por Bagewadi et al. (2016) também corroboram com os resultados apresentado nesse estudo. Ao estudar a termoestabilidade de uma β -glucanase produzida por *Trichoderma harzianum* HZN11 observaram que a enzima se mostrou estável em temperatura entre 50–70° C, indicando alta termoestabilidade. Já Alvarez et al. (2015) descreveram um novo membro da família GH16 derivado de metagenoma de solo em que a enzima é ativa contra o beta-glucano da cevada, laminarina, liquenano, mantendo a estabilidade térmica entre 30 e 40 °C por 18 h, enquanto em temperaturas acima de 40 °C foi muito instável.

Os resultados de Vijayendra e Kashiwagi (2009) mostram que a β -glucanase de *Rhizoctonia solani* é altamente estável entre 30 e 40 °C por 1h, sendo que a maior atividade foi observada a 40 °C e a atividade diminuiu consideravelmente com aumento adicional da temperatura, evidenciando menor termostabilidade quando comparada a este trabalho.

Segundo Zhao et al. (2020) de acordo com a temperatura ideal as enzimas são classificadas como mesófilas (40-60 °C), termofílicas (50-80 °C) e extremofílicas, (> 80 °C). A maioria das enzimas fúngicas são mesófilas, com temperaturas ideais entre 40 e 60 °C, e nessas condições, a enzima apresenta perfil para tolerar as condições impostas em alguns

processos industriais (WIERZBICKA-WÓŚ et al., 2019). Sendo assim, considerando estas características, a enzima produzida neste estudo se caracteriza como mesofílica.

Glucanases com estabilidade térmica em temperaturas elevadas são descritas na literatura. Santana et al. (2018), ao testar a termoestabilidade de β -1,3-glucanases produzidas por *R. oryzaicola* constataram que estas enzimas permaneceram estáveis por uma hora quando submetidas à temperatura de 90 °C, e apresentaram atividade residual de aproximadamente 88%.

Sena et al. (2011) avaliaram a termostabilidade de β -1,3-glucanase de *M. pernicioso*, os resultados demonstraram que a enzima apresentou alta estabilidade térmica, perdendo apenas 10,20% de sua atividade específica após 40 minutos de incubação a 90 °C. Esses resultados são interessantes, uma vez que, em processos industriais a termoestabilidade enzimática é pré-requisito. Zhang et al. (2019) ao estudar a expressão gene β -1,3-glucanase de trigo em *Pichia pastoris* observaram que a enzima reteve aproximadamente 84,0% da atividade residual após tratamento térmico a 50 °C por 1 h.

Segundo Ali et al. (2019), as β -glucanases fúngicas são preferidas nas indústrias de fermentação tradicionais, como na fabricação de cerveja e alimentos para animais, devido às suas características potencialmente seguras e eficientes na digestão de β -glucanas promovendo a redução da viscosidade durante o processo industrial. No entanto, a β -glucanase apresentada nesse estudo apresenta baixa termoatividade em temperaturas superiores a 60°C o que inviabiliza o uso nos processos de mosturação (50-70 ° C) e para o revestimento de pelotas de ração que ocorre entre 70-90 °C. Entretanto, poderia ser aplicada em etapas subsequentes do processo de vinificação como, por exemplo, na filtração com o propósito de reduzir a viscosidade do mosto (YANG et al., 2021).

5.3 EFEITO DO NaCl

Os sais metálicos têm capacidade de aumentar ou inibir a atividade enzimática, agindo como cofatores, que são pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas que se ligam à enzima. Por isso a ação do NaCl sobre o extrato enzimático foi avaliada neste estudo (Figura 7). Os resultados demonstraram que o aumento da atividade é proporcional ao aumento da concentração do sal. O aumento da concentração do NaCl de 0,4 para 0,6 mol/ L promoveu um aumento de cerca de 1,5 vezes na atividade enzimática e depois manteve-se estável.

Valores expressivos também foram encontrados por Ariaenejad et al. (2020) ao estudar efeito de NaCl em uma β -glucanase responsável por degradar celulose, em que observaram que a concentrações de até 5M favoreceram a atividade enzimática.

A concentração de NaCl (1–3 mM) também aumentou significativamente as propriedades termotolerantes e halofílicas de celulasas secretadas por *Aspergillus terreus* UniMAP AA-6 (GUNNY et al., 2014). Segundo Karan et al. (2012) os sais provocam possíveis alterações na carga da superfície das proteínas e as interação iônica favorecem a tolerância em alta temperatura (KARAN et al., 2012).

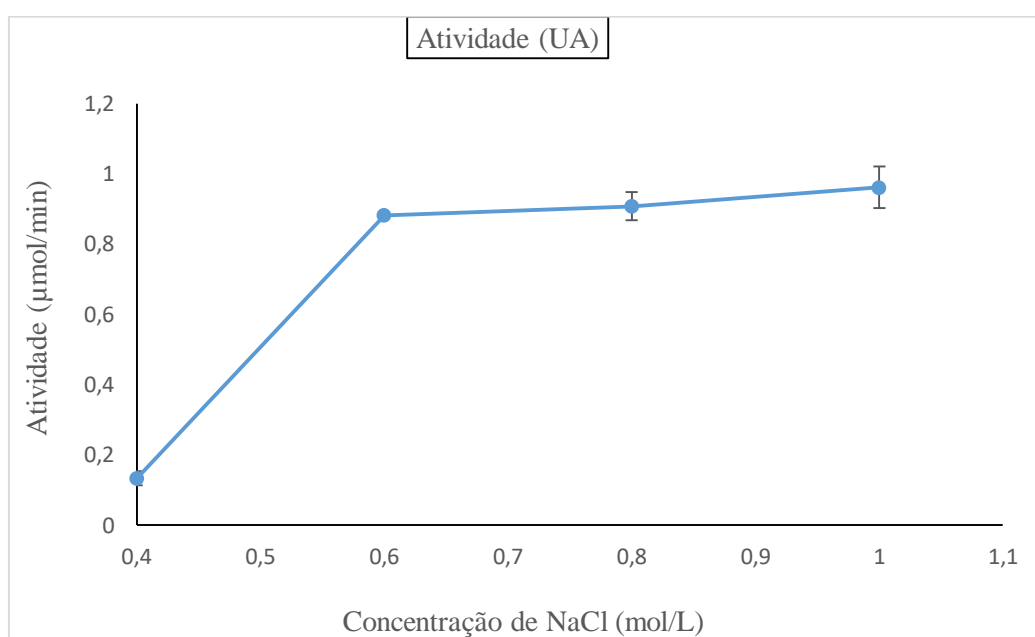


Figura 7 O efeito do NaCl na atividade da β -1,3-glucanase de *R. oryzae* na faixa de 0,2-1 mol/L.
¹ Todas as reações foram realizadas em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 8) a 50 °C por 15 min.

