



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA BIONORTE**



**Produção de Glicose Oxidase (E.C. 1.1.3.4) por fungos
isolados da Floresta Amazônica**

DIEGO RAYAN TEIXEIRA DE SOUSA

MANAUS

2017

**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA
AMAZÔNIA LEGAL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA BIONORTE**

DIEGO RAYAN TEIXEIRA DE SOUSA

**Produção de Glicose Oxidase (E.C. 1.1.3.4) por fungos
isolados da Floresta Amazônica**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia BIONORTE da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS

2017

Ao grupo de **Micologia-INPA**, especialmente, ao Dr. **João Vicente Braga de Souza**, um professor, orientador, amigo e líder excepcional, pelos ensinamentos e paciência, meu carinho, admiração e respeito;

Aos meus familiares, **Donaldo Lobato de Sousa (Pai)**, **Débora Raysa Teixeira de Sousa (Irmã)**. In memoriam à **Raimunda Sena Teixeira de Sousa (Mãe)**, pelo carinho e incentivo em toda esta jornada;

A todos os **amigos e familiares** que sempre incentivaram nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Á **Deus**, uma força que me fortalece diariamente;

Ao Professor Dr. **João Vicente Braga de Souza**, meu orientador, pelo grande incentivo e exemplo desde a graduação, confiança e muito obrigado pelos conselhos gerais e paciência em mais essa caminhada para a conclusão deste trabalho. Minha eterna e sincera gratidão;

Á Dra. **Ana Cláudia Cortez**, pelas orientações, ensinamentos e parceria na realização da identificação dos isolados fúngicos;

Á Biomédica **Thaís Araújo**, pela parceria na identificação dos isolados e seleção dos produtores de Glicose Oxidase, como aluna de iniciação científica;

Á Bióloga **Elusiane Santos**, pela parceria na otimização da produção da enzima, como aluna de iniciação científica;

Ao **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)**, **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** e **Universidade do Estado do Amazonas (UEA)** que ofereceram oportunidade para o meu aprimoramento profissional;

Aos coordenadores do Bionorte, Dr. **Spartaco Astolfi Filho** e Dr. **Jair Max Furtado Maia**, pela orientação e confiança na realização deste trabalho;

Á equipe técnica e alunos do **laboratório de purificação de proteínas e proteômica da UFAM**, pela parceria na realização das metodologias do capítulo 2;

Ao **Dr Márcio Martinez**, pela compreensão e apoio para a realização deste trabalho;

Á minha família científica do **Laboratório de Micologia**, são muitos, sintam-se todos agradecidos, pelo incentivo, apoio, conselhos e ensinamentos em todos os momentos dessa jornada;

Aos professores da Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia **BIONORTE**, pelos conhecimentos obtidos;

A minha mãe **Raimunda Sena (in memoriam)** a quem devo tudo o que estou conquistando, sem a qual não teria conseguido chegar até o final desta jornada. Mãe você me falava que um dia eu ia entender, hoje entendo bastante daquelas coisas. Só consegui porque você me ensinou a ter **FÉ, ESPERANÇA E AMOR**. Meu desejo é de lhe agradecer para sempre. Sempre vou te amar do “tamanho do infinito”.

Ao meu pai **Donald Lobato**, pelo exemplo, fortaleza, amizade, conselhos e paciência. Agradeço todos os dias por poder lhe abraçar. Obrigado por sempre ser meu PAI.

Às minhas irmãs **Débora Raysa e Greicy Marília** por todo apoio, carinho e incentivo nesta jornada;

À minha linda companheira **Adrya Figueiredo** e meu filho **Grigórios**, por despertar meu potencial de agir e me dar felicidade.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

*"Assim, permanecem agora estes três: a fé, a esperança e o amor.
O maior deles, porém, é o amor."*

1 Coríntios 13:13

RESUMO

A glicose oxidase (GOx) possui diversas aplicações industriais. Acredita-se que existem diversificadas espécies fúngicas que possuem capacidade de produzir essa enzima e a maior parte encontra-se inexplorada. Este trabalho teve como finalidade investigar a produção de Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4) por fungos isolados de amostras de solo da Floresta Amazônica. Foram isolados fungos filamentosos de amostras de solo da Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada na cidade de Manaus-Amazonas. Para selecionar bons produtores de GOx, esses foram submetidos em cultivo submerso. Os isolados destacados na produção da enzima foram submetidos a ensaios de cinética onde foi avaliada a produção da mesma, biomassa e o consumo do substrato pelos isolados. Ensaio univariados e multivariados foram realizados para otimizar o processo de produção. Uma produção enzimática foi realizada utilizando processo semi-contínuo. A enzima bruta foi purificada pelos processos de precipitação, diálise cromatografia de troca iônica. Foram investigadas as características bioquímicas da GOx (melhor temperatura, melhor pH, estabilidade e o efeito de íons na atividade enzimática). Analisou-se o potencial desta enzima na elaboração de um Kit de quantificação de Glicose através de curvas de calibração, o coeficiente de regressão e coeficiente de correlação. Quanto aos resultados obtidos, foi detectada a produção de GOx em todas as cepas analisadas, entretanto, apenas sete se destacaram como potenciais produtores desta enzima, sendo cinco do gênero *Aspergillus* e dois do gênero *Penicillium*, com valores que variaram de 14,93 U/mL – 35,54 U/mL. A cinética demonstrou que o isolado *Aspergillus* LMM01 foi o melhor produtor da enzima, sendo portanto este isolado, utilizado nos experimentos posteriores. Experiências multivariadas demonstraram que os parâmetros com maior efeito na produção de GOx foram o pH e a agitação. Obteve-se um resultado estável para GOx (7,74 U/mL), durante 7 dias, utilizando o processo semi-contínuo. Após o processo de purificação, a atividade da enzima melhorou 938%, a temperatura de 40° C e o pH 6,0 foram os melhores para a ação catalítica da enzima e a estabilidade apresentou-se adequada as suas principais necessidades industriais. Os íons Fe⁺⁺⁺, Pb⁺⁺, Ag⁺, Hg⁺⁺ e Cu⁺⁺ exibiram inibição significativa na atividade de GOx. No presente estudo, a correlação de Pearson do Kit desenvolvido e o Kit comercial foi forte positiva, com valor de $r = 0,9978$. Os resultados foram compatíveis com a literatura, onde destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como os principais produtores industriais de GOx.

Palavras-chave: biotecnologia, microrganismo, enzima, bioprocesso.

ABSTRACT

Glucose oxidase (Gox) has several industrial applications. It is believed that there are diversified fungal species that have the production capacity of this enzyme and most are unexplored. The objective of this work was to investigate a production of Glucose Oxidase (EC 1.1.3.4) by fungi isolated from soil samples from the Amazon Forest. Soil fungi were isolated from the Adolpho Ducke Forest Reserve, located in the city of Manaus-Amazonas. To select good GOx producers, such as submitted in submerged bioprocess. The isolates highlighted in the production of the enzyme were submitted to kinetic tests where the enzyme production, biomass and substrate consumption by isolates were evaluated. Univariate and multivariate assays performed to optimize the production process. An enzymatic production for the semi-continuous process. The crude enzyme was purified by precipitation processes, dialysis ion exchange chromatography. The potential of this enzyme in the elaboration of a Glucose quantification kit through calibration curves, the regression coefficient, was investigated as biochemical characteristics and GOx (optimum temperature, optimum pH, stability and ionic effect in the enzymatic activity. However, only seven were identified as potential producers of this enzyme, being five of the genus *Aspergillus* and two of the genus *Penicillium*, with values ranging from 14.93 U/mL – 35.54 U/mL. Kinetics showed that the *Aspergillus* LMM01 isolate was the best producer of the enzyme, and this was used isolated in the subsequent experiments. Experiments with variants demonstrated with the greatest effect on the production of GOx were PH and agitation. A result for GOx (7.74 U/mL) was obtained, for 7 days, use the semi-continuous. After purification process, an activity and the enzyme improved 938%, a temperature of 40 ° C and pH 6.0 were the optimum for a catalytic action of the enzyme and stability presented as its main industrial needs. Fe⁺⁺⁺, Pb⁺⁺, Ag⁺, Hg⁺⁺ and Cu⁺⁺ ions showed significant inhibition of GOx activity. In the present study, a Pearson correlation of the developed Kit and the commercial Kit was strong positive, with value of $r = 0.9978$. The results are compatible with a literature where the genera *Aspergillus* and *Penicillium* stand out as the main industrial producers of GOx.

Key words: biotechnology, microorganism, enzyme, bioprocess.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da reação da Glicose Oxidase.....	19
Figura 2. Reação estrutural da detecção de Glicose Oxidase, utilizando o-Dianisidina.....	21
CAPÍTULO 1	
Figura 1. Cinética de produção de Glicose Oxidase por fungos isolados de amostras de solo amazônico. Foi investigada a produção enzimática (P), Açúcares redutores (S) e a produção de biomassa, medida pelo peso seco g/l (X). Onde (A) corresponde a <i>Aspergillus</i> LMM01, (B) <i>Aspergillus</i> LMM03, (C) <i>Penicillium</i> LMM12, (D) <i>Aspergillus</i> LMM15, (E) <i>Aspergillus</i> LMM16, (F) <i>Penicillium</i> LMM29 e (G) <i>Aspergillus</i> LMM85.....	51
Figura 2. Avaliação de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo para a produção de Glicose Oxidase. O uso de fontes de carbono foi investigado (glicose, sacarose, maltose, xilose, galactose e lactose), fontes de nitrogênio (peptona de carne, extrato de malto, peptona de soja, extrato de levedura e KNO ₃) e fontes de fósforo (KH ₃ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ e P ₄ O ₁₀) Para a produção de Glicose Oxidase, utilizando no bioprocesso o isolado <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	52
Figura 3. Superfície de resposta do planejamento fatorial 2 ⁵ para a produção de glicose oxidase de <i>Aspergillus niger</i> LMM01 com os fatores glucose, KH ₂ PO ₄ , peptona, pH e agitação orbital. O resultado desta variável de resposta foi a produção de glicose oxidase.....	56
Figura 4. Produção de Glucose Oxidase em processo semi-contínuo utilizando <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	57
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Perfil cromatográfico da enzima Glicose Oxidase, produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01, submetida a cromatografia de troca iônica utilizando coluna HiTrap QFF. Cromatograma emitido pelo aparelho Akta Prime plusGE, Suécia.....	77

Figura 2. Resultados analíticos da enzima Glicose Oxidase, produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01, submetida a cromatografia de troca iônica utilizando coluna HiTrap QFF.....	78
Figura 3. Produto de cromatografia (HiTrapQFF), em Gel (SDS-PAGE). (A) Frações de 12 a 23 da enzima Glicose Oxidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01. (B) Produto da união das frações de 13 a 18....	80
Figura 4. Avaliação da temperatura e pH ótimo de ação catalítica da enzima Glucose Oxidase, produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	81
Figura 5. Avaliação da estabilidade térmica da enzima Glucose Oxidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	82
Figura 6. Estabilidade ao pH da Glicose oxidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	83

CAPÍTULO 3

Figura 1. Curva padrão de detecção de Glicose, utilizando o Kit A (comercial).....	93
Figura 2. Curva padrão de detecção de Glicose, utilizando o Kit B (desenvolvido).....	94
Figura 3. Valores de correlação de Pearson para a determinação do nível de Glicose, utilizando o Kit A (comercial) e o Kit B (desenvolvido, utilizando Glicose Oxidase de <i>Aspergillus niger</i> LMM01)	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Microorganismos, isolados da Floresta Amazônia, produtores de enzimas de interesse industrial.....	28
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência natural e funções da Glicose oxidase.....	20
Tabela 2. Aplicações da Glicose oxidase na indústria.....	24
Tabela 3. Microrganismos, isolados da Floresta Amazônia, produtores de enzimas de interesse industrial.....	32
 CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Níveis utilizados para a concentração de carbono, concentração de nitrogênio, concentração de fósforo, pH e agitação orbital no desenho experimental 2 ⁵ para a produção de GOx, pelo fungo selecionado.....	47
Tabela 2. Gêneros fúngicos isolados de amostras de solo superficial (2 cm de profundidade) da Floresta Amazônica (Lat. 02°95'43 " S; Longo: 59°93'39"O)	49
Tabela 3. Isolados destacados na seleção de produtores de Glicose Oxidase, realizada com microrganismos isolados de amostras de solo da floresta amazônica.....	50
Tabela 4. Planejamento fatorial 2 ⁵ para produção de Glucose Oxidase de <i>Aspergillus niger</i> LMM01, os fatores analisados foram: glicose, KH ₂ PO ₄ , peptona, pH e agitação orbital. O experimento desta variável de resposta foi a produção de Glicose Oxidase.....	54
Tabela 5. Efeitos dos fatores na produção de Glicose Oxidase e desvio padrão calculados para o ponto central.....	55
Tabela 6. Análise estatística do planejamento fatorial 2 ⁵ por ANOVA em uma faixa de confiança de 95%.....	55

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Padrão de precipitação da Glicose Oxidase de <i>A. niger</i> LMM01 por sulfato de amônio.....	76
Tabela 2. Resumo da purificação e recuperação global da glicose oxidase produzida por <i>A. niger</i> LMM01.....	79
Tabela 3. Efeito de íons na atividade de Glicose Oxidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection

FAD: Dinucleótido de flavina e adenina

GOx: Enzima Glicose oxidase

EC: Enzyme Commission Numbers

CLSI: Instituto de Padrões Clínicos e de Laboratório

DNS: Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico

SDS-PAGE: PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)

HRP: Peroxidase de rábano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Glicose Oxidase.....	18
2.1.1 Importância da Glicose Oxidase na indústria.....	21
2.1.2 Microrganismos produtores de Glicose Oxidase.....	26
2.2 Características de Glicose Oxidase.....	29
2.3 Potencial biotecnológico dos fungos presentes na Amazônia.....	30
2.4 Produção industrial de enzimas.....	33
2.5 Fatores que influenciam na produção de Glicose Oxidase.....	34
3. OBJETIVOS.....	37
4. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....	38
5. CAPÍTULO 1. Isolamento, identificação e detecção de fungos produtores de Glicose Oxidase.....	39
6. CAPÍTULO 2. Caracterização da enzima Glicose Oxidase produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	68
7. CAPÍTULO 3. Análise comparativa de dois métodos de detecção de glicose, utilizando a Glicose Oxidase, produzida por <i>Aspergillus niger</i> LMM01.....	90
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	99

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
10. APÊNDICE.....	116

1. INTRODUÇÃO

A Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4) (GOx) possui aplicações tecnológicas importantes desde 1950. GOx tem sido utilizadas na indústrias de alimentos, farmacêutica, têxtil, nanotecnologia e em pesquisas científicas. Sua utilização mais conhecida é como principal reagente para a determinação dos níveis de glicose sanguínea (BANKAR et al., 2009a; BLAZ et al., 2014; FERRI; KOJIMA; SODE, 2011). No entanto, esta enzima ainda possui baixa produção no Brasil (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Atualmente, a GOx vem sendo produzida principalmente por recombinação gênica de cepas mutantes dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (BANKAR et al., 2009a). Houve grande crescimento da utilização desta enzima na área de nanotecnologia, para a composição de biossensores de detecção de glicose, não desfavorecendo sua importância nas outras áreas já citadas (DEVAENATHIPATHY et al., 2015).