Trabalho apresentado por Peng et al., (2009) demonstrou que Li⁺, Ni²⁺ e Ba²⁺ (nas concentrações de 5,0 e 10,0 mM) estimulou significativamente a atividade do β -1,3-glucanases de *W. saturnus* WC91-2. No entanto, Mn²⁺ Ca²⁺ K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, e Fe²⁺ (nas mesmas concentrações) atuaram como inibidores e, com Mn²⁺ (em concentrações de 10,0 mM) mostrando menor atividade, sugerindo que eles foram capazes de alterar a conformação da enzima. Monteiro et al., (2006) observaram em suas pesquisas que o Hg²⁺ também foi um forte inibidor da atividade enzimática β -glucanase; segundo os autores a completa inibição por íons de mercúrio pode indicar a importância de aminoácidos indol na função enzimática.

Tang et al., (2012) investigaram uma β -glucanase produzida pelo fungo termofílico *Rhizomucor miehei* CAU43, eles observaram que a atividade foi fortemente inibida por Cr²⁺,

Ag^+ e Fe^{3+} , e moderadamente inibida por Mn^{2+} , β -mercaptoetanol, EDTA, Cu^{2+} Sr^{2+} , K^+ , Zn^{2+} e Ni^{2+} . No entanto, a atividade da enzima foi aumentada por SDS e Mg^{2+} . Além disso, a enzima purificada foi moderadamente inibida pelo metal quelante, EDTA e β -mercaptoetanol, indicando que os íons metálicos são necessários e que as ligações dissulfeto podem estar envolvidas na atividade catalítica.

Jiang et al., (2017) avaliaram a ação de íons metálicos em β -1,3-glucanase de *Chaetomium cupreum* expressa em *Pichia pastoris*, eles chegaram à conclusão de que os íons K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Zn^{2+} , não afetaram a atividade; Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ e Hg^{2+} , teve efeitos inibitórios sobre a enzima; Ba^{2+} , promoveu o aumento da atividade em 15%. Os autores destacam que os íons metálicos desempenham um papel importante em muitas reações enzimáticas, mas seus efeitos variam nas diferentes β -1,3-glucanases.

Ariaeenejad et al. (2020) destacam que enzimas tolerantes ou ativas na presença de íons metálicos ou inibidores enzimáticos as tornam promissoras em processos biotecnológico, uma vez que alguns métodos ocorrem em condições alcalinas ou ácidas que podem gerar a formação de sais.

5.4 ESTABILIZAÇÃO DE β -1,3-GLUCANASE PELA ADIÇÃO DE ADITIVOS QUÍMICOS

A otimização de mistura consiste em uma técnica que visa encontrar as proporções melhores dos componentes envolvidos utilizando projeto de mistura com o modelo simplex centroide que é representado por um triângulo cujos vértices correspondem ao componente isolado e as bordas correspondem às misturas dos componentes envolvidos no estudo. No planejamento estudado, os níveis experimentais são definidos pelas relações $1/q$ para q indo a 1 até o número de componentes, por exemplo, com $q=3$ que corresponde a: (1/1), 0,5 (1/2) 1/3 e o 0 (SQUE et al., 2021).

No estudo foram avaliados a solução estabilizante aplicada no extrato enzimático. Três componentes (cloreto de sódio - SC, benzoato de sódio - SB e fosfato monossódico - MSP) foram avaliados em uma mistura estabilizante utilizando um planejamento de mistura simplex-centroide. Na Tabela 8 estão presentes como proporções dos componentes nos respectivos experimentos realizados e a Resposta Múltipla (RM) baseada a partir das atividades nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h.

Tabela 9. Matriz experimental do projeto de mistura simplex-centroide e resposta múltipla.

Experimento	Cloreto de Sódio SC (ml)	Benzoato de sódio SB (ml)	Fosfato monossódico MSP(ml)	Resposta múltipla MR (U.mL ⁻¹)
1	1.00	0.00	0.00	1.434
2	0.00	1.00	0.00	2.434
3	0.00	0.00	1.00	1.925
4	0.50	0.50	0.00	2.396
5	0.50	0.00	0.50	2.208
6	0.00	0.50	0.50	2.396
7 (CP*)	0.33	0.33	0.33	2.453
8 (CP)	0.33	0.33	0.33	2.415
9 (CP)	0.33	0.33	0.33	2.415

*CP:Ponto central

Com base nos dados experimentais, foram encontrados através dos modelos matemáticos, as condições ótimas para obter a máxima atividade. A partir da ANOVA (Tabela 10), o modelo polinomial de segunda ordem em termos quadráticos foi avaliado.

Tabela 10. Análise de variância para o modelo quadrático obtido usando a resposta múltipla.

Fonte de variação	SS	Df	MS	F-calculado	p-value
Regressão	0.939	5	0.188	216.3	<0.001
Falta de ajuste	0.002	1	0.002	3.4	0.205
Erro puro	0.001	2	<0.001		
Total	0.942	8	0.118		

Soma dos quadrados (SS), graus de liberdade (Df), quadrados médios (MS)

A regressão apresentou significância estatística ($p < 0,05$), isto é, os indícios estatísticos indicam que o modelo descreve o sistema e suas interações satisfatoriamente. Também não foram encontrados indicativos de falta de ajuste, tendo em vista que o valor de F-calculado (3,4) < F-tabulado (18,5). Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de determinação determinante (R^2 -verifique) foram 0,997 e 0,992, indicando que a regressão foi capaz de descrever 99,7% da variabilidade dos dados. Com base nesses parâmetros, foi possível demonstrar que o modelo tipificado (Equação 2) apresentou excelente capacidade preditiva, portanto, foi utilizado para obtenção da condição ótima e estudo dos efeitos padronizados.

$$MR = 1.44SC + 2.44SB + 1.93MSP + 1.76SC \times SB + 2.02SC \times MSP + 0.77 SB \times MSP \quad (2)$$

A partir do modelo, foram estimados os efeitos padronizados originados no gráfico de pareto (Fig. 8a). Na mistura, verificou-se que todos os componentes individuais apresentaram efeitos, sugerindo que o aumento percentual favoreceu o aumento da resposta experimental. Contudo, o SB apresentou efeito mais elevado e, deste modo, uma mistura com maior percentual de SB apresentou melhores resultados. Além disso, constatou-se a existência de interações positivas e estatisticamente relacionadas entre os componentes, sugerindo que uma mistura com um pequeno percentual dos componentes individuais, que apresentaram menores efeitos padronizados também contribuiu com o fornecimento de melhores condições no sistema em questão.

Finalmente, com base no modelo, foi obtido o gráfico de contorno (Fig. 8b) e a condição ótima prevista. No gráfico de contorno é possível observar uma região (coloração vermelha) ampla que fornece o máximo de atividade com uma mistura com maior proporção de SB (coloração vermelha). O cálculo do ponto crítico forneceu uma mistura composta por 20% de SC, 70% de SB e 10% de MSP.

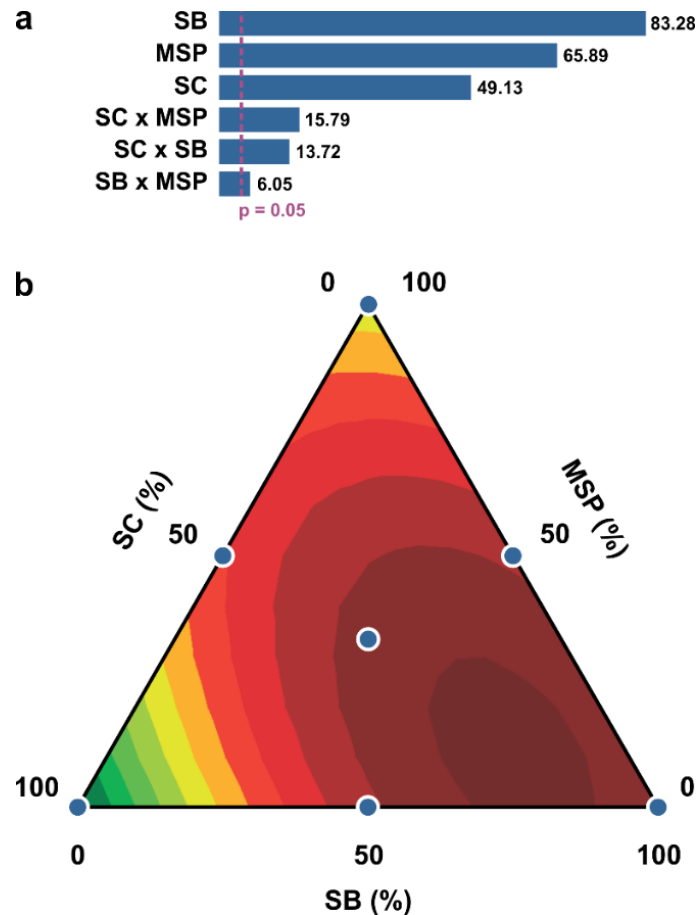


Fig. 8. a) Gráfico de Pareto, b) Superfície de resposta do modelo cúbico para atividade β-1,3- glucanase em função da mistura de conservantes cloreto de sódio, fosfato monobásico, benzoato de sódio

A metodologia de mistura é um experimento usado para identificar substâncias que exibem efeitos significativos em uma variável dependente-alvo que resulta em valores máximos ou mínimos em experimentos de misturas, bem como usado para determinar a proporção ideal da mistura destas três variáveis. Nesse estudo foi usada a metodologia para identificar a proporção ideal de conservantes comumente utilizados para preservar alimentos.

Pesquisadores avaliam a adição de diferentes aditivos químicos na mistura reacional com o objetivo de avaliar os efeitos sob a atividade enzimática. Gonçalves et al. (2020) avaliaram o efeito de detergentes, solventes, sais de metal na atividade enzimática de β-glucanase, e observaram que o dodesil sulfato de sódio (SDS) (0,5%) afetou positivamente a atividade enzimática promovendo um aumento de 9% na atividade; o NaCl também promoveu um pequeno aumento da atividade, em concentrações elevada. Por outro lado, os íons estudados por eles não apresentaram efeito positivo na atividade. Ariaenejad et al. (2020) também observaram que o NaCl interfere positivamente na atividade, mas quanto aos sais metálicos, os íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} foram capazes de manter a atividade enzimática.

Li et al. (2017) estudaram que para a endoglucanase produzida pelo fungo halotolerante *Aspergillus glaucus* CCHA, cujo gene que codifica a enzima foi expresso em *Pichia pastoris*, após purificação e caracterização, constataram que a enzima é ativa em altas concentrações de NaCl (1 a 4 M) e, além disso, também se mostrou estável em condições de calor e ambiente alcalino. Jiang et al. (2017) caracterizaram β -glucanase clonada a partir de fungo entomopatogênico *Chaetomium cupreum* expressa em *Pichia pastoris* e, ao avaliar os efeitos dos íons metálicos observaram que o Ba^{2+} induz ao aumento da atividade, enquanto Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ e Hg^{2+} tiveram efeitos inibitórios. Em β -glucanase produzida por *Williopsis saturnus* WC91-2 o íon Ba^{2+} também teve efeito positivo, bem como os efeitos negativos também foram relatados para os íons Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} (PENG et al., 2009).

Manavalan et al. (2015) avaliaram os efeitos de diferentes sais metálicos, inibidores, surfactantes e solventes na atividade de uma endoglucanase, a atividade foi fortemente estimulada na presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , enquanto Hg^{2+} , Cr^{2+} , Fe^{2+} inibiram severamente a enzima, tal qual o etilenodiamico tetracético sal dissódico (EDTA) e N-bromossuccinimida (NBS). O estudo também revelou que vários solventes hidrofóbicos não polares como hexano, benzeno e clorofórmio aumentaram a atividade enzimática.

Dessa forma, fica evidente que os íons são essenciais para o funcionamento das enzimas. Segundo Ptacek et al. (2018) de mais de um terço das proteínas existentes, elas podem afetar a ionização de alguns resíduos de aminoácidos, alterando sua estrutura e atividade enzimática. Os conservantes pesquisados nesse estudo têm em sua composição Na^+ como cátion que podem influenciar na manutenção da atividade enzimática. Segundo os estudos de Sena (2011), esse o íon metálico favorece a atividade enzimática de β -1,3-glucanase.

O cloreto de sódio é um íon metálico importante que atua de diferentes formas sob a atividade enzimática das glucanases. No trabalho desenvolvido por Cherdvorapong et al. (2018) a enzima teve atividade superior a 140% quando tratada com NaCl a 15% (p/v); efeito similar foi descrito por Regmi (2019) ao observar que a concentração de NaCl entre 3,5-12,5% favoreceu a atividade enzimática de endoglucanase. Já Sakdapestsiri (2016) ao estudar a ação do sal sob uma β -1,3-glucanase, observaram que a presença do sal se mostrou indiferente à atividade da enzima.

O benzoato de sódio é um sal de ácidos orgânicos comumente usado para prevenir o crescimento de fungos e bactérias em produtos alimentícios e são sintetizados a partir da reação de hidróxido de sódio com ácido benzóico (TOSH et al., 2012). Para a FAO/OMS o aditivo é

seguro e apresenta baixa toxicidade em humanos considerado seguro para a conservação dos alimentos quando utilizado em concentrações adequadas (AMIRPOURAD et al., 2015).

O fosfato monossódico é um composto inorgânico utilizado amplamente como tampão, no tratamento de água, alimentos e bebidas: em alimentos têm por função aumentar a capacidade de retenção da água e proteger contra a acidez oxidativa, o que se traduz por melhoria na qualidade do produto final, garantindo uma sensível melhora na aparência, sabor, aroma, textura. Além disso, o composto também é aplicado no tratamento de hiperfosfatemia, hipocalcemia devido suas propriedades quelantes de metal (WONG; STENSTROM, 2021; TREWBY et al., 2016; BLANCO et al., 2011).

Na literatura há vários estudos sobre a ação de ativadores e inibidores de atividade enzimática de β -glucanase, os efeitos dos íons e outros componentes químicos são vários a depender da fonte e do tipo de enzima e da fonte onde foi extraída, nesse sentido os pesquisadores buscam compreender esses mecanismos para encontrar quais condições as enzimas apresentam melhor atividade e estabilidade e assim identificar em quais processos elas podem ser empregadas já que as condições industriais são variáveis.

6 CONCLUSÃO

A levedura *Rodhotorula oryziicola* produziu β -1,3-glucanase extracelular em fermentação submersa apresentou atividade ótima em pH 8,0 e temperatura de 50 °C a partir da metodologia de superfície de resposta. A enzima apresentou termoestabilidade a 60°C que a torna viável para aplicações em alguns processos industriais.