A Floresta Amazônica possui um grande potencial para bioprospecção de substâncias úteis a partir de fungos isolados dela. A rápida ciclagem da matéria orgânica presente no seu solo sugere a presença de micro-organismo de potencial biotecnológico. Apesar disso, não existem trabalhos publicados na literatura demonstrando seleção de fungos amazônicos para a produção de GOx. (CELESTINO et al., 2014a; DELABONA et al., 2012; SANTOS et al., 2015; TONELOTTO et al., 2014).

A produção GOx por isolados obtidos a partir de amostras de solo da região amazônica pode resultar no desenvolvimento de patentes, produtos e no surgimento de negócios regionais relacionados a comercialização da GOx. Centros acadêmicos,

indústria e população seriam os maiores beneficiados com o resultado positivo dessa abordagem (MENDES et al., 2015).

Visando o desenvolvimento científico e tecnológico e afim de contribuir com a sociedade, este trabalho tem como finalidade a produção de GOx por fungos isolados da floresta amazônica, investigando pontualmente: a) quais fungos serão isolados das amostras de solo da Floresta Amazônica; b) quais destes serão produtores de GOx; c) determinar as condições ótimas de bioprocessamento; d) produzir GOx utilizando processo semi-contínuo; e) purificar a GOx produzida; f) determinar as características da enzima produzida; g) validar o potencial da enzima produzida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Glicose Oxidase

Glicose Oxidase (β -D-glucose: Oxigênio, 1-Oxidoreductase, EC 1.1.3.4) (GOx) é uma enzima que oxida a glicose para ácido glucônico. Está presente em todos os organismos aeróbios e normalmente funciona em conjunto com a Catalase (EC 1.11.1.6). A Tabela 1 mostra a ocorrência natural e a importância desta enzima, para alguns organismos. Tornou-se uma enzima muito útil e de ampla aplicação, especialmente na indústria de alimentos e nas análises clínicas (Bankar et al., 2009a).

A glicose oxidase pertence ao grande grupo de enzimas oxido redutases e também é chamada de glicose aerodeidrogenase. A GOx é uma flavo enzima que catalisa a oxidação da β -D-glicose a δ -D gluconolactona com H_2O_2 , como apresentado na Figura 1. (FERRI; KOJIMA; SODE, 2011)

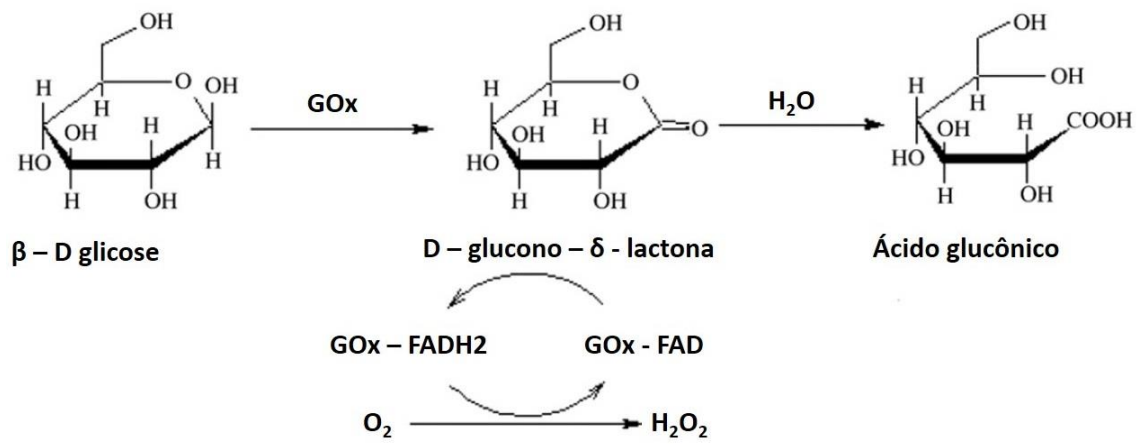


Figura 1. Representação estrutural da reação da Glicose Oxidase
 Fonte: (WITT et al., 2000)

Tabela 1. Ocorrência natural e funções da Glicose oxidase.

Ocorrência natural	Função
Insetos Mel de abelha (<i>Apis mellifera</i> L.) - secreção salivar de Glândula hipofaríngea (Ohashi et al., 1999, Santos et al., 2005; AbuSara 2006)	Preservação do mel (AbuSara 2006)
Larva (<i>Helicoverpa zea</i> (Eichenseer et al., 1999), <i>Helicoverpa Armigera</i> , <i>Helicoverpa assulta</i> (Zong e Wang 2004) – saliva Secreção da glândula labial.	Desinfetar alimentos ingeridos e função gastrointestinal (Eichenseer Et ai. 1999), suprimir a defesa da planta (Musser et al., 2002, Zong e Wang 2004; Musser et ai. 2005)
Gafanhoto (<i>Schistocerca americana</i>) -cutícula (Candy 1979)	Antibacteriano, endurecimento da cutícula (Candy 1979)
Larva (<i>Spodoptera exigua</i> , <i>Mamestra configurata</i>) –Secreção salivar das glândulas labiais (Merkx-Jacques e Bede 2004, 2005)	NA
Fungos <i>Talaromyces flavus</i> (Kim et al. 1990; Murray et al. 1997) <i>Pleurotus ostreatus</i> (Shin et al. 1993)	Anti-bacteriano e anti-fúngico (Kim et ai, 1990, Murray et. al., 1997) Gerar H ₂ O ₂ para degradação de lignina dependente de H ₂ O ₂ por Peroxidase extracelular (Kang et al., 1993, Shin et al., 1993)
<i>Aspergillus niger</i> (Muller 1928; Kriechbaum et al. 1989; Hatzinikolaou et al. 1996)— parede celular de micélio (Witteveen et al. 1992)	Diminui o pH do ambiente (Magnuson e Lasure 2004)
<i>Penicillium spp.</i> , <i>Penicillium amagasakiense</i> (Wohlfahrt et al. 1999), <i>Penicillium canescens</i> (Simpson 2006), <i>Penicillium notatum</i> (Coulthard et al. 1945; Bright and Appleby 1969), <i>Penicillium pinophilum</i> (Rando et al. 1997), <i>Penicillium funiculosum</i> (Sukhacheva et al. 2004), <i>Penicillium variabile</i> (Pulci et al. 2004), <i>Penicillium chrysogenum</i> (Leiter et al. 2004), <i>Penicillium adametzii</i> (Eremin et al. 2006)	Anti-bacteriano e anti-fúngico (Leiter et al. 2004)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (Ramasamy et al. 1985)	Ajuda na degradação da lignina (Ramasamy et al. 1985)
<i>Botrytis cinerea</i> (Liu et al. 1998)	Ajuda na infecção de plantas (Edlich et al. 1989)

Fonte: (WONG; WONG; CHEN, 2008)

A reação pode ser dividida em uma parte redutora e uma outra oxidativa. Na metade da reação de redução, GOx catalisa a oxidação de β -D-glicose para D-glucono- δ -lactona, que é não-hidrolisada enzimaticamente a ácido glucônico. Subsequentemente a flavina-adenina-dinucleótido (FAD) é reduzida para FADH₂. Na metade da reação de oxidação a GOx reduzida é novamente oxidada com oxigênio para produzir peróxido de hidrogênio (BANKAR et al., 2009a).

O peróxido de hidrogênio é clivado pela catalase para produzir água e oxigênio (Beltrame et al., 2004). Witteveen et al.; (1992) afirmaram que em *A. niger* a enzima Lactonase (EC 3.1.1.17) foi responsável por catalisar a hidrólise de D-glucono- δ -lactona ao ácido glucônico, embora a presença de lactonase não fosse necessária uma vez que o passo de hidrólise ocorre espontaneamente, porém a uma taxa mais baixa (FERRI; KOJIMA; SODE, 2011). A taxa da reação acima é medida por acoplamento de outro sistema de enzima muito mais rápido à produção de H₂O₂, com demonstrado na Figura 2.

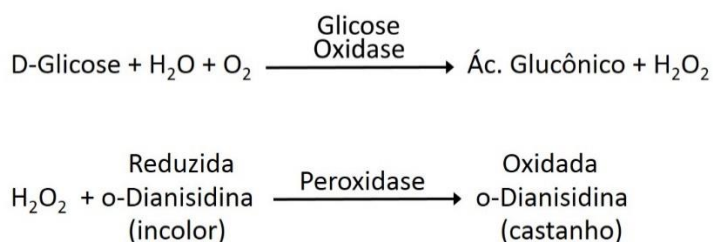


Figura 2. Reação estrutural da detecção de Glicose Oxidase, utilizando o-Dianisidina.

2.1.1. Importância da Glicose Oxidase na indústria

As vendas de enzimas industriais estão em torno de US \$ 2 bilhões por ano, com mais de 50 aplicações diferentes (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). Apesar de ser uma pequena parte de todo o mercado de especialidades

químicas, o campo de enzimas está projetado para crescer rapidamente, a uma taxa próxima de dois dígitos por ano. Com base na aplicação, ~ 65% das enzimas comerciais são técnicas, como detergente, têxtil e amido, ~ 35% são enzimas alimentares. Sendo que a GOx faz parte destes dois grupos.

A GOx é de considerável importância comercial, como se pode observar na tabela 2. Tem sido utilizada na indústria farmacêutica, na produção de vinho e na produção de ácido glucônico, entre outros (WONG; WONG; CHEN, 2008). Porém, as suas aplicações não se resumem apenas às indústrias. Esta enzima é a mais estudada para a atuação em biossensores de glicose devido a sua alta especificidade e estabilidade, quando comparada a outras enzimas (DEVASENATHIPATHY et al., 2015; LIN et al., 2015).

Nas indústrias de alimentos a glicose oxidase é utilizada para remover o oxigênio de bebidas, como uma fonte de peróxido de hidrogênio para a preservação de alimentos e redução do escurecimento enzimático. Também foi observado que o sistema GOx - glicose apresenta um efeito antibacteriano em organismos causadores de infecção alimentar (BANKAR et al., 2009a; NOGUERA et al., 2014).

A GOx possui grande importância na indústria de vinho, onde pode diminuir o teor alcoólico, removendo parcialmente a glicose (pela conversão para δ-glucono-1, 5-lactona), como foi demonstrado na figura 1, a qual posteriormente seria convertida em álcool. Além disso, essa enzima possui efeito bactericida, sendo assim, a necessidade de conservantes é menor (MALHERBE et al., 2003; PICKERING; HEATHERBELL; BARNES, 1998).

A GOx pode ser usada como antimicrobiano em produtos de higiene oral. A cavidade oral abriga várias espécies de estreptococos, como o *Streptococcus mutans*, que é um importante contribuinte para a cárie dentária. O H₂O₂ produzido pela glicose oxidase age como um útil bactericida (LAROCCA et al., 2008).

NOGUERA et al. (2014) adicionaram GOx no leite e avaliaram o seu efeito sobre o crescimento de uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Os autores verificaram que o tratamento com GOx inibe significativamente o crescimento de bactérias. Esses achados sugerem que a GOx é uma alternativa para a conservação do leite, tanto bruto como pasteurizado

Tabela 2. Aplicações da Glicose oxidase na indústria.