A proporção da mistura dos conservantes cloreto de sódio, benzoato de sódio e fosfato monossódico -que melhor favoreceu a estabilidade foi de 20%, 70% e 10%, respectivamente, sendo que os resultados mostraram que a mistura de conservantes foi eficiente na manutenção da da atividade de β -glucanases.

O presente estudo mostra que a levedura *R. Oryziicola* produz β -1,3-glucanase, podendo ser uma fonte promissora de enzima extracelular para fins industriais e biotecnológico principalmente para processos que ocorram em condições alcalinas como na produção de detergentes e papel e celulose.

REFERÊNCIAS

- AALBERS, Friso S.; FRAAIJE, Marco W. Enzyme fusions in biocatalysis: coupling reactions by pairing enzymes. *ChemBioChem*, v. 20, n. 1, p. 20, set. 2019.
- ABDALLH, M. E. et al. Energy and protein utilisation by broiler chickens fed diets containing cottonseed meal and supplemented with a composite enzyme product. *British Poultry Science*, v. 61, n. 4, p. 424-432, nov. 2020.
- ABU, Mary Ladidi et al. Optimization of physical conditions for the production of thermostable T1 lipase in *Pichia guilliermondii* strain SO using response surface methodology. *BMC biotechnology*, v. 17, n. 1, p. 1-10, nov. 2017.
- ADHIKARI, Sunita. Application of immobilized enzymes in the food industry. In: *Enzymes in Food Biotechnology* Academic Press, 2019. p. 711-721.
- AGEITOS, Jose Manuel et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 4, p. 1219-1227, abr. 2011.
- AGUSTINI, Bruna Carla. et al. MALDI-TOF MS Supplementary database for species identification employing the yeast diversity encountered on southern Brazil grapes. *Folia microbiologica*, v. 63, n. 6, p. 685-693, may. 2018.
- ALI, Barkat et al. Characterization of a fungal thermostable endoglucanase from Chinese Nong-flavor daqu by metatranscriptomic method. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 121, p. 183-190, jan. 2019.
- Allied Market Research, 2020. Enzymes Market Overview.
<https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market> (accessed 25 Ago 2021).
- ALTERTHUM, Flávio. (Org). *Biotechnologia Industrial*, Volume 1, Fundamentos, 1 ed., São Paulo, Edgard Blücher., 2020, 254 p.
- ALTINKAYNAK, Cevahir et al. Evaluation of organic-inorganic hybrid nanoflower's enzymatic activity in the presence of different metal ions and organic solvents. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 164, p. 162-171, dec. 2020.
- ALVAREZ, Thabata Maria et al. A novel member of GH16 family derived from sugarcane soil metagenome. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 177, n. 2, p. 304-317, aug. 2015.
- AMIRPOUR, Mansooreh et al. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, v. 8, n. 2, p. 142-148, feb. 2015.
- ANDRADE, Ana Camila et al. Diversity of microbial carbohydrate-active enzymes (CAZYmes) associated with freshwater and soil samples from Caatinga biome. *Microbial Ecology*, v. 74, n. 1, p. 89-105, jan. 2017.

ARIAEENEJAD, Shohreh et al. A novel high performance in-silico screened metagenome-derived alkali-thermostable endo- β -1, 4-glucanase for lignocellulosic biomass hydrolysis in the harsh conditions. *BMC biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 1-13, oct. 2020.

BAGEWADI, ZABIN K et al. "Purification and characterization of endo β -1, 4-d-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse." *3 Biotech* v. 6, n. 1, p.101, abr. 2016.

BAGEWADI, Zabin K.; MULLA, Sikandar I.; NINNEKAR, Harichandra Z. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 139-150, jun. 2017.

BANERJEE, Goutam; RAY, Arun Kumar. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 33, n. 2, p. 119-143, nov. 2017.

BARBOSA, Paula Mirella Gomes et al. Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructooligosaccharides. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 48, n. 6, p. 506-513, jun. 2018.

BAUERMEISTER, Anelize et al. β -(1 \rightarrow 3)-Glucanolytic yeasts from Brazilian grape microbiota: production and characterization of β -Glucanolytic enzymes by *Aureobasidium pullulans* 1WA1 cultivated on fungal mycelium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 1, p. 269-278, jan. 2015.

BENTIL, Joseph A. et al. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 14, p. 5827-5839, may. 2018.

BEOPOULOS, Athanasios et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, n. 6, p. 375-387, nov. 2009.

BERLEMONT, Renaud. Distribution and diversity of enzymes for polysaccharide degradation in fungi. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-11, mar. 2017.

BHARATHI, Devaraj; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101368, nov. 2019.

BLANCO, Carlos A. et al. Improving gluten-free bread quality by enrichment with acidic food additives. *Food Chemistry*, v. 127, n. 3, p. 1204-1209, aug. 2011.

BORZOVA, Nataliya. et al. Purification and Characterization of a Naringinase from *Cryptococcus albidus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 184, n. 3, p. 953-969, sep. 2018.

BOUGREAU, Matthias et al. Yeast species isolated from Texas High Plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes. *PLoS One*, v. 14, n. 5, p. e0216246, may, 2019.

BOYCE, Angela; WALSH, Gary. Expression and characterisation of a thermophilic endo-1,4- β -glucanase from *Sulfolobus shibatae* of potential industrial application. *Molecular Biology Reports*, v. 45, n. 6, p. 2201-2211, set 2018.

BRANDÃO, Luciana. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiol Ecology*. v.76, p. 1-13, apr. 2011.

CARREIRO, Solange Cristina et al. Atividade celulolítica de leveduras isoladas de frutos de palmeiras. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 36, n. 1, 2019.

CARVALHO, Jéssyca Ketterine et al. Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, v. 30, p. e00630, jun. 2021.

CASEIRO, Catarina et al. From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of β -Glucans and β -1,3-Glucanases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 6, p. 3156, 2022.

CHAARI, Fatma. et al. Biochemical characterization of a lichenase from *Penicillium occitanis* Pol6 and its potential application in the brewing industry. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 6, p. 1040-1046, jun. 2014.

CHAARI, Fatma; CHAABOUNI, Semia E. Fungal β -1,3-1,4-glucanases: production, properties and biotechnological applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 6, p. 2657-2664, nov. 2019.

CHADHA, Bhupinder S. et al. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: current perspective. *Bioresource technology*, v. 277, p. 195-203, apr. 2019.

CHAUD, Luciana.C. et al. Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 807-814. Dec. 2016

CHEN, Hanchi et al. Glycosyl hydrolase catalyzed glycosylation in unconventional media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 1-12, oct. 2020.

CHERDVORAPONG, Vipavee et al. Enzymatic and molecular characterization of α -1,3-glucanase (AglST2) from *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3 and its relation with α -1,3-glucanase HF65 (AglST1). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2018.

CHREPTOWICZ, Karolina et al. Carotenoid-producing yeasts: identification and characteristics of environmental isolates with a valuable extracellular enzymatic activity. *Microorganisms*, v. 7, n. 12, p. 653, dec. 2019.