Aplicação	Comentário	Autores
Aditivo para processamento de alimentos	GOx é classificada com propriedades antioxidantes, conservantes e estabilizantes.	Codex Alimentarius Commission's database (2007b). (Seifu et al. 2005).
Laticínios e sistema lactoperoxidase Fabricação de pão	O sistema Lactoperoxidase, quando usado em conjunto com a glicose oxidase, é um agente anti-microbiano muito útil. GOx é um oxidante eficaz para produzir pão. O peróxido produzido produz uma massa mais elástica e viscosa	Vemulapalli et. al., 1998; Rasiah et. al., 2005
Ovo em pó seco	Remoção da glicose do ovo líquido, evitando o escurecimento não enzimático de Maillard e servindo como anti-microbiano.	Sisak et. al., 2006; Dobbenie et. al., 1995
Antioxidante / conservante (eliminador de oxigênio) Vinho com álcool reduzido	A reação da GOx consome oxigênio, uma característica que permite que esta enzima seja utilizada na eliminação do oxigênio ativo. Adição de GOx ao mosto antes da fermentação. GOx consome parte da glicose presente, tornando-a não disponível para a fermentação alcoólica, resultando em um vinho com álcool reduzido.	Breene (1989) Pickering et al., 1998; Pickering et al., 1999a; Pickering et al., 1999b; Pickering et al., 1999c
Produção de ácido glucônico	O ácido glucônico é um produto da ação de enzimática de GOx. Industrialmente, ácido glucônico é produzido principalmente a partir da fermentação, com uma produção global estimada de cerca de 50.000-100.000 ton/ano.	Singh et. al., 2005
Biossensor de glicose	A GOx é comumente usada em biossensores médicos e em indústria de alimentos, para construir amperometria (método eletroquímico de análise quantitativa que determina a concentração de glicose em uma solução).	Newman e Turner 2005; Wilkins e Atanasov 1996;
Kit de detecção de glicose	Na reação de glicose com GOx ocorre a produção de um produto colorido, derivado do peróxido de hidrogênio que reage com o-dianisidina na presença de peroxidase.	Mello e Kubota 2002 Giampietro et. al., 1982
Célula de combustível	A GOx é utilizada no ânodo de biocombustíveis para oxidar a glicose, extrair elétrons e transferi-los para o eletrodo ânodo a partir do qual os elétrons fluirão através da carga no circuito para o cátodo.	Weibel e Dodge, 1975
Branqueamento têxtil	Para substituir o branqueamento químico. O bio-branqueamento pode ser possível no cotidiano por adição de GOx em detergente para roupa.	Pramod 1999

Ramanavicius et al. (2015) utilizaram GOx, de *Penicillium funiculosum*, em célula de biocombustível enzimática (E-BFC) operando em temperatura ambiente e em baixas concentrações de combustível. A GOx foi imobilizada na concepção de ânodo da célula de biocombustível e a peroxidase de rábano (HRP) modificada foi aplicado no cátodo da mesma célula de biocombustível. A tensão máxima registada, no circuito, excedeu 640 mV. Tal concepção da nova célula de biocombustível permite utilizar a glicose como um combustível para o ânodo, e H₂O₂ formados durante a ação catalítica de GOx, pode ser utilizado como um combustível no cátodo da mesma célula de biocombustível (RAMANAVICIUS et al., 2015).

A fim de degradar uma gama de compostos farmacologicamente ativos, Touahar et al. (2014) combinaram as três enzimas oxidativas: lacase de *Trametes versicolor*, peroxidase de *Bjerkandera adusta* e GOx de *Aspergillus niger*, assim, fazendo um total combinado em cascata enzimática. Experimentos foram realizados para testar a capacidade da combinação enzimática degradar vários compostos ativos, dentre eles, naproxeno, diclofenac, diazepam, ciprofloxacina, trimetoprima. Uma remoção alta foi alcançada (mais de 80%) para os cinco compostos (TOUAHAR et al., 2014).

Um sistema homogêneo que consiste em nanoprismas de prata e GOx, sensível, e de baixo custo, para detecção colorimétrica simples de glicose no soro. Neste sistema, devido à sensibilidade ultra-elevada, apenas 10 mL de soro são suficientes para a determinação. O sensor de glicose tem um grande potencial nas aplicações de diagnósticos, especialmente para os países do terceiro mundo onde diagnósticos de alta tecnologia são inacessíveis para a maior parte da população (XIA et al., 2013).

Liu et al. (2014) descreveram um imunoenensaio colorimétrico quantitativo com base em GOx, que pode detectar biomarcadores de câncer, em níveis picomolares. Cheng *et. al.*, 2012, desenvolveram um imunossensor altamente sensível baseado em nanopartículas de ZnO e glicose oxidase para a detecção de biomarcadores de câncer. A estratégia de ampliação da aplicação desta enzima, na indústria farmacêutica, é uma boa promessa para a aplicação na triagem clínica (CHENG et al., 2012; LIU et al., 2014).

FAROOQ et al. (2013) realizaram uma pesquisa sobre o branqueamento enzimático do tecido de malha de algodão, utilizando GOx. A técnica de branqueamento enzimático foi desenvolvida para ser melhor do que a técnica convencional, no que diz respeito à brancura, além das propriedades mecânicas, como resistência à tração e resistência ao rasgamento. Observou-se um aumento de cerca de 6% no índice de brancura do tecido e aumentou a resistência à tração. O peróxido de hidrogênio produzido pela GOx é a alternativa de branqueamento mais utilizada na indústria de transformação de têxteis.

Enzimas, incluindo a glicose oxidase, estão ganhando importância e popularidade na indústria como alternativa aos tratamentos químicos tradicionais, especialmente quando se torna mais rentável produzir. Espera-se ver mais avanços, investimentos e inovações nas aplicações da GOx, no futuro.

2.1.2. Micro-organismo produtores de Glicose Oxidase

São destacados, na literatura, vários micro-organismo produtores de GOx. O quadro 1 apresenta um resumo dos principais fungos produtores desta enzima.

Foi realizado um estudo com o objetivo de coletar e isolar fungos filamentosos do solo, plantas e bagaço da cana-de-açúcar. Quarenta isolados foram examinados quanto à sua capacidade de produzir várias enzimas, dentre os quais, a GOx. Entre estes, pelo menos três produziram altos níveis de glicose oxidase, sendo *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus versicolor* os melhores produtores (GUIMARÃES et al., 2006).

Micro-organismo do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* se destacam como bons produtores de GOx (BODADE et al., 2013). Isolados de *Aspergillus niger* foram avaliados quanto a produção de GOx por bioprocessos submersos e em estado sólido. A alta atividade da enzima foi observada em 24 e 48 h de bioprocessamento submerso, no qual observou-se uma atividade enzimática de 10 U/mL. A GOx produzida pela mesma espécie foi purificada, no qual atividades máximas de 60 U/mg de proteínas foram obtidas (SINGH et al., 2014).

A expressão heteróloga em outras células hospedeiras tem sido empregada para potencializar a produção de GOx. Esta metodologia, em micro-organismo que utilizam recombinação genética, ainda é o ponto alto no desenvolvimento e exploração da biotecnologia moderna, já que algumas proteínas são encontradas em quantidades limitadas em sua fonte natural. Os principais genes envolvidos correspondem ao gênero *Aspergillus*, e o principal gênero hospedeiro é *Pichia* (BLAZ et al., 2014; GAO et al., 2012; GU et al., 2015; MENG et al., 2013)

Quadro 1. Micro-organismo produtores de Glicose Oxidase.

Microrganismo	Composição do meio (g/L)	Ensaio enzimático	Atividade	Referências
<i>Aspergillus niger</i> – Gene expresso em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Meio YPD: Extrato de levedura, 10; Peptona, 20; Glicose, 20.	Ensaio em placa, com o-dianisidina-peroxidase.	125 U/mL	Hodgkins et al. (1993). Malherbe et al. (2003).
<i>Penicillium variabile</i> P16	Glicose,80; NaNO ₃ ,5; KCl,0.5; KH ₂ PO ₄ ,1; FeSO ₄ .7H ₂ O,0.01; Peptona micológica, 1; CaCO ₃ ,35.	A redução da benzoquinona pela hidroquinona medida pela taxa de aumento da absorbância a 290 nm.	5,52 U/mL	Petruccioli et al. (1999). Petruccioli et al. (1995b)
<i>Aspergillus niger</i> (BTL)	Sacarose,70; (NH ₄) ₂ HPO ₄ ,0.4; KH ₂ PO ₄ ,0.2; MgSO ₄ .7H ₂ O,0.2; peptone,10; CaCO ₃ ,35	Reação o-dianisidina-peroxidase.	7,5 U/mL	Hatzinikolaou e Macris (1995)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante	Extrato de levedura,40; hycas, 5; glicose, 20; galactose,30.	Reação ATBS	3,43 U/mg de cél.	Kapat et al. (2001).
<i>Aspergillus niger</i> AM111	Glicose,80; peptone,30; NaNO ₃ ,0.5; KH ₂ PO ₄ ,1; CaCO ₃ ,35	Ensaio de reação acoplada	2,5 U/mL	Fiedurek e Gromada (2000)
<i>Penicillium pinophilum</i> DSM 11428	Sacarose,40; Na ₂ PO ₄ .2H ₂ O,4; KH ₂ PO ₄ ,1.5; NaNO ₃ , 1.9; MgSO ₄ .7H ₂ O,0.2; CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.02; extrato de malte,10; extrato de levedura,5; Traço elementar,10; vitamina,10.	Reação ABTS - peroxidase	1,9 U/mL	Rando et al. (1997).
<i>Aspergillus niger</i> ZBY-7	Glicose,150; sais inorgânicos,0.35; carbonato de metal,35	Titrimetria	6 U/mL	Tongbu et al. (1996).
<i>Penicillium amagasakiense</i> mutante – Gene V564T expresso em <i>Escherichia coli</i>	Meio LB-rich: Triptona,10; extrato de levedura,5; NaCl,5.	Teste Enzimático de Ferrocenometanol (FMox)	800 U/mg	Mano et. al., 2014 (Patente)

Fonte: Bankar, 2009 (modificado)

Haq et al. (2014) estudaram a produção de GOx da linhagem selvagem *Aspergillus niger* IIB-31 por meio de mutagênese aleatória, usando mutagênicos químicos, com o objetivo de aumentar o rendimento da cepa selvagem. *Aspergillus niger* IIB-31 foi tratado com mutagênicos químicos, tais como metano sulfonato de etilo (EMS) e ácido nitroso. Usando bioprocessamento submerso, a cepa mutante, tratada com EMS, conseguiu a maior produção de GOx (69,47 U/mL) (HAQ et al., 2014a).

A produção de GOx vem sendo cada vez mais necessária, afim de atender o mercado mundial. Estudos que visam a descoberta de novas fontes e a otimização de produções existentes têm um grande valor para a literatura, sendo que esta é uma enzima altamente utilizada pela indústria, como podemos ver a seguir.

2.2. Características gerais da Glicose Oxidase

O peso molecular da GOx varia de aproximadamente 130 kDa a 175 kDa. A enzima GOx é altamente específica para o β -anômero de D-glicose. A taxa de oxidação é cerca de 157 vezes mais rápida que para o α -anômero de D-glicose. Baixos níveis de GOx são exibidos quando se utiliza 2-desoxi-D-glicose, D-manose e D-galactose como substratos. Os inibidores de GOx incluem p-cloromecuribenzoato, Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Hidroxilamina, hidrazina, fenilhidrazina, dimedona e bissulfato de sódio (MENG et al., 2013)

Nakamura e Ogura (1968) realizaram estudos comparativos sobre as enzimas GOx de *A. niger* e *P. amagasakiense*. Os pesos moleculares das enzimas GOx a partir dos 2 organismos foram determinados como sendo 150 kDa para o *P. amagasakiense* e 152 kDa para *A. niger*. As composições, das enzimas, de hidrato de carbono e de aminoácidos também foram pesquisadas e comparadas, o que indicou que

carboidratos similares estavam contidos em ambas as enzimas que continham principalmente glicose, manose e hexosamina. A GOx de *A. niger* continha mais manose e hexosamina do que a de *P. amagasakiense*, mas menos glicose.

Verificou-se que o teor global de hidratos de carbono era de 16% para *A. niger* e 11% para *P. amagasakiense*. Os conteúdos de aminoácidos de ambas as enzimas mostraram que a GOx *A. niger* continha mais histidina, arginina e tirosina e menos lisina e fenilalanina do que a GOx de *P. amagasakiense* (Nakamura e Fujiki, 1968). Os intervalos de pH ótimos para a produção da GOx de *A. niger* e de *P. amagasakiense*, foram mostrados como 3,5-6,5 e 4,0-5,5, respectivamente. Verificou-se que a GOx de *A. niger* tinha um intervalo de pH mais amplo do que a GOx de *P. amagasakiense*. O pH ótimo para a ação catalítica da enzima é amplo, encontra-se entre 4,5 e 7,0 (FERRI et al, 2011).

2.3. Potencial biotecnológico dos fungos presentes na Amazônia

Os solos da Floresta Amazônica possuem uma restrita camada fértil de matéria orgânica, em sua superfície. Nela os organismos vivos reciclam os nutrientes disponíveis no ambiente. Vários fatores contribuem para o processo, como a restrita variação do clima, a umidade relativa do ar e a temperatura (FERREIRA et al., 2006; FISCH et al, 2006; VOLKOFF; CERRI, 1981).

O ambiente afeta diretamente o metabolismo microbiano, induzindo os fungos do solo a ativar muitas rotas metabólicas para a degradação de variados componentes, dependendo das condições do meio em que se encontram e da disponibilidade de nutriente (PETIT et al., 2009). Eles liberam enzimas extracelulares,

as quais degradam essas substâncias antes de serem internalizadas por suas células, e utilizam-nas como fonte de energia (ŠNAJDR et al., 2011).

Os fungos encontrados no solo são na sua maioria Ascomycetos assexuados e Zigomicetos (BASSI et al, 2011; GAMS, 2007). Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido amplamente relatadas como agentes presentes no solo sendo importantes na ciclagem do carbono, como agentes de controle biológico e como produtores de enzimas(CELESTINO et al., 2014b; CHÁVEZ et al, 2006; DELABONA et al., 2012; MENDES et al., 2015).

A Amazônia possui uma ampla diversidade de micro-organismo que podem ser explorados para a produção de diferentes enzimas de interesse industrial nas mais diversas áreas, como demonstrado no tabela 3.

Tabela 3. Micro-organismo, isolados da Floresta Amazônia, produtores de enzimas de interesse industrial.

Substância produzida	Micro-organismo	Local da Coleta	Metodologia de produção	Referência
Celulase alcalina	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	Solo da Floresta de Macuya, Perú	Bioprocesso submerso	Vega <i>et. al.</i> (2012)
Amilase	<i>Rhizobium</i> spp. <i>Bradyrhizobium</i> spp.	Várzea da Amazônia Central	Bioprocesso submerso	Oliveira <i>et. al.</i> (2010)
Lipopeptídeos	<i>Bacillus</i> spp.	Bacia Amazônia	Crescimento em estado sólido	Velho <i>et. al.</i> (2011)
Celulase	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Floresta Amazônica	Bioprocesso em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais	Delabona <i>et. al.</i> (2012)
D-Xilose	Leveduras	Floresta Amazônica	Bioprocesso Submerso utilizando hidrolisado de Bagaço de cana	Cadete <i>et. al.</i> (2012)
Lipase	Bactérias	Solos e raízes da Amazônia	Bioprocesso submerso utilizando substratos oleaginosos da flora da Amazônia	Willerding <i>et. al.</i> (2011)
Hidrolase serina	Fungos endofíticos	Parque Nacional Yasuní, Amazônia equatoriana	Crescimento em meio de cultura sólido, contendo PUR como única fonte de carbono	Russell <i>et. al.</i> (2011)
Pigmentos	<i>Aspergillus calidoustus</i> <i>Penicillium</i> sp.	Solo da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia, Brasil	Cultura submersa	Celestino <i>et. al.</i> (2014)
Amilase	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	Manipueira (subproduto líquido obtido da produção de farinha)	Bioprocesso em estado sólido, utilizando farelo de trigo	Celestino <i>et. al.</i> (2014)
Lacase	Agaricomycetes	Madeira em decomposição na Universidade Federal do Amazonas, Brasil	Bioprocesso submerso	Santos <i>et. al.</i> (2015)
Protease	<i>Trametes</i> sp	Casca de árvore em decomposição	Bioprocesso em estado sólido	Mendes <i>et. al.</i> (2015)
Lipase	<i>Colletotrichum</i> sp.	Folhas e frutos da Floresta Amazônica, Estado do Pará, Brasil	Bioprocesso em estado sólido	Silva <i>et. al.</i> (2015)
Proteínas de coagulação do leite	<i>Aspergillus flavo furcatis</i>	Resíduos de fruta da Amazônia	Bioprocesso submerso contendo exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz.	Alecrim <i>et. al.</i> (2015)
Celulase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Floresta Amazônica	Bioprocesso em estado sólido	Pirota <i>et. al.</i> , (2016)
Enzimas pectinolíticas	<i>Cladosporium</i> sp <i>Aspergillus</i> sp <i>Rhizopus</i> sp	Floresta Amazônica	Bioprocesso submerso	Cangussu <i>et. al.</i> , (2016)

Obs: A especificidade das informações foi dependente dos dados disponíveis pelos autores.

2.4. Produção Industrial de Enzimas

A produção industrial de enzimas acontece principalmente pelo processo de fermentação submersa, que envolve o crescimento de micro-organismo em um meio rico e com elevadas concentrações de oxigênio. Os processos mais utilizados para a produção são o processo contínuo e o processos em batelada alimentada. Parâmetros operacionais como temperatura, pH, taxa de alimentação, consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono são medidos e controlados para otimizar o processo de fermentação. Para o aumento da escala de produção, são utilizados os biorreatores (BAILEY; POUTANEN, 1989)

Os biorreatores são equipamentos usados para converter matérias-primas em produtos utilizando micro-organismo, células animais ou vegetais ou enzimas. Os biorreatores têm por objetivo proporcionar as condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato, sais minerais, vitaminas e oxigênio para que micro-organismo e células cresçam e produzam metabólitos de interesse. O tipo de biorreator mais utilizado é o de tanque agitado (STR). A primeira aplicação data dos anos 40, quando foi utilizado durante a II Guerra Mundial no cultivo aeróbio para produção do antibiótico penicilina (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001)

Na indústria de fermentação, os biorreatores tipo tanque agitado e aerado são os mais empregados. Algumas das razões é por assegurar correta homogeneização do nutrientes, um mínimo de morte celular resultante da adição de ácido e base concentrados para o controle de pH, uma confiável transferência de calor para o controle da temperatura e de massa para o suprimento de oxigênio e a facilidade no aumento de escala (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001)

2.5. Fatores que influenciam na produção de Glicose Oxidase

Substâncias importantes para a composição do meio de cultura devem ser avaliadas para a melhor eficácia da produção enzimática. Uma ampla lista de compostos são estudados afim de melhor conhecer os fatores que influenciam na produção de GOx. Dentre eles, podem destacar-se a concentração de glicose, fontes de nitrogênio, CaCO₃, FeSO₄, MgSO₄, CuSO₄, HgCl₂, ZnSO₄, BaSO₄, KH₂PO₄, pH e aeração (BANKAR et al., 2009a).

Kriia et. al., em 2015, utilizaram a espécie *Aspergillus tubingensis* para comparar bioprocesso submerso (SMF) e bioprocesso em estado sólido (SSF), avaliando o crescimento do fungo, para a produção de GOx. Resultados cinéticos mostraram que o crescimento fúngico utilizou glicose e ácido glucônico como substratos e que SMF é mais adequada para crescimento de fungos. No entanto, SSF levou o fungo a produzir mais GOx, 170,59 U/mL contra 43,73 U/mL por SMF (KRIIAA; KAMMOUN, 2009).

Hatziukolaou & Macris, em 1995, investigaram alguns fatores que afetam a produção extracelular de GOx por *Aspergillus niger*. A intenção era a de maximizar a atividade total de GOx. O trabalho identificou CaCO₃, como um forte indutor da atividade da GOx e que a utilização de melaços como fonte de carbono aumenta a atividade da enzima em aproximadamente 40 vezes (MACRIS, 1995).

Bodade et. al., em 2010, estudaram a otimização da produção extracelular de GOx por *Penicillium chrysogenum* isolado de queijo em decomposição. A máxima produção foi atingida em caldo de bioprocesso a pH 6 e a 20° C após 72 h de incubação. Dos sete íons estudados, CaCO₃ e FeSO₄ atuam como

moduladores, enquanto que com MgSO_4 , CuSO_4 , HgCl_2 , ZnSO_4 e BaSO_4 obteve-se a produção mais baixa (BODADE et al, 2010).

Khurshid *et. al.* (2011) realizaram a otimização da produção de GOx por *Aspergillus niger* isolado de batata. A produção máxima da enzima foi obtida em 10% de concentração de glicose, após 48 h de bioprocesso submerso. O pH ótimo para a produção de enzima foi de 5,5. A adição de ureia (0,2%) e KH_2PO_4 (0,4%), no meio de bioprocesso, aumentou a atividade da enzima, enquanto que a adição de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ inibiu a produção (KHURSHID et al., 2011).

A produção de GOx é aumentada em ambientes com alta concentração de oxigênio e glicose porém, estudos mostram que nenhuma quantidade desta enzima pode ser obtida em ambientes onde a concentração de oxigênio dissolvido é menor que 7%. No entanto, estão sendo realizadas várias pesquisas com o objetivo de otimizar a produção de GOD através da utilização de cepas mutantes de *Aspergillus niger*. Nestes casos, há possibilidade de haver formação da enzima mesmo em concentrações de oxigênio inferiores a 7% (LIU et al., 2003; RAMZAN; MEHMOOD, 2009)

Jithendar *et. al.*, em 2014, estudaram vários parâmetros do bioprocesso, tais como pH médio, temperatura de incubação, velocidade de agitação, fonte de carbono e fontes de nitrogênio, utilizando o método *One factor at a time* (OFAT). A atividade mais elevada de GOx foi obtida a pH 5,5, temperatura de incubação 30 °C, velocidade de agitação 140 rpm, 50 g/L de glicose como fonte de carbono e 10 g/L de extrato de carne e extrato de levedura, em 72 horas de incubação (JITHENDAR; et al, 2014).

Farid *et. al.* (2013) usaram a metodologia de superfície de resposta (RSM), empregando o desenho fatorial fracionado (DFF) para otimizar o meio de bioprocessamento para a produção de GOx a partir de um isolado de *Aspergillus niger* em bioprocessamento submerso. Utilizou-se CaCO_3 , fosfato de amônio e MgSO_4 como fatores. Um modelo de superfície de resposta e método quadrático de segunda ordem mostrou que as concentrações (g/L) ótimas de glicose, 100; CaCO_3 , 25; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,8 e 0,4 de MgSO_4 , resultou numa melhoria de produção de GOx ($170 \pm 0,88$ U/mL) em comparação com o nível inicial ($109,81 \pm 1,38$ U/mL), depois de quatro dias de incubação a 200 rpm e 30 °C (FARID *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho tem como objetivo principal investigar a produção de Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4) por fungos isolados de amostras de solo da Floresta Amazônica.

Para tanto, especificamente objetivou-se:

- I. Isolar fungos das amostras de solo da Floresta Amazônica;
- II. Selecionar os isolados produtores de GOx;
- III. Determinar as melhores condições de bioprocessamento;
- IV. Produzir GOx utilizando processo semi-contínuo;
- V. Conhecer as características bioquímicas da enzima produzida;
- VI. Validar o potencial e aplicação da enzima produzida em um Kit de detecção de glicose.

4. APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS

Os materiais, metodologias, resultados e discussões dessa presente tese estão apresentados na forma de capítulos:

Capítulo 1 – Apresenta “Isolamento, identificação e detecção de fungos produtores de Glicose Oxidase”. Esse capítulo foi publicado no *African Journal of Microbiology Research* (Apêndice A);

Capítulo 2 – Apresenta “Caracterização da enzima Glicose Oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01”. O artigo resultante será submetido ao periódico *Enzyme Research*.

Capítulo 3 – Apresenta “Análise comparativa de dois métodos de detecção de glicose, utilizando a Glicose Oxidase, produzida por *Aspergillus niger* LMM01”. O artigo resultante será submetido no *Annals of Clinical and Laboratory Science*.

5. CAPÍTULO 1

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE GLICOSE OXIDASE

Diego Rayan T. Sousa¹, Elusiane S. Santos², Ana Cláudia A. Cortez², João Vicente B. Souza^{1,2}.

¹Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal–PPGBIONORTE – Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio 6200, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil.

²Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-97, Manaus, Amazonas, Brasil.

RESUMO

A GOx tem várias aplicações industriais. Acredita-se que existem várias espécies de fungos que têm a capacidade de produzir esta enzima, e a maioria são inexplorados. Este trabalho tem por objetivo investigar a produção de Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4) por fungos isolados de amostras de solo da floresta amazônica. Os fungos filamentosos foram isolados de amostras de solo da Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada em Manaus, Amazonas. As cepas foram submetidas ao bioprocessamento para selecionar os melhores produtores de GOx. Os isolados que se destacaram na produção da enzima, foram submetidos a testes cinéticos que avaliaram a produção da enzima, o consumo do substrato e a biomassa. Além disso, foram realizados experimentos para avaliar as melhores fontes de carbono, nitrogênio e fósforo e a influência de fatores de

bioprocesso. Finalmente, a produção de GOx foi analisada em um sistema semi-contínuo por sete dias. Os isolados mais frequentes das amostras de solo pertenceram ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. *Aspergillus niger* LMM01 foi o melhor produtor de GOx. Glicose, peptona e KH_3PO_4 demonstraram ser as melhores fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, respectivamente. Experiências multivariadas demonstraram que os parâmetros com maior efeito na produção de GOx foram pH e agitação. Obteve-se um resultado estável para GOx (7,74 U / ml), durante sete dias, utilizando o processo semi-contínuo. Neste contexto, a nova fonte amazônica desta enzima (*A. niger* LMM01) e a produção enzimática em processo semi-contínuo demonstram a importância do presente trabalho.

Palavras-chave: biotecnologia, enzima, microrganismo, bioprocesso.

Introdução

A Glicose Oxidase (GOx, β -D-glicose: oxigênio, 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) catalisa a oxidação da glicose pelo oxigênio molecular (BANKAR et al., 2009a). Desde o início dos anos 1950 Glicose Oxidase tem sido amplamente utilizado na fabricação de ovos em pó, tiras de teste de papel para pacientes diabéticos, aplicação para GOx é a sua utilização em biossensores (CHOI et al., 2015; HWA, 2015; WONG et al., 2008). A Glicose Oxidase é produzida pelos fungos como um mecanismo de defesa e tem efeitos antimicrobianos. Esta enzima também pode ser uma boa alternativa aos tradicionais tratamentos químicos e físicos na preservação de alimentos (ABER et al., 2016; AMIRI et al.,

2016; RÖCKER et al., 2016). No entanto, esta enzima tem baixa produção no Brasil.

As fontes microbianas mais comuns do GOx são *Aspergillus* e *Penicillium*, embora a maioria de suas preparações comerciais seja obtida de espécies de *A. niger* (KHAN et al., 2016; SAPOUNTZI et al., 2017). Houve um crescimento extensivo no uso desta enzima na área da nanotecnologia para a composição que detecta os biossensores de glicose, desestimulando sua importância em outras áreas já mencionadas (ABER et al., 2016; FAPYANE et al., 2016; SAPOUNTZI et al., 2017).