CHUA, Chengwei et al. High-level expression of a specific β -1,3-1,4-glucanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 88, n. 2, p. 509-518, jul. 2010.

CLAUS, Harald; MOJSOV, Kiro. Enzymes for wine fermentation: Current and perspective applications. *Fermentation*, v. 4, n. 3, p. 52, jul. 2018.

CSHLANDER, Martina et al. Purification and properties of yeast proteases secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and *Metschnikovia pulcherrima* 446 during growth in a white grape juice. *Fermentation*, v. 3, n. 1, p. 2, dec. 2017.

DA SILVA, Adejanildo Pereira et al. Evaluation of the influence of high and low cost inputs on the production of different metabolites by *Yarrowia lipolytica* for use in the food industry. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 4, p. 20544-20553, mar. 2020.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues, et al. "Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant β -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1. 2." *Journal of Biotechnology* 294: 73-80, mar. 2019.

DAYO-OWOYEMI, Ifeloju, et al. "Wickerhamiella kiyanii fa, sp. nov. and Wickerhamiella fructicola fa, sp. nov., two yeasts isolated from native plants of Atlantic rainforest in Brazil." *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v.64, p. 2152-2158, jun. 2014.

DE FREITAS, Maria de Fátima Matos et al. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 43, n. 4, p. 711-722, jan. 2020.

DE MORAIS Júnior, W. G. et al. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expression and Purification*, v. 123, p. 26-34, jul. 2016.

DE OLIVEIRA, Juliana Mota et al. Characterization and immobilization of protease secreted by the fungus *Moorella speciosa*. *3 Biotech*, v. 10, n. 10, p. 1-14, sep. 2020b.

DE OLIVEIRA, Juliana Mota et al. Production, characterization, and immobilization of protease from the yeast *Rhodotorula oryzzicola*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 68, n. 5, p. 1033-1043, sep. 2020a.

DE SALES, Alenir Naves et al. Use of lignocellulose biomass for endoxylanase production by *Streptomyces termium*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 47, n. 5, p. 505-512, feb. 2017.

DELGADO-GARCÍA, Mariana et al. Bioprospection of proteases from *Halobacillus andaensis* for bioactive peptide production from fish muscle protein. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 39, p. 52-60, may. 2019.

DING, Changhe; LI, Mengxing; HU, Yuqi. High-activity production of xylanase by *Pichia stipitis*: purification, characterization, kinetic evaluation and xylooligosaccharides production. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 117, p. 72-77, oct. 2018.

DORIYA, K. et al. Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 78, p. 115-135, 2016.

DU, Bin et al. A concise review on the molecular structure and function relationship of β -glucan. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 16, p. 4032, aug. 2019.

DU, Bin et al. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*, v. 41, n. 1, p. 49-59, jan. 2015.

ERMIS, Ertan. Halal status of enzymes used in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 64, p. 69-73, jun. 2017.

FAÚNDEZ, Carolina et al. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, GH3 beta-xylosidase: heterologous expression and characterization of the enzyme. *Carbohydrate Research*, v. 482, p. 107738, aug. 2019.

FERREIRA, Eskálath Morganna Silva et al. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles*, v. 23, n. 1, p. 151-159, nov. 2019.

FESEL, Philipp H.; ZUCCARO, Alga. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, v. 90, p. 53-60, may. 2016.

GALÁN, Beatriz et al. News & Notes: Production, purification, and properties of an endo-1, 3- β -glucanase from the basidiomycete *Agaricus Bisporus*. *Current Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 190-193, mar 1999.

GAO, Min-Jie et al. Multi-stage glucose/pachymaran co-feeding enhanced endo- β -1, 3-glucanase production by *Trichoderma harzianum* via simultaneous increases in cell concentration and inductive effect. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 43, n. 8, p. 1479-1486, apr. 2020.

GARFOOT Andrew. L et al. Eng1 and Exg8 are the major β -Glucanases secreted by the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Journal of Biology Chemistry*. v. 24 n. 292, p. 4801-4810, mar. 2017.

GERMEC, Mustafa; TURHAN, Irfan. Evaluation of carbon sources for the production of inulinase by *Aspergillus niger* A42 and its characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 42, n. 12, p. 1993-2005, aug. 2019.

GOKOGLU, Nalan. Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n. 5, p. 2068-2077, oct. 2019.

GONÇALVES FILHO, Danielle; SILVA, Amanda Gonçalves; GUIDINI, Carla Zanella. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 18, p. 7399-7423, aug. 2019.

GONCALVES, Ana Carolina, S. et al. Biotechnological potential of mangrove sediments: identification and functional attributes of thermostable and salinity-tolerant β -glucanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 147, p. 521-526, mar. 2020.

GOTTSCHALK, Leda Maria Forte et al. Cellulases, xylanases, glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemistry Engineering Journal*, v. 51, n. 2, p.72–78, aug. 2010.

HASHIM, Noor Haza Fazlin et al. Biochemical and structural characterization of a new protein similar to cold active esterase of the psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica*. *Extremophiles*, v. 22, n. 4, p. 607-616, mar. 2018.

HERCULANO, Polyanna N. et al. Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis* L.). *Current Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1416-1422, jan. 2011.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, v. 5, p. 64-72, mar. 2014.

HEUX, Stéphanie et al. White biotechnology: state of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1653-1670, dec. 2015.

HOF, Herbert. *Rhodotorula spp.* in the gut—foe or friend? *GMS Infectious Diseases*, v. 7, sep. 2019.

HONG, Mengnan; LI, Jing; CHEN, Yuwen. Characterization of tolerance and multi-enzyme activities in non-Saccharomyces yeasts isolated from Vidal blanc icewine fermentation. *Journal of Food Biochemistry*, v. 43, n. 11, p. e13027, sep. 2019.

HONG, Sin-Hyoung et al. Antifungal activity and expression patterns of extracellular chitinase and β -1, 3-glucanase in *Wickerhamomyces anomalus* EG2 treated with chitin and glucan. *Microbial Pathogenesis*, v. 110, p. 159-164, sep. 2017.

ÍNFAZÓN-RODRÍGUEZ, María Inés et al. Production and characterization of an enzyme extract with cellulase activity produced by an indigenous strain of *Fusarium verticillioides* ITV03 using sweet sorghum bagasse. *Biotechnology Letters*, v. 42, n. 11, p. 2271-2283, jun. 2020.

IZGU, Demet Altınbay; et al. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* in vitro and in planta with Panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 99, n. 1, p. 85-91, nov. 2011.

JAIN, Kavish Kumar et al. Functional expression of a thermostable endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* RCKK in *Pichia pastoris* X-33 and its characterization. *Molecular Biotechnology*, v. 60, n. 10, p. 736-748, aug. 2018.

JAIN, Kavish Kumar et al. Production of thermostable hydrolases (cellulases and xylanase) from *Thermoascus aurantiacus* RCKK: a potential fungus. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, n. 4, p. 787-796, nov. 2015.

JAIN, Namrata et al. Orthogonal Active-Site Labels for Mixed-Linkage endo- β -Glucanases. *ACS Chemical Biology*, v. 16, n. 10, p. 1968-1984, may. 2021.