A floresta amazônica tem grande potencial para a bioprospecção de substâncias úteis de fungos isoladas (CELESTINO et al., 2014). Os papéis dos fungos no solo são complexos e críticos para manter a funcionalidade do bioma. Os fungos podem atuar em ciclagem de nutrientes e desenvolver associações simbióticas ou patogênicas com plantas e animais, além de interagir com outros microrganismos. A magnitude das funções desempenhadas pelos fungos pode ser melhor compreendida considerando a diversidade deste grupo de organismos. No entanto, não existem estudos publicados que avaliem os produtores de GOx da floresta amazônica (JO ATILDE O et al., 2016; MENDES et al., 2015; SALONY et al., 2016; SANTOS et al., 2015).

O presente trabalho descreveu a GOx produzida por *A. niger* LMM01, uma nova fonte de produção de GOx. Além disso, foram investigadas as melhores condições de bioprocessamento e examinado o potencial em um sistema semi-contínuo. Centros acadêmicos, indústria e população são os maiores beneficiados do resultado positivo desta abordagem.

Material e Métodos

Isolamento e Identificação dos fungos provenientes do solo da Floresta Amazônica

As amostras de solo foram coletadas em junho de 2014 da reserva florestal Adolpho Ducke (02°55'-03°01'S, 59°53'- 59°59'W) Manaus-AM Brasil. Aproximadamente 1 g de solo superficial (2 cm de profundidade) foi submetido a diluições sucessivas (1×10^{-1} - 1×10^{-5}) e alíquotas de 100 μ L foram semeadas em placas de petri contendo Ágar de Dextrose de Batata (BDA) com cloranfenicol (250 mg/L). As placas foram incubadas a 30° C e monitorizadas diariamente durante 14 dias para isolamento de fungos filamentosos. As colônias isoladas foram purificadas e armazenadas em BDA a 36° C (GOMES et al., 2005). Estas colônias puras permaneceram à 4° C durante o armazenamento e após o procedimento.

Os isolados foram transferidos para dois tubos, sendo um armazenado a 4° C e o outro foi utilizado nos experimentos. Os gêneros isolados foram investigados por avaliação micromorfológica (BRIDGE; SPOONER, 2001) e a definição das espécies foi obtida por seqüenciamento de ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr.

O DNA foi extraído das amostras (200 μ L de biomassa fúngica) utilizando o kit QIAamp Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado por absorvância à 260 nm utilizando Genequant (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As reacções de PCR tinham um volume final de 50 μ L contendo tampão de PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, iniciadores 0,5 μ M de ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS- 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),

dNTPs 200 μ M, DNA polimerase marcada com ampli de 1,5 U e 100 ng de DNA fúngico.

A PCR foi realizada como descrito por WHITE et al. (1990), nas seguintes condições de PCR: a desnaturação inicial a 94° C durante 5 minutos foi realizada 35 ciclos, consistindo de desnaturação de DNA a 94° C durante 1 minuto, anelamento a 55° C durante 1 minuto e extensão a 72° C durante 2 minutos e finalmente uma extensão final a 72° C durante 10 minutos. Incluem-se na amplificação dois controles positivos e um controle negativo. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % e corados com SYBR® Green (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, Carlsbad, EUA). Um DNA de 100 pb (SM0331, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemanha) serviu como marcador de tamanho.

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando uma solução de polietilenoglicol-PEG (10 g de polietilenoglicol 800, 7,3 g de NaCl em 35 mL de água). Volumes semelhantes de soluções de PEG e amplicons foram transferidos para tubo de microcentrífuga (1,5 mL) homogeneizados e incubados (37° C durante 15 minutos). Em seguida a mistura foi centrifugada (15 minutos a 6.000 g), o sobrenadante foi rejeitado, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol a 70% e ressuspenso em água.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye® (Applied Biosystem). O sequenciamento foi realizado em Seq 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Seleção de produtores de glicose oxidase

Os isolados fúngicos foram incubados em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio (KH₂PO₄ 5 g/L, CaCl₂ 0,1 g/L, MgSO₄.7H₂O, 0,5 g/L, FeSO₄.7H₂O 0,01 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,01 g/L de MnSO₄.H₂O 0,03 g/L, peptona 5 g/L e glicose 80 g/L, pH 6,0). Suspensão de esporos (1x10⁵ esporos/mL) foi inoculada no meio de cultura. O bioprocesso foi incubado a 26° C durante 96 horas sob agitação orbital (100 rpm). Após incubação, as atividades enzimáticas foram determinadas.

Determinação da glicose oxidase

Para a determinação de GOx foi utilizado o método de o-dianisidina, proposto por HAQ et al. (2014b), modificado. O caldo fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min para separar a biomassa. Para a determinação de GOx utilizou-se uma mistura reacional consistindo em 0,1 mL de D-glicose 0,01M; 0,75 mL de o-dianisidina a 0,02% em tampão fosfato a pH 6; 0,25 µg de peroxidase (EC 1.11.1.7) e 0,1 ml de solução enzimática (GOx). A mistura foi incubada durante 10 min a 35° C. A reação foi parada por adição de 0,5 mL de HCl 4N e quantificada a 500 nm. Uma unidade (U) da atividade de GOx foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 mmol de glicose por minuto em condições de ensaio. A equação 3 calculou a produtividade enzimática máxima.

$$\text{GOx U/mL} = \frac{[(\text{ABS}/\text{teste} - \text{ABS}/\text{controle neg.}) \cdot (\text{V1}) \cdot (\text{Df})] \cdot \text{T}^{-1}}{(7,5) \cdot (\text{V2})} \quad (\text{equação 3})$$

Onde: V1 = volume (em mL) de ensaio; (Df) = fator de diluição do caldo; 7,5 = coeficiente de extinção milimolar para o-dianisidina oxidada a 500 nm; V2 = volume (em ml) de caldo contendo enzima e T = tempo de duração da reação.

Uma unidade irá oxidar 1,0 umol de β -D-glicose a gluconolactona e δ -H₂O₂ por minuto a pH 7,0 a 35° C.

Cinética da produção de GOx com os isolados selecionados

A cinética foi realizada utilizando isolados com as melhores produções de GOx. As condições do bioprocessamento foram semelhantes às utilizadas no item “*Seleção de produtores de glucose oxidase*”. Os sólidos solúveis (g/L), biomassa (g/L) e produção de GOx (U/mL) foram quantificados a cada 24 horas durante 120 horas. Além disso, determinou-se a produtividade de GOx (Equação 1) e a relação $Y_{P/S}$ (Equação 2).

$$PE = \frac{AE_{\max} - AE_{t_0}}{T_f} \quad (\text{equação 1})$$

Onde PE = produtividade enzimática máxima; AE_{\max} = atividade enzimática máxima; AE_{t_0} = atividade enzimática inicial; e T_f = tempo (dias) de fermentação em que se observou a atividade máxima.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Massa do produto obtido}}{\text{Massa do substrato consumido}} \quad (\text{equação 2})$$

Determinação de Biomassa

O micélio foi separado do meio de cultura por filtração usando papel de filtro Whatman N° 1, previamente seco a 105° C durante 24 horas. O crescimento do fungo foi quantificado em termos de peso seco micelial por mL. Para este fim, o micélio obtido após filtração foi transferido para o forno a 105° C durante 24 horas e depois pesado para determinar o peso seco.

Determinação de açúcares

A concentração de açúcares redutores (RS) foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico 3,5 – DNS, proposto por MILLER (1959). As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm durante 5 min, diluídas com H₂O e transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução de reagente DNS. Depois de aquecer em um banho de água à temperatura de ebulição durante 5 min e subsequente resfriamento com água corrente, a leitura de absorvância de cada amostra foi realizada a 540 nm em um espectrofotômetro digital FEMTO 700S. O controle branco utilizado para calibrar o aparelho foi obtida utilizando apenas 1 mL de água destilada. A absorvância observada foi correlacionada com a concentração de açúcar redutor usando uma curva padrão de glicose (AHMED et al., 2016).

Avaliação das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo

Através de uma estratégia univariada, avaliou-se a melhor fonte de carbono, nitrogênio e fósforo. As condições principais do bioprocessamento foram semelhantes às utilizadas em “*Seleção de produtores de glucose oxidase*”. As fontes de carbono (80 g/L) testadas foram: xilose, maltose, glicose, sacarose, galactose e lactose. As fontes de nitrogênio (5 g/L) testadas foram: extrato de levedura, extrato de malte, peptona, peptona de soja e KNO₃. As fontes de fósforo (5 g/L) foram: Na₃PO₄, KH₂PO₄ e P₄O₁₀.

Avaliação da influência dos fatores envolvidos no processo através do desenho fatorial

Através de experimentos multivariados, avaliou-se a influência dos fatores: [Concentração de Carbono] [Concentração de Nitrogênio]

[Concentração de Fósforo] [agitação] e [pH], na produção de GOx. As condições do bioprocessamento foram semelhantes às utilizadas em “*Seleção de produtores de glucose oxidase*”.

As influências dessas variáveis foram estudadas de acordo com um delineamento experimental completo, com o objetivo de identificar os fatores com influência estatística. Foram realizados 32 experimentos, com três pontos centrais. Um modelo matemático foi determinado e a metodologia de superfície de resposta, assim como os pontos centrais foram utilizados para calcular o erro experimental. Os níveis dos fatores estudados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis utilizados para a concentração de carbono, concentração de nitrogênio, concentração de fósforo, pH e agitação orbital no desenho experimental 2^5 para a produção de GOx, pelo fungo selecionado.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Concentração de Glicose (g/L)	60	80	100
Concentração de Peptona (g/L)	3	5	7
Concentração de KH_3PO_4 (g/L)	3	5	7
pH	5	6	7
Agitação orbital (rpm)	80	100	120

Produção de Glicose Oxidase em bioprocessamento semi-contínuo

As culturas foram processadas em frascos de 2 L contendo 0,5 L de meio. O bioprocessamento foi mantido a 27°C à 120 rpm (velocidade de agitação). O pH da cultura foi controlado a 6,0. As culturas foram crescidas sob luz ambiente, e as condições foram idênticas para todas as fases de crescimento. Para a operação semi-contínua, após 72 horas de crescimento inicial, iniciaram-se as outras fases de crescimento, com 24 horas cada, seguindo os mesmos parâmetros de cultivo,

removendo 0,33% do meio fermentado e substituindo pela mesma quantidade de novo meio.

Como alternativa, no processo semi-contínuo, a determinação de sólidos totais, pelo método de Brix°, foi medido, em refratômetro ATAGO Pocket PAL-1, a 25° C. O refratômetro foi calibrado utilizando uma solução de sacarose como padrão, de modo que 1 Brix° foi equivalente a 1 g de sacarose por 100 g de solução.

Resultados

Isolamento e Identificação dos fungos isolados do solo da Floresta Amazônica

As amostras de solo foram diluídas e transferidas para o meio de cultura para isolamento fúngico. Foram realizadas técnicas de identificação (micromorfologia e sequenciamento ITS1-5.8S-ITS2). Os isolados pertenciam principalmente aos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Tabela 2).

Tabela 2. Gêneros fúngicos isolados de amostras de solo superficial (2 cm de profundidade) da Floresta Amazônica (Lat. 02°95'43" S; Longo: 59°93'39"O).

Código	Organismo	Código	Organismo	Código	Organismo	Código	Organismo
LMM01	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM26	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM51	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM76	<i>Penicillium</i> sp.
LMM02	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM27	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM52	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM77	<i>Oidiodendron</i> sp.
LMM03	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM28	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM53	<i>Paecilomyces</i> sp.	LMM78	<i>Penicillium</i> sp.
LMM04	<i>Fusarium</i> sp.	LMM29	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM54	<i>Penicillium</i> sp.	LMM79	<i>Trichoderma</i> sp.
LMM05	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM30	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM55	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM80	<i>Trichoderma</i> sp.
LMM06	<i>Fusarium</i> sp.	LMM31	<i>Penicillium</i> sp.	LMM56	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM81	<i>Penicillium</i> sp.
LMM07	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM32	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM57	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM82	<i>Oidiodendron</i> sp.
LMM08	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM33	<i>Penicillium</i> sp.	LMM58	<i>Penicillium</i> sp.	LMM83	<i>Penicillium</i> sp.
LMM09	<i>Penicillium</i> sp.	LMM34	<i>Penicillium</i> sp.	LMM59	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM84	<i>Penicillium</i> sp.
LMM10	<i>Penicillium</i> sp.	LMM35	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM60	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM85	<i>Aspergillus</i> sp.
LMM11	<i>Penicillium</i> sp.	LMM36	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM61	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM86	<i>Penicillium</i> sp.
LMM12	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM37	<i>Penicillium</i> sp.	LMM62	<i>Penicillium</i> sp.	LMM87	<i>Penicillium</i> sp.
LMM13	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM38	<i>Oidiodendron</i> sp.	LMM63	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM88	<i>Penicillium</i> sp.
LMM14	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM39	<i>Penicillium</i> sp.	LMM64	<i>Penicillium</i> sp.	LMM89	<i>Paecilomyces</i> sp.
LMM15	<i>Penicillium</i> sp.	LMM40	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM65	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM90	<i>Aspergillus</i> sp.
LMM16	<i>Penicillium</i> sp.	LMM41	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM66	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM91	<i>Paecilomyces</i> sp.
LMM17	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM42	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM67	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM92	<i>Paecilomyces</i> sp.
LMM18	<i>Penicillium</i> sp.	LMM43	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM68	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM93	<i>Penicillium</i> sp.
LMM19	<i>Penicillium</i> sp.	LMM44	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM69	<i>Penicillium</i> sp.	LMM94	<i>Penicillium</i> sp.
LMM20	<i>Penicillium</i> sp.	LMM45	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM70	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM95	<i>Aspergillus</i> sp.
LMM21	<i>Penicillium</i> sp.	LMM46	<i>Trichoderma</i> sp.	LMM71	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM96	<i>Penicillium</i> sp.
LMM22	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM47	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM72	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM97	<i>Aspergillus</i> sp.
LMM23	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM48	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM73	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM98	<i>Penicillium</i> sp.
LMM24	<i>Acremonium</i> sp.	LMM49	<i>Penicillium</i> sp.	LMM74	<i>Penicillium</i> sp.	LMM99	<i>Aspergillus</i> sp.
LMM25	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM50	<i>Aspergillus</i> sp.	LMM75	<i>Penicillium</i> sp.	LMM100	<i>Fusarium</i> sp.