JANG, Won Je et al. Improving enzyme activity, thermostability and storage stability of β -1, 3-1, 4-glucanase with poly- γ -glutamic acid produced by *Bacillus sp.* SJ-10. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 143, p. 109703, feb. 2021.

JIANG, Cheng et al. Expression and characterization of a novel antifungal Exo- β -1,3-glucanase from *Chaetomium cupreum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 182, n. 1, p. 261-275, jan. 2017.

JIJAKLI, M. H.; LEPOIVRE, P. Characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, v. 88, n. 4, p. 335-343, feb. 1998.

JUNIOR, Athayde Neves et al. A microplate assay for extracellular hydrolase detection. *Journal of Microbiological Methods*, v. 175, p. 105948, aug. 2020.

KARAN, Ram; CAPES, Melinda D.; DASSARMA, Shiladitya. Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquatic Biosystems*, v. 8, n. 1, p. 1-15, feb. 2012.

KAWAHARA, Hidehisa et al. Stabilization of astaxanthin by a novel biosurfactant produced by *Rhodotorula mucilaginosa* KUGPP-1. *Biocontrol Science*, v. 18, n. 1, p. 21-28, 2013.

KHUNNAMWONG, Pannida; LIMTONG, Savitree. *Saturnispora kantuleensis* fa, sp. nov., a novel yeast species isolated from peat in a tropical peat swamp forest in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 1160-1164, abr. 2018.

KIM, Sun-Ki et al. Heterologous co-expression of two β -glucanases and a cellobiose phosphorylase resulted in a significant increase in the cellulolytic activity of the *Caldicellulosiruptor bescii* exoproteome. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 5, p. 687-695, jan. 2019.

KOT, Anna M. et al. *Rhodotorula glutinis* potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 14, p. 6103-6117, maio. 2016.

KUMAR, Mahadevan; MUGUNTHAN, M. Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. *Medical Journal Armed Forces India*, v. 74, n. 4, p. 333-336, out. 2018.

KUMAR, Vinod et al. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites, challenges and solutions. *Bioresource Technology*, p. 124566, marc. 2020.

KUMAR, Vishal; DANGI, Arun Kumar; SHUKLA, Pratyosh. Engineering of thermostable microbial xylanases for their industrial applications. *Molecular Biotechnology* v. 60, n. 3, p. 226-235, jan. 2018.

LANDELL, Melissa Fontes et al. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 244-248, 2010.

LARA, Carla A. et al. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 6, p. 1107-1119, apr. 2014.

LARIO, Luciana Daniela et al. Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. *Biotechnology Reports*, v. 28, p. e00546, dez. 2020.

LE, Bao; YANG, Seung Hwan. Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 9, p. 1-12, sep. 2019.

LI, Jinyang et al. Overexpression and characterization of a novel endo- β -1,3 (4)-glucanase from thermophilic fungus *Humicola insolens* Y1. *Protein Expression and Purification*, v. 138, p. 63-68, out. 2017.

LI, Qiang; DU, Wei; LIU, Dehua. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n. 5, p. 749-756, out. 2008.

LI, Zhen et al. Mechanism by which β -glucanase improves the quality of fermented barley flour-based food products. *Food Chemistry*, v. 311, p. 126026, may. 2020.

LI, Zhijian; LIU, Weizhi; LYU, Qianqian. Biochemical Characterization of a Novel Endo-1, 3- β -Glucanase from the Scallop *Chlamys farreri*. *Marine Drugs*, v. 18, n. 9, p. 466, sep. 2020.

LIMA, Danyo M. et al. Thermostable inulinases secreted by yeast and yeast-like strains from the Brazilian semi-arid region. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 60, n. sup7, p. 63-71, sep. 2009.

LINTON, Stuart M. The structure and function of cellulase (endo- β -1,4-glucanase) and hemicellulase (β -1,3-glucanase and endo- β -1,4-mannase) enzymes in invertebrates that consume materials ranging from microbes, algae to leaf litter. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 240, p. 110354, fev. 2020.

LIU, Jiawen et al. Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. *International journal of Biological Macromolecules*, v. 152, p. 288-294, jun. 2020.

LIU, Xiangyang; KOKARE, Chandrakant. Microbial enzymes of use in industry. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press, p. 267-298, jan. 2017.

LIU, Zongling et al. Biocontrol ability of killer yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from wine against *Colletotrichum gloeosporioides* on grape. *Journal of Basic Microbiology*, v. 58, n. 1, p. 60-67, jan. 2018.

LONG, Liangkun et al. Characterization of two new endo- β -1, 4-xylanases from *Eupenicillium parvum* 4-14 and their applications for production of feruloylated oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 186, n. 4, p. 816-833, may. 2018.

LOPES, Mariana R. et al. Production and characterization of β -glucanase secreted by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 5, p. 2412-2424, jan. 2014.

LUZ, B. D. S. et al. Bioprospecção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil. *Revista Multidisciplinar da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Unigran*, v.10, n.1, p. 13-24. Jun. 2016

MANAVALAN, TAMILVENDAN. Characterization of a novel endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 55 n.6, 761–771. Apr. 2015.

MANDIGAN, Michael.T. et al. *Microbiologia de Brock*.14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MONTEIRO, Valdirene Neves; ULHOA, Cirano José. Biochemical characterization of a β -1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 92-96, jan. 2006.

NAKAJIMA, Masahiro et al. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoside hydrolase from *Ustilago esculenta* functions in β -1,3-glucan degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 16, p. 5682-5689, jul. 2012.

NANJUNDASWAMY, Ananda; OKEKE, Benedict C. Comprehensive optimization of culture conditions for production of biomass-hydrolyzing enzymes of *Trichoderma* SG2 in submerged and solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 191, n. 1, p. 444-462, apr. 2020.

NARAYANAN, Karthik; PARAMESWARAN, Binod; PANDEY, Ashok. Production of chitin deacetylase by *Aspergillus flavus* in submerged conditions. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 46, n. 5, p. 501-508, oct. 2016.

NELSON, David. L.; COX, Michael. M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 7ª ed., Sarvier, 2014.

OLIVEIRA Luciana et. al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*. pp. 49–54, aug. abr. 2013.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 7, n. 3, dez. 2012.

ORO, Lucia; CIANI, Maurizio; COMITINI, Francesca. Yeasts from xerophilic environments reveal antimicrobial action against fruit pathogenic molds. *Journal of Food Safety*, v. 36, n. 1, p. 100-108, set. 2016.

OUEPHANIT, Chanika et al. High-level heterologous expression of endo-1, 4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* in *Pichia pastoris* X-33 directed through codon optimization and optimized expression. *Molecules*, v. 24, n. 19, p. 3515, sep. 2019.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. Guia prático para caracterização de enzimas. *Embrapa Agroenergia-Documentos (INFOTECA-E)*, 2021.

PAN, Jie et al. Characterization of a robust and pH-stable tannase from mangrove-derived yeast *Rhodospiridium diobovatum* Q95. *Marine Drugs*, v. 18, n. 11, p. 546, oct. 2020.

PANG, Bo et al. Improvement of the thermostability and activity of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. WB42. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 191, n. 3, p. 942-954, jan. 2020.

PARADA-PINILLA, Maria Paula et al. Biopolymer production by halotolerant bacteria isolated from Caatinga biome. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 547-559, jan. 2021.