Seleção de fungos produtores de Glicose Oxidase

Isolados fúngicos (n = 100) foram submetidos a bioprocesso submerso, durante 96h. Os níveis de atividade de GOx (U/mL) dos 20 melhores produtores são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Isolados destacados na seleção de produtores de Glicose Oxidase, realizada com fungos isolados de amostras de solo da floresta amazônica.

Microrganismo	GOx (U/mL)
<i>Aspergillus</i> LMM01	3,55 ± 0,03
<i>Aspergillus</i> LMM85	2,90 ± 0,02
<i>Aspergillus</i> LMM15	2,75 ± 0,02
<i>Penicillium</i> LMM29	2,62 ± 0,03
<i>Aspergillus</i> LMM03	1,54 ± 0,02
<i>Aspergillus</i> LMM16	1,51 ± 0,02
<i>Penicillium</i> LMM12	1,49 ± 0,04
<i>Trichoderma</i> LMM17	0,31 ± 0,03
<i>Penicillium</i> LMM41	0,29 ± 0,02
<i>Aspergillus</i> LMM42	0,29 ± 0,02
<i>Trichoderma</i> LMM46	0,27 ± 0,04
<i>Penicillium</i> LMM94	0,19 ± 0,03
<i>Aspergillus</i> LMM59	0,19 ± 0,04
<i>Aspergillus</i> LMM25	0,17 ± 0,02
<i>Aspergillus</i> LMM51	0,16 ± 0,04
<i>Aspergillus</i> LMM99	0,11 ± 0,03
<i>Paecilomyces</i> LMM53	0,09 ± 0,02
<i>Penicillium</i> LMM79	0,03 ± 0,04
<i>Aspergillus</i> LMM52	0,03 ± 0,03
<i>Penicillium</i> LMM83	0,03 ± 0,02

Cinética da produção de GOx com os isolados selecionados

Foi avaliada cineticamente a produção dos sete isolados que se destacaram (Figura 1). Foram estudados GOx [U/mL] (P), biomassa [g/L] (X) e açúcares redutores [g/L] (S) foram quantificados para encontrar o melhor produtor de GOx (Figura 1). *A. niger* LMM01 apresentou maior produtividade (0,093 U/dL) e $Y_{P/S}$ (1,87).

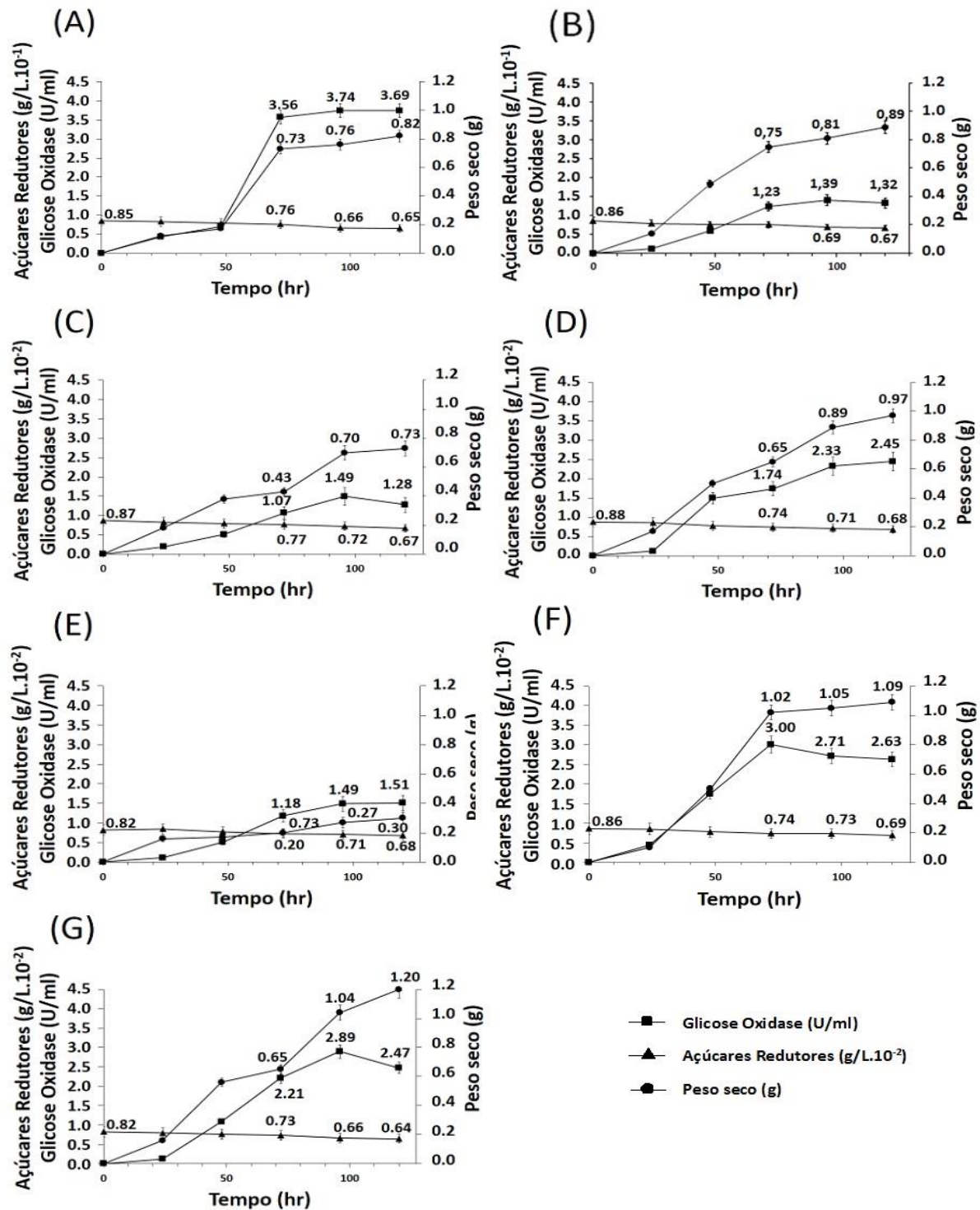


Figura 1. Cinética de produção de Glicose Oxidase por fungos isolados de amostras de solo amazônico. Foi investigada a produção enzimática (P), Açúcares redutores (S) e a produção de biomassa, medida pelo peso seco g/l (X). Onde (A) corresponde a *Aspergillus* LMM01, (B) *Aspergillus* LMM03, (C) *Penicillium* LMM12, (D) *Aspergillus* LMM15, (E) *Aspergillus* LMM16, (F) *Penicillium* LMM29 e (G) *Aspergillus* LMM85.

Avaliação das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo

Foram realizados experimentos para selecionar as melhores fontes de carbono, nitrogênio e fósforo para a produção de GOx, utilizando o isolado *A. niger* LMM01 como o produtor. A glicose, peptona e KH_3PO_4 demonstraram ser as melhores fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, respectivamente (Figura 2).

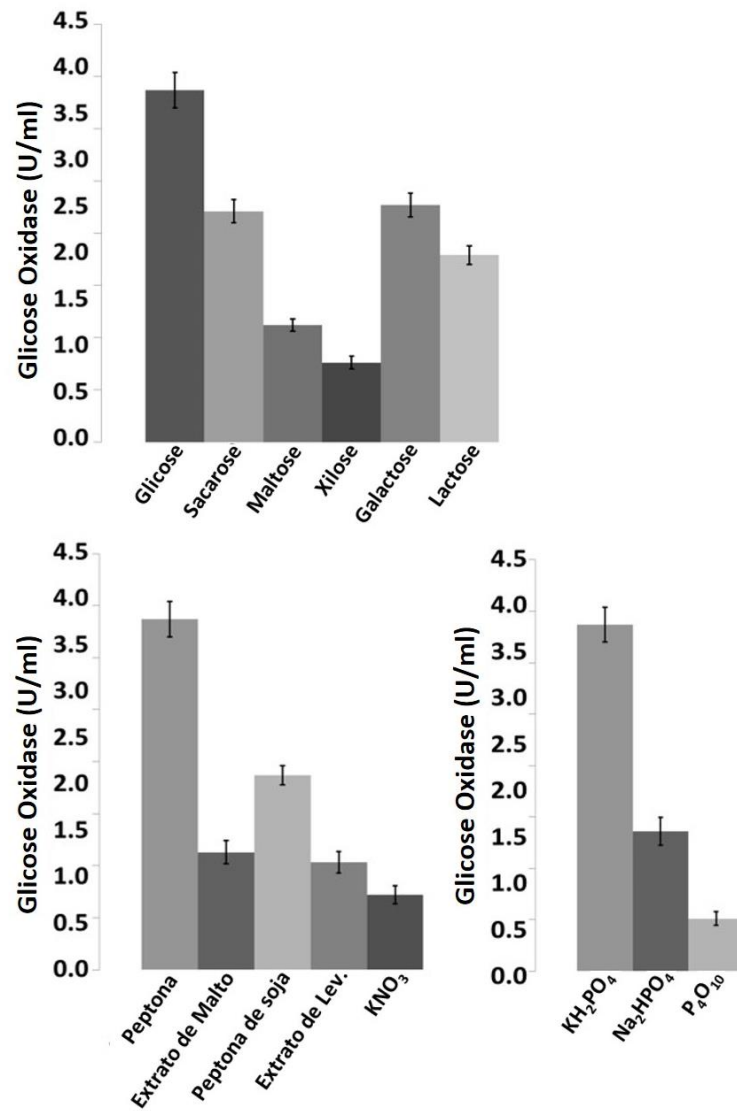


Figura 2. Avaliação de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo para a produção de Glicose Oxidase. O uso de fontes de carbono foi investigado (glicose, sacarose, maltose, xilose, galactose e lactose), fontes de nitrogênio (peptona de carne, extrato de malto, peptona de soja, extrato de levedura e KNO_3) e fontes de fósforo (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e P_4O_{10}) Para a produção de Glicose Oxidase, utilizando no bioprocesso o isolado *Aspergillus niger* LMM01.

Avaliação da influência dos fatores envolvidos no processo através do desenho fatorial

Em adição, experimentos multifatoriais (2⁵) investigaram a influência de fatores: [glicose], [peptona], [KH₃PO₄], agitação orbital (rpm) e pH na produção de GOx. Os níveis de GOx variaram de 0,12 a 7,7 U/mL (Tabela 4). Os efeitos dos fatores e suas interações são mostrados na Tabela 5. O erro padrão (σ) foi calculado e a análise estatística (teste t) foi realizada (Tabela 4). Nas condições experimentais, os fatores considerados significativos para a produção de GOx (95% de confiança) foram: pH (D), agitação (E) e sua interação DE. O modelo matemático (Equação 4) foi desenvolvido de acordo com estes dados:

$$\text{GOx (U/mL)} = 0,525786 - 0,096875 \cdot \text{pH} - 0,108656 \cdot \text{Agitação} + 0,027625 \cdot \text{pH} \cdot \text{Agitação} \quad (\text{Equação 4})$$

A análise de variância (ANOVA) foi realizada (Tabela 6) para validar a Equação 1. Este modelo matemático mostrou regressão significativa e ausência de ajuste. Um gráfico de resposta superficial (Figura 3) foi elaborado para representar os resultados contidos na Equação 1. A superfície de resposta mostrou o maior nível de GOx com pH 6 e agitação orbital de 120 rpm.

Tabela 4. Planejamento fatorial 2⁵ para produção de Glucose Oxidase de *Aspergillus niger* LMM01, os fatores analisados foram: glicose, KH₂PO₄, peptona, pH e agitação orbital. O experimento desta variável de resposta foi a produção de Glucose Oxidase.

Nº de experimentos	Glicose (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Peptona (g/L)	pH	Agitação (rpm)	GOx (U/mL)
1	80	3	3	4	80	0,12

2	80	3	3	4	120	0,34
3	80	3	3	6	80	4,41
4	80	3	3	6	120	6,25
5	80	3	7	4	80	0,21
6	80	3	7	4	120	0,28
7	80	3	7	6	80	4,43
8	80	3	7	6	120	6,04
9	80	7	3	4	80	0,18
10	80	7	3	4	120	0,21
11	80	7	3	6	80	4,71
12	80	7	3	6	120	6,67
13	80	7	7	4	80	0,22
14	80	7	7	4	120	0,28
15	80	7	7	6	80	4,99
16	80	7	7	6	120	7,03
17	100	3	3	4	80	0,13
18	100	3	3	4	120	0,15
19	100	3	3	6	80	4,32
20	100	3	3	6	120	5,87
21	100	3	7	4	80	0,31
22	100	3	7	4	120	0,33
23	100	3	7	6	80	4,82
24	100	3	7	6	120	7,69
25	100	7	3	4	80	0,21
26	100	7	3	4	120	0,32
27	100	7	3	6	80	4,51
28	100	7	3	6	120	6,92
29	100	7	7	4	80	0,42
30	100	7	7	4	120	0,48
31	100	7	7	6	80	3,42
32	100	7	7	6	120	7,41
33	90	5	5	5	100	3,51
34	90	5	5	5	100	3,71
35	90	5	5	5	100	3,69

Tabela 5. Efeitos dos fatores na produção de Glicose Oxidase e desvio padrão calculados para o ponto central.

(Média)	2,98829 +/- 0,0812731
A:Glicose	0,05875 +/- 0,169995
B:KH ₂ PO ₄	0,1425 +/- 0,169995
C:Peptona	0,19 +/- 0,169995
D:pH	5,33125 +/- 0,169995
E:Agitação	1,17875 +/- 0,169995*
AB	-0,13375 +/- 0,169995
AC	0,11625 +/- 0,169995
AD	-0,005 +/- 0,169995
AE	0,20 +/- 0,169995
BC	-0,125 +/- 0,169995
BD	0,08625 +/- 0,169995
BE	0,15375 +/- 0,169995
CD	0,08125 +/- 0,169995
CE	0,16125 +/- 0,169995
DE	1,105 +/- 0,169995*

* Valores estatisticamente significativos $p < 0.05$.

Tabela 6. Análise estatística do planejamento fatorial 2⁵ por ANOVA em uma faixa de confiança de 95%.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	P Valor
D:pH	227,378	1	227,378	1159,85	0,0000
E:Agitação	11,1156	1	11,1156	56,70	0,0000
DE	9,76,82	1	9,7682	49,83	0,0000
Falta de ajuste	1,37943	1	1,37943	8,81	0,0058
Erro puro	4,69784	30	0,156595		
Total (corr,)	254,339	34			

$R^2 = 97,6106 \%$

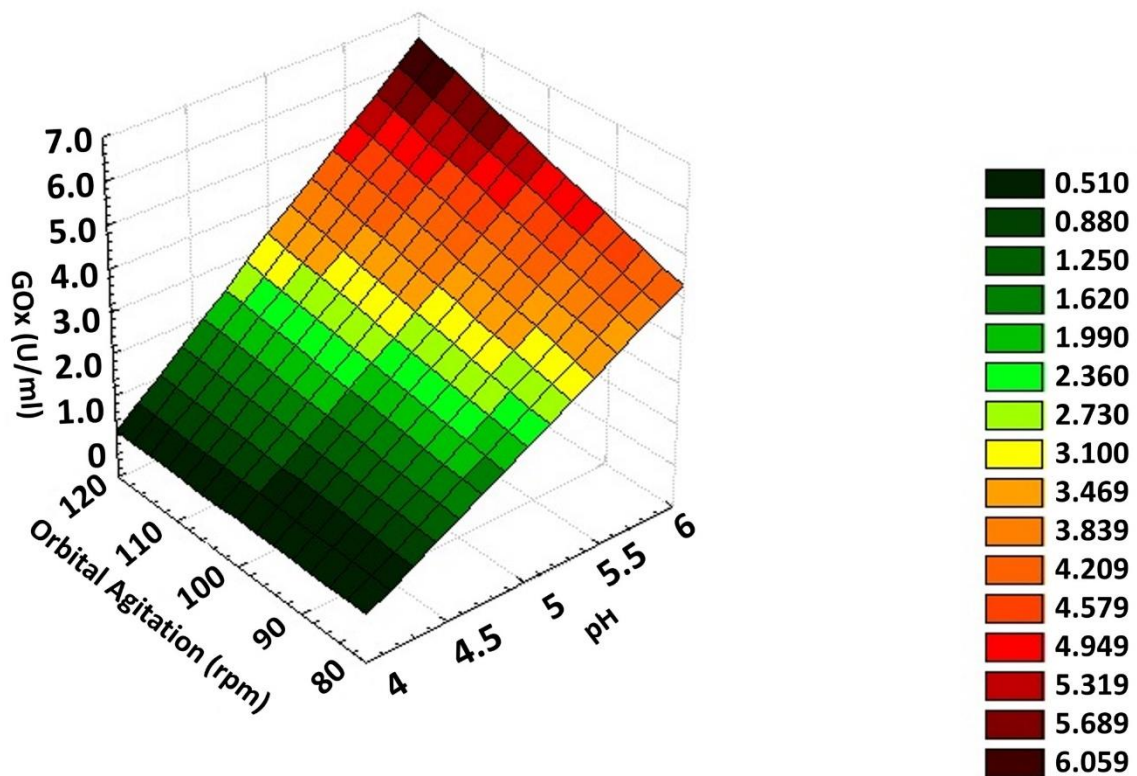


Figura 3. Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^5 para a produção de glicose oxidase de *Aspergillus niger* LMM01 com os fatores glucose, KH_2PO_4 , peptona, pH e agitação orbital. O resultado desta variável de resposta foi a produção de glicose oxidase.

Produção de GOx por *A. niger* LMM01 em um bioprocesso semi-contínuo

Com o objetivo de avaliar a produção de GOx bioprocesso semi-contínuo, GOx-U/mL (P), biomassa-g/L (X) e sólidos solúveis-g/L (S) foram quantificados durante a experiência de 7 dias. Pode-se observar, na figura 4, os resultados obtidos para P (7,74 U/mL), X (9,60 g/L) e S (4,8 g/L).

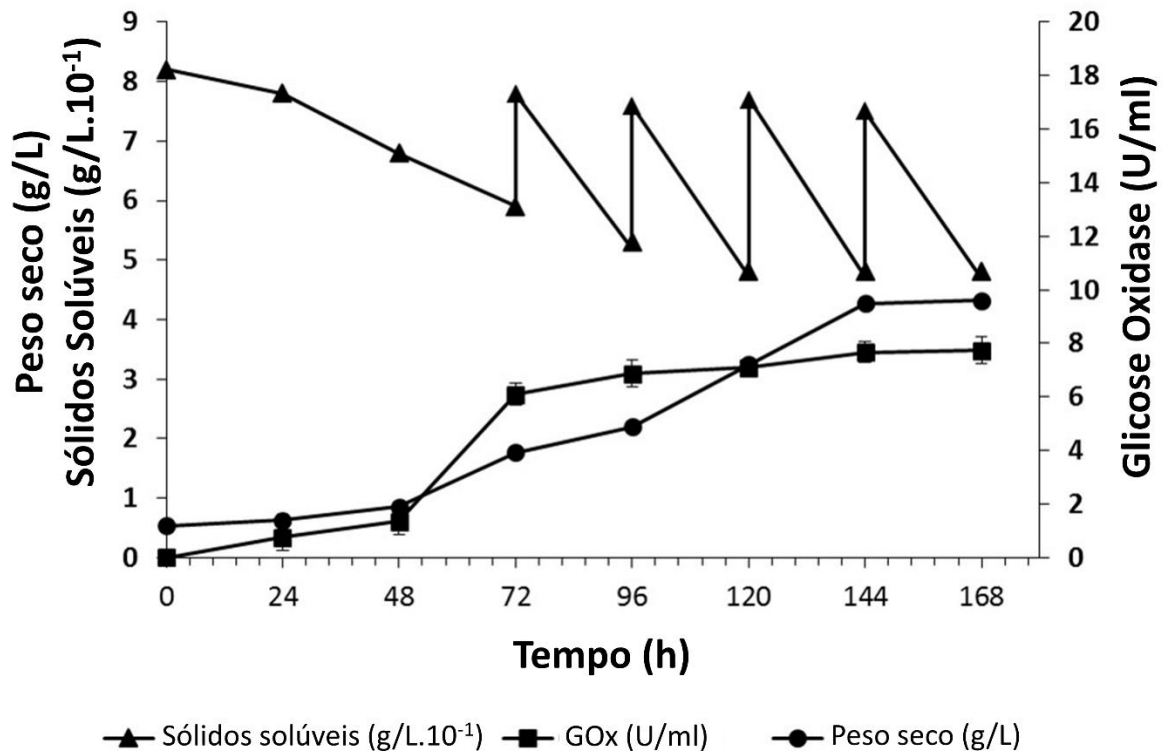


Figura 4. Produção de Glicose Oxidase em processo semi-contínuo utilizando *Aspergillus niger* LMM01.

Discussão

O presente estudo demonstrou o potencial de produção de GOx por isolados fúngicos obtidos de amostras de solo da Região Amazônica. Especificamente, um novo isolado, *A. niger* LMM01, produziu altos níveis de GOx (3,74 U/mL). Além disso, foi demonstrada a produção desta enzima em um processo semi-contínuo com altos níveis enzimáticos usando sacarose (como alternativa à glicose) como substrato. Esses dados demonstram, pela primeira vez, o potencial de linhagens de solo amazônico para produzir esta enzima economicamente importante.

No presente estudo, as linhagens de fungos isoladas de amostras de solo pertenceram principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

Esses fungos foram os mais prevalentes em amostras de solo de estudos anteriores (HAMED, 2013; IQBAL; UTARA, 2016; MIRHENDI et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2013; SONDHIA et al., 2016; ZHANG et al., 2014) e são também predominantes em outros ambientes, como a água (SESSEGOLO et al., 2011), plantas (CORRÊA et al., 2014; PINHEIRO et al., 2013; RUSSELL et al., 2011; ZHOU et al., 2016) organismos marinhos (CICATIELLO et al., 2016; DEBBAB et al., 2012; HAYASHI et al., 2016) e até mesmo no ambiente glacial do Ártico (SONJAK et al., 2006; SONJAK et al., 2007; ZHANG et al., 2016)(Sonjak et al. Al., 2006, Sonjak et al., 2007, Zhang et al., 2016).

Uma fração dos isolados fúngicos (20%) foi capaz de produzir GOx. Esta observação é semelhante aos estudos anteriores de produção de GOx, que também demonstraram o potencial dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (AHMAD, 2014; BHAT et al., 2013; GAO; LI; ZHANG, 2012; KONISHI et al., 2013; SINGH; VERMA, 2013) para produzir GOx. Este estudo é o primeiro a descrever um *screening* de GOx realizada com fungos amazônicos.

No presente trabalho, o estudo cinético demonstrou que a produção de GOx ocorreu na fase de crescimento exponencial e que *A. niger* LMM01 foi o melhor produtor. Outros estudos que investigaram a produção de GOx por *Aspergillus niger* obtiveram resultados semelhantes. Bankar et. al., 2009, obtiveram um rendimento de GOx de 2,0 U/mL, FIEDUREK; GROMADA, 2000, relataram um rendimento de 2,5 U/mL e LU et al., 1996, obtiveram um rendimento de 6,0 U/mL.

A glicose, peptona e KH_2PO_4 foram as melhores fontes para a produção de GOx, utilizando *A. niger* LMM01. MACRIS et. al., 1995, investigaram os efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de GOx por *A. niger* e observaram que a produção significativa desta enzima foi obtida usando glicose, sacarose e melão como substratos. KONA; QURESHI; PAI, 2001 também demonstraram o potencial da

sacarose como fonte alternativa de carbono. Além disso, ROGALSKI *et al.*, 1988, demonstraram a importância da suplementação de peptona para produção elevada de GOx.

No presente trabalho, experimentos multivariados demonstraram que os parâmetros que tiveram maior efeito na produção de GOx foram pH e agitação, como observados em estudos anteriores. A aeração da cultura tem uma relação direta com a produção final de GOx (BANKAR *et al.*, 2009b; KHURSHID *et al.*, 2011; MACRIS, 1995; RÖCKER *et al.*, 2016). LIU *et al.*, 2003, também demonstraram a importância das condições aeróbicas e alta transferência de oxigênio para a produção de GOx.

Este estudo demonstrou a produção de altos níveis de GOx em um processo semi-contínuo durante um ensaio de 7 dias. Nossos resultados demonstram o potencial de *A. niger* LMM01 e as condições atuais de bioprocessamento para uso em uma ampla gama de indústrias, particularmente no ramo alimentício e farmacêutico (BANKAR *et al.*, 2009a; WONG; WONG; CHEN, 2008).

Nos últimos anos, a importância do GOx aumentou. Numerosos estudos (CHOI; HAN; KIM, 2015; RÖCKER *et al.*, 2016; SINGH; VERMA, 2013; TALBERT *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2008) mostraram aumentos nos usos tradicionais desta enzima. Além disso, a GOx foi mais recentemente utilizada em aplicações de biossensores (CHEN *et al.*, 2015; DEVASENATHIPATHY *et al.*, 2015; HWA, 2015; TURKMEN *et al.*, 2014) e outras aplicações nanotecnológicas foram demonstradas (ABER *et al.*, 2016; SAPOUNTZI *et al.*, 2017). Neste contexto, a nova fonte amazônica desta enzima (*A. niger* LMM01) e a produção de GOx em um processo semi-contínuo demonstram a importância do presente trabalho. No futuro, as experiências ampliadas e a utilização de resíduos como substrato devem ser investigadas para tornar a produção de enzimas economicamente mais atrativa e seu uso mais difundido.

Referências

ABER, S. et al. Immobilization of Glucose Oxidase on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and its Application in the Removal of Acid Yellow 12. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 227, n. 3, p. 93, 2016.

AHMAD, I. Propagation of *Aspergillus niger* in Stirred Fermentor for the Production of Glucose Oxidase. n. April, 2014.

AHMED, I. et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 9, n. 2, p. 148–154, 2016.

AMIRI, A. et al. Evaluation of physicochemical properties of gluten modified by Glucose oxidase and Xylanase. *Journal of Cereal Science*, v. 227, n. 3, p. 660–670, 2016.

BANKAR, S. B. et al. Glucose oxidase--an overview. *Biotechnology advances*, v. 27, n. 4, p. 489–501, 2009a.

BANKAR, S. B. et al. Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase. *Food and Bioprocess Technology*, v. 2, n. 4, p. 344–352, 2009b.