PARK, Myung Soo et al. Diversity and enzyme activity of *Penicillium* species associated with macroalgae in Jeju Island. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 10, p. 646-654, sep. 2016.

PATEL, Amisha; SHAH, Amita. Purification and characterization of novel, thermostable and non-processive GH5 family endoglucanase from *Fomitopsis meliae* CFA 2. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 182, p. 1161-1169, jul. 2021.

PEIXOTO, Ferdynne Beatriz Sabóia et al. Micro-organismos isolados de ambientes aquáticos da Amazônia produtores de hidrolases de interesse industrial e biotecnológico. *Revista Geintec-Gestao Inovacao e Tecnologias*, v. 11, n. 1, p. 5795-5808, jan. 2021.

PENG, Ying et al. Purification and molecular characterization of exo- β -1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 1, p. 85-94, jun. 2009.

PEREIRA, Adejanildoda. S.; Fontes-Sant'ana, Gizele. C.; Amaral, Priscilla. F. F. Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food and Bioproducts Processing*, v. 115, p. 68-77, may. 2019.

POORNIMA, Shanmugam et al. Aqueous two-phase partitioning and characterization of xylanase produced by *Streptomyces geysiriensis* from low cost lignocellulosic substrates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 130, n. 6, p. 571-576, dec. 2020.

PRASAD, Shivcharan; ROY, Ipsita. Converting enzymes into tools of industrial importance. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 33-56, mar. 2018.

PTACEK, Jakub et al. The calcium-binding site of human glutamate carboxypeptidase II is critical for dimerization, thermal stability, and enzymatic activity. *Protein Science*, v. 27, n. 9, p. 1575-1584, aug. 2018.

RANI, Vijaya et al. Expression of novel glucose tolerant β -glucosidase on cell surface by *Rhodotorula glutinis* isolate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 3, p. 380-387, jul. 2015.

RAVINDRAN, Rajeev; JAISWAL, Amit K. Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: a review. *Bioengineering*, v. 3, n. 4, p. 30, nov. 2016.

RAZA, Ahmad, et al. Statistical based experimental optimization for co-production of endoglucanase and xylanase from *Bacillus sonorensis* BD92 with their application in biomass saccharification. *Folia Microbiologica*, v. 64, n. 3, p. 295-305, oct. 2019.

REGMI, Sudip et al. Industrial attributes of β -glucanase produced by *Bacillus* sp. CSB55 and its potential application as bio-industrial catalyst. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 43, n. 2, p. 249-259, jan. 2020.

Research and Markets, 2018. Enzymes market type, source, reaction type, and application – Global opportunity analysis and industry forecast, 2017-2024. Dublin. Disponível em: <https://www.businesswire.com/news/home/20180628006408/en/Global-Enzymes-Market-Report-2018-Analysis-by-Type-Source-Reaction-Type-and-Application---Opportunity-Outlook-to-2024---ResearchAndMarkets.com>

RIBEIRO, Marcela Suriani et al. Endo- β -1, 3-glucanase (GH16 family) from *Trichoderma harzianum* participates in cell wall biogenesis but is not essential for antagonism against plant pathogens. *Biomolecules*, v. 9, n. 12, p. 781, nov. 2019.

RIEDER, Anne; SAMUELSEN, Anne Berit. Do cereal mixed-linked β -glucans possess immune-modulating activities? *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 56, n. 4, p. 536-547, apr. 2012.

RIGOLDI, Federica et al. Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL Bioengineering*, v. 2, n. 1, p. 011501, jan. 2018.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, v. 59, p. 1-41, oct. 2015.

ROCHA, Lara Lys Santos; DA CRUZ FREIRE, José Ednézio. Novos insights sobre as propriedades físico-químicas do transportador de monoaminas VMAT2 humano e seu modo de interação com o neurotransmissor serotonina: Uma análise in silico. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. e530974491-e530974491, 2020.

RODRÍGUEZ-MENDOZA, Johan et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermophilic exo- β -1,3-glucanase from the thermophile biomass-degrading fungus *Thielavia terrestris* Co3Bag1. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 60-71, sep. 2019.

RONCERO, César; DE ALDANA, Carlos. R. V. Glucanases and chitinases. *The Fungal Cell Wall*, 131-166, dec. 2019.

RUIZ-HERRERA, José; ORTIZ-CASTELLANOS, Lucila. Cell wall glucans of fungi. A review. *The Cell Surface*, v. 5, p. 100022, dec. 2019.

RUNGRATTANAKASIN, Budsayachat et al. Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBiNU-1 in *Kluyveromyces lactis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 647-655, oct. 2018.

RUTHES, Andrea Caroline et al. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, v. 117, p. 753-761, mar. 2015.

RYKOV, Sergey V. et al. Novel endo-(1, 4)- β -glucanase Bgh12A and xyloglucanase Xgh12B from *Aspergillus cervinus* belong to GH12 subgroup I and II, respectively. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 18, p. 7553-7566, jul. 2019.

SAKDAPETSIRI, Chatsuda et al. Antagonistic activity of endo- β -1,3-glucanase from a novel isolate, *Streptomyces* sp. 9X166, against black rot in orchids. *Journal of Basic Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 469-479, feb. 2016.

SANTANA, Mona Liza et al. Production and partial characterization of β -1,3-glucanase obtained from *Rhodotorula oryzzicola*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 48, n. 2, p. 165-171, fev. 2018.

SANTHARAM, Leelaram et al. Effect of aeration and agitation on yeast inulinase production: a biocalorimetric investigation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 42, n. 6, p. 1009-1021, mar. 2019.

SCHMALTZ, Silvana et al. Ultrasound-assisted fermentation for production of β -1,3-glucanase and chitinase by *Beauveria bassiana*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 96, n. 1, p. 88-98, jun. 2021.

SENA, Amanda R. et al. Production, purification and characterization of a thermostable β -1, 3-glucanase (laminarinase) produced by *Moniliophthora perniciososa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 2, p. 599-609, jan. 2011.

SHAHRYARI, Zohre et al. Amylase and xylanase from edible fungus *Neurospora intermedia*: production and characterization. *Molecules*, v. 24, n. 4, p. 721, feb. 2019.

SHARMA, Kanupriya Miglani et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 115-126, jun. 2017.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541-549, jul. 2010.

SONG, Jung Min et al. Molecular and biochemical characterizations of a novel arthropod endo- β -1, 3-glucanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*, horizontally acquired from bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 155, n. 4, p. 403-412, apr. 2010.

SOUZA, Paula Monteiro et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 1103-1110, nov. 2017.

STEUDLER, Susanne et al. It is the mix that matters: substrate-specific enzyme production from filamentous Fungi and Bacteria Through solid-state fermentation. *Solid State Fermentation*, p. 51-81, feb. 2019.

STRATILOVÁ, Barbora et al. Characterization of a long-chain α -galactosidase from *Papiliotrema flavescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 2, p. 1-14, jan. 2018.

SUN, Zhan-Bin et al. Directed mutation of β -glucanases from probiotics to enhance enzymatic activity, thermal and pH stability. *Archives of Microbiology*, v. 202, n. 7, p. 1749-1756, apr. 2020.

TANG, Yanbin et al. Purification and characterization of a novel β -1,3–1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic *Rhizomucor miehei* with high specific activity and its gene sequence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 9, p. 2354-2361, feb. 2012.

TASKIN, Mesut. Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36, n. 2, p. 165-172, 2013.

THAPA, Santosh et al. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*, v. 61, n. 8, p. 579-601, jun. 2019.

THERON, Louwrens Wiid et al. Characterisation of the enzymatic properties of MpAPr1, an aspartic protease secreted by the wine yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 97, n. 11, p. 3584-3593, aug. 2017.

TORRES, B.B. Elementos de enzimologia In SCHMIDELL NETTO, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter, w. et al. Biotecnologia industrial. 2 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2020, p. 195-220.

TORTORA, Gerard; FUNKE, Berdell; CASE, Christine. *Microbiologia*. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2017.

TOSH, Susan M. et al. Presence of β -glucanase activity in wheat and dairy ingredients and use of organic salts as potential enzyme inhibitors. *Journal of Cereal Science*, v. 56, n. 3, p. 538-543, nov. 2012.

TRAPALA, Jonathan et al. Purification and characterization of an inulinase produced by a strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from blue agave bagasse. *Protein Expression and Purification* v. 176, p. 105718, dec. 2020.

TREWBY, William; LIVESEY, Duncan; VOÏTCHOVSKY, Kislon. Buffering agents modify the hydration landscape at charged interfaces. *Soft Matter*, v. 12, n. 9, p. 2642-2651, jan. 2016.

TSUJI, Masaharu et al. *Vishniacozyma ellesmerensis* sp. nov., a psychrophilic yeast isolated from a retreating glacier in the Canadian High Arctic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 696-700, jan. 2019.

TU, Tao et al. A GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Talaromyces leycettanus* strain JCM12802 that selectively drives synergistic lignocellulose hydrolysis. *Microbial Cell Factories*, v. 18, n. 1, p. 1-12, aug. 2019.

USOLTSEVA, Roza V. et al. Laminarans and 1, 3- β -D-glucanases. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 163, p. 1010-1025, nov. 2020.

VARELA, Cristian; BORNEMAN, Anthony R. Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, v. 34, n. 3, p. 111-128, nov. 2017.

VASCONCELLOS, V. M. et al. Addition of metal ions to a (hemi) cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *New Biotechnology*, v. 33, n. 3, p. 331-337, may. 2016.

VERO Silvana. et al. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). *FEMS Yeast Research*. N.13, v. 2, p.189-99, mar. 2013.

VIJAYENDRA, S. V. N.; KASHIWAGI, Yutaka. Characterization of a new acid stable exo- β -1, 3-glucanase of *Rhizoctonia solani* and its action on microbial polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 44, n. 1, p. 92-97, may. 2009.

VYAS, Sachin; CHHABRA, Meenu. Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: a cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 250-258, jan. 2017.

WAGNER, James M.; ALPER, Hal S. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, v. 89, p. 126-136, apr. 2016.

WANG, Chenguang et al. Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity. *Advances in Immunology*, v. 145, p. 187-241, 2020.

WANG, J.-L. et al. Characterization of a Thermostable and acidic-tolerable β -Glucanase from aerobic fungi *Trichoderma koningii* ZJU-T. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 9, p. C452-C456, oct. 2007.

WEI, Hui et al. Engineering towards a complete heterologous cellulase secretome in *Yarrowia lipolytica* reveals its potential for consolidated bioprocessing. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, n. 1, p. 1-14, oct. 2014.

WIERZBICKA-WOŚ, Anna et al. Biochemical characterization of a novel monospecific endo- β -1, 4-glucanase belonging to GH family 5 from a rhizosphere metagenomic library. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1342, jun. 2019.

WONG, E. Y.; STENSTROM, M. K. The usage of calcium phosphate systems for onsite defluoridation treatment. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 56, n. 11, p. 1189-1195, 2021.

WU, Qiulan et al. Isolation of β -1, 3-glucanase-producing microorganisms from *Poria cocos* cultivation soil via molecular biology. *Molecules*, v. 23, n. 7, p. 1555, jun. 2018.

XIAN, Liang; FENG, Jia-Xun. Purification and biochemical characterization of a novel mesophilic glucoamylase from *Aspergillus tritici* WZ99. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 1122-1130, feb. 2018.

XU, Zhiwei, et al. An extracellular exo- β -(1, 3)-glucanase from *Pichia pastoris*: purification, characterization, molecular cloning, and functional expression. *Protein Expression and Purification*, v. 47, n. 1, p. 118-127, may. 2006.

YAMAGUCHI, Shotaro. The quest for industrial enzymes from microorganisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 81, n. 1, p. 54-58, jan. 2017.

Yang, H., Cai, G., Lu, Jian., Gómez Plaza, Encarna. (2021). The production and application of enzymes related to the quality of fruit wine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(10), 1605-1615.

YANG, Shaoqing et al. Purification and characterization of a novel alkaline β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 41, n. 10, p. 1487-1495, oct. 2014.

YOSHIMI, Akira et al. Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 80, n. 9, p. 1700-1711, sep. 2016.

YUIVAR, Yassef et al. Characterization of gelatinase produced by *Antarctic mrakia* sp. *Journal of Basic Microbiology*, v. 59, n. 8, p. 846-852, jun. 2019.

YUN, Long et al. Potential application values of a marine red yeast, *Rhodospiridium sphaerocarpum* YLY01, in aquaculture and tail water treatment assessed by the removal of ammonia nitrogen, the inhibition to *Vibrio* spp., and nutrient composition. *PloS one*, v. 16, n. 2, p. e0246841, jan. 2021.

YURKOV, Andrey M. Yeasts of the soil—obscure but precious. *Yeast*, v. 35, n. 5, p. 369-378, jan. 2018.

ZENG, Siquan et al. Culturable fungal diversity and cellulase production by mixed culture *Aspergillus fungi* from Sanya mangrove. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2018.

ZHANG, Lina et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research*, v. 340, n. 8, p. 1515-1521, jun. 2005.

ZHANG, Shuai-Bing et al. Expression of a wheat β -1, 3-glucanase in *Pichia pastoris* and its inhibitory effect on fungi commonly associated with wheat kernel. *Protein Expression and Purification*, v. 154, p. 134-139, feb. 2019.

ZHANG, Xianwei et al. Novel transgenic pigs with enhanced growth and reduced environmental impact. *Elife*, v. 7, p. e34286, may. 2018.

ZHAO, Jun et al. Identification of an intracellular β -glucosidase in *Aspergillus niger* with transglycosylation activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 19, p. 8367-8380, aug. 2020.

ZHU, Fengmei et al. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 41, p. 165-173, aug. 2015.

ZIETSMAN, Anscha JJ et al. Profiling the hydrolysis of isolated grape berry skin cell walls by purified enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 37, p. 8267-8274, aug. 2015.

ZIMMER, Karine. R. et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, v.10, n.14, p. 123-137, jul/dez. 2009.

ZŁOTKO, Katarzyna et al. A Report on Fungal (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans: properties, functions and application. *Molecules*, v. 24, n. 21, p. 3972, nov. 2019.