BHAT, S. V et al. Isolation and charecterization of Glucose Oxidase (GOD) from *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, v. 2, n. 6, p. 153–161, 2013.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, v. 232, n. 1-2, p. 147–154, 2001.

CELESTINO, J. DOS R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential

for pigment production. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 4, p. 569–575, apr. 2014.

CHEN, H.-C. et al. Direct electron transfer of glucose oxidase and dual hydrogen peroxide and glucose detection based on water-dispersible carbon nanotubes derivative. *Analytica chimica acta*, v. 867, p. 83–91, 31 martx. 2015.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 5 martx. 2015.

CICATIELLO, P. et al. Marine fungi as source of new hydrophobins. *International journal of biological macromolecules*, v. 92, p. 1229–1233, 2016.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 41, n. 10, p. 1467–1478, 13 abz. 2014.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Endophytes and associated marine derived fungiecological and chemical perspectives. *Fungal Diversity*, v. 57, n. 1, p. 45–83, 2012.

DEVASENATHIPATHY, R. et al. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 78, p. 40–45, urr. 2015.

FAPYANE, D.; POULSEN, C. H.; FERAPONTOVA, E. E. Bioelectrocatalytic oxidation of glucose by hexose oxidase directly wired to graphite. *Electrochemistry Communications*, v. 65, p. 1–4, 2016.

FIEDUREK, J.; GROMADA, A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Journal of applied microbiology*, v. 89, n. 1, p. 85–89, 2000.

GAO, Z.; LI, Z.; ZHANG, Y. High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon optimization. p. 507–514, 2012.

GOMES, E. et al. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* a 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* a 13.37. Brazilian Journal of Microbiology, v. 36, p. 75 – 82, 2005.

HAMED, S. A. M. In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. International Biodeterioration and Biodegradation, v. 78, p. 98–102, 2013.

HAQ, I. U. et al. Isolation and Identification of Glucose Oxidase Hyper Producing Strain of *Aspergillus niger*. 2014.

HAYASHI, A. et al. *Aspergillus Sydowii* Marine Fungal Bloom in Australian Coastal Waters, Its Metabolites and Potential Impact on Symbiodinium Dinoflagellates. Marine Drugs, v. 14, n. 3, p. 59, 2016.

HWA, K. Immobilization of Glucose Oxidase on Gold Surface for Applications in Implantable Biosensors. v. 4, n. 4, p. 297–301, 2015.

IQBAL, J.; UTARA, U. Isolation of *Aspergillus niger* Strains from Soil and their Screening and Optimization for Enhanced Citric Acid Production using Cane Molasses as Carbon Source. n. August, 2016.

JO ATILDE O, M. S. L. et al. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. African Journal of Biotechnology, v. 15, n. 24, p. 1217–1223, 2016.

KHAN, I. et al. Molecular cloning and sequence analysis of a PVGOX gene encoding glucose oxidase in *Penicillium viticola* F1 strain and its expression quantitation. Gene,

p. 1–12, 2016.

KHURSHID, S. et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger*. v. 10, n. 9, p. 1674–1678, 2011.

KONA, R. P.; QURESHI, N.; PAI, J. S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource technology*, v. 78, n. 2, p. 123–126, 2001.

KONISHI, T. et al. Safety evaluation of glucose oxidase from *Penicillium chrysogenum*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 66, n. 1, p. 13–23, 2013.

LIU, J.-Z. et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 317–323, 2003.

LU, T. et al. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase. v. 0229, n. 96, p. 339–342, 1996.

MACRIS, H. B. J. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. v. 0229, n. 94, p. 530–534, 1995.

MENDES, M. M. G. DA S. et al. Screening of Amazon fungi for the production of hydrolytic enzymes. *African Journal of Microbiology Research*, v. 9, n. 10, p. 741–748, 2015.

MILLER, G. L. Use of DNS reagent for the measurement of reducing sugar. *Anal. Chem*, v. 31, n. 1, p. 426–428, 1959.

MIRHENDI, H. et al. *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* as the dominant black *Aspergillus*, use of simple PCR-RFLP for preliminary differentiation. *Journal de mycologie médicale*, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2016.

OLIVEIRA, L. G. et al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, v. 95, p. 49–54, 2013.

PINHEIRO, E. A. A. et al. Chemical constituents of *Aspergillus* sp EJC08 isolated as endophyte from *Bauhinia guianensis* and their antimicrobial activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 85, n. 4, p. 1247–1252, 2013.

RÖCKER, J. et al. The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine. *Food Chemistry*, v. 210, p. 660–670, 2016.

ROGALSKI, J. et al. Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n. 8, p. 508–511, 1988.

RUSSELL, J. R. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 17, p. 6076–84, 2011.

SALONY, A. P. et al. The use of Amazon fungus (*Trametes* sp.) in the production of cellulase and xylanase. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 20, p. 843–853, 2016.

SANTOS, Y. V. S. DOS et al. Production of laccase from a white rot fungi isolated from the Amazon forest for oxidation of Remazol Brilliant Blue-R. v. 10, n. 4, p. 132–136, 2015.

SAPOUNTZI, E. et al. Gold nanoparticles assembly on electrospun poly(vinyl alcohol)/poly(ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 238, p. 392–401, 2017.

SESSEGOLO, T. et al. Microbiota fúngica em amostras de água potável e esgoto doméstico Fungal microbiota in drinking water and domestic sewage. *Semina: Ciências agrárias*, v. 32, n. 1, p. 301–306, 2011.

SINGH, J.; VERMA, N. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: Production, characterization and immobilization for glucose oxidation. v. 4, n. 3, p. 250–257, 2013.

SONDHIA, S. et al. Biodegradation of the herbicide penoxsulam (triazolopyrimidine sulphonamide) by fungal strains of *Aspergillus* in soil. *Applied Soil Ecology*, v. 105, p. 196–206, 2016.

SONJAK, S. et al. *Penicillium svalbardense*, a new species from Arctic glacial ice. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 92, n. 1, p. 43–51, 2007.

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium mycobiota* in Arctic subglacial ice. *Microbial Ecology*, v. 52, n. 2, p. 207–216, 2006.

TALBERT, J. N. et al. Modification of glucose oxidase for the development of biocatalytic solvent inks. *Enzyme and microbial technology*, v. 55, p. 21–25, 2014.

TURKMEN, E. et al. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode. *Electrochimica Acta*, v. 123, p. 93–102, 2014.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, p. 315–322, 1990.

WONG, C. M.; WONG, K. H.; CHEN, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence,

function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 78, n. 6, p. 927–938, 2008.

ZHANG, H. et al. Freshwater ascomycetes: *Lophiostoma vaginatispora* comb. nov. (Dothideomycetes, Pleosporales, Lophiostomaceae) based on morphological and molecular data. *Phytotaxa*, v. 176, n. 1, p. 184–191, 2014.

ZHANG, T. et al. Diversity and Distribution of Aquatic Fungal Communities in the Ny-Ålesund Region, Svalbard (High Arctic). *Microbial Ecology*, v. 71, n. 3, p. 543–554, 2016.

ZHOU, M. et al. Antiviral and Cytotoxic Isocoumarin Derivatives from an Endophytic Fungus *Aspergillus oryzae*. *Planta Med*, p. 414–417, 2016.

6. CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA GLICOSE OXIDASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* LMM01

Resumo

Recentemente foi encontrado um novo fungo potencial produtor de GOx na Amazônica. No entanto, ainda sabe-se pouco sobre esta enzima. O presente trabalho teve por finalidade estudar as características desta GOx. A produção da enzima foi realizada utilizando o fungo amazônico *Aspergillus niger* LMM01. A purificação da enzima GOx foi realizada por precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia iônica. Posteriormente, foi realizada a caracterização da enzima purificada. A precipitação com sulfato de amônio demonstrou melhor resultado com 80% de saturação. A purificação em cromatografia de afinidade resultou em uma atividade específica de 13,79 U/mg de proteína, com um rendimento de 8,75 % e onde a técnica apresentou-se ser 9,38 vezes melhor para a purificação desta enzima. A enzima purificada possuiu massa molar de 140 KDa, pH ótimo de 6,0 e temperatura ótima de 40° C. A atividade residual não foi afetada durante 18 h a 25° C, enquanto que mostrou uma meia vida de 50 minutos a 37° C e em 50° C e 60° C foi de 64,1 % e 50,8 %. A GOx foi estável em pH 5 – 7, a 25° C, por 18 horas. A sequência de inibição foi da seguinte ordem: acetato de cobre > sulfato de prata > cloreto de mercúrio > acetato de chumbo > sulfato de ferro, na mesma concentração inicial. Neste contexto, o conhecimento das características de uma nova Glicose Oxidase descrita demonstra a importância do presente trabalho.

Palavras-chave: Amazônia, fungos, caracterização, glicose oxidase

Introdução

Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4) é uma enzima que oxida a glicose para ácido glucônico e está presente em todos os organismos aeróbios. É uma enzima de grande interesse e importância para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e em pesquisas científicas. É obtida, essencialmente, como um produto da produção de gluconato [1,2]. Recentemente foi isolado, da Floresta Amazônica, um novo produtor desta enzima [3], no entanto, não se conhece as características bioquímicas da enzima produzida.

A enzima GOx tem sido utilizada na indústria, em soluções, juntamente com Catalase e Peroxidase. A enzima GOx na sua forma mais pura é um pó amarelo pálido. As amostras de enzimas secas são estáveis a 0° C por até 2 anos. As soluções aquosas são estáveis durante uma semana a 5° C e o pH de ação catalítica é entre 5 e 6, sendo que, esta enzima possui maior aplicação na indústria de alimentos (25° C) e na indústria farmacêutica (37° C) [2,4].

Recentemente, foi encontrada uma nova linhagem com potencial produção de GOx na Amazônia [3]. Mesmo com a anterior produção de GOx a partir de *A. niger* LMM01, ainda pouco se sabe sobre esta enzima, de origem amazônica. Estudos são necessários a fim de compreender as características químicas e moleculares desta enzima. A abordagem, neste trabalho, direciona ao entendimento da funcionalidade desta enzima para a padronização em processos bioquímicos e de produção.

O presente trabalho teve por finalidade avaliar as características químicas e moleculares da enzima Glicose Oxidase, produzida por *Aspergillus niger* LMM01. Os objetivos do estudo foram: A) Purificação da GOx produzida por *Aspergillus niger* LMM01; B) Determinar a temperatura e pH ótimo de ação catalítica; C) Determinar a

estabilidade térmica da GOx; D) Determinar a estabilidade da GOx em relação ao pH; e; F) Estudar o efeito de íons na atividade desta Glicose Oxidase.

Material e métodos

Microrganismo

O fungo *Aspergillus niger* LMM01 pertence a Coleção microbiológica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e foi isolado do solo da Floresta Amazônica, especificamente na Reserva Adolpho Ducke, localizada na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil, na estação chuvosa do ano de 2013. O microrganismo, previamente armazenado em meio Ágar Sabouraud com óleo vegetal, foi reativado em meio Ágar Batata Dextrose (BDA), para a realização dos experimentos a seguir.

Produção da enzima

O bioprocesso para a produção da enzima e posterior purificação foi realizado em erlenmeyers (2 L) contendo 0,5 L de meio de cultivo (KH_2PO_4 5 g/L, CaCl_2 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/L, peptona 5 g/L e glicose 80 g/L, pH 6,0). Após esterelização, o meio foi inoculado (1×10^5 esporos/mL), incubado a temperatura ambiente e agitação orbital de 120 rpm por 72 h. O pH da cultura foi controlado em 6,0. As culturas foram crescidas sob luz ambiente. Para a obtenção do extrato bruto a cultura foi centrifugada 4.000 rpm por 5 min.

Purificação da enzima

O extrato bruto (1 L) foi filtrado em um filtro com tamanho de poro de 0,45 mm. A purificação da enzima GOx foi realizada por precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia iônica.

Salting out e diálise

O filtrado foi submetido à precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, empregando quatro concentrações de saturação: 60, 70, 80 e 90%. A solução de saturação com sulfato de amônio foi deixada em descanso por uma noite (overnight), centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos, coletado o precipitado e submetidos aos testes analíticos. Os precipitados foram dialisados em membrana de celulose contra água destilada a 4° C (overnight) e submetidos aos testes analíticos.

Coluna de purificação

A amostra dialisada, obtida após a adição do sulfato de amônio, foi submetida a cromatografia em coluna de troca aniônica. A coluna cromatográfica HiTrapQFF (1 ml) (Akta Prime plusGE, Suécia) foi utilizada para a análise de purificação. Todos os tampões e amostras foram previamente filtrados em membrana de ultra filtração de 0,45 μm . A coluna foi pré equilibrada com tampão Fosfato 10 mM, pH 5,6 para cerca de 6 volumes de coluna (CV), afim de atingir linhas de base zero no cromatograma. 10 ml do concentrado enzimático obtido pela diálise foram aplicadas no equipamento. A proteína ligada foi eluída usando um gradiente (20 – 100%) de tampão NaCl 1,0 M, pH 5,6, que foi seguido pela coleta das frações. A pureza da enzima foi verificada por SDS-PAGE.

Gel de eletroforese

A pureza e a massa molar da GOx foram avaliadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida), sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito por LAEMMLI, 1970. Utilizando-se gel gradiente, com concentração de 10%, as amostras (10 μ L) foram preparadas na proporção de 1:1 (v/v) em tampão de amostra (glicerol 27 %, v/v; SDS 6 %, m/v; azul de bromo fenol 0,01 %, m/v; em TrisHCl 0.12 M, pH 6,8), na presença de 10% (v/v) de β -mercaptoetanol e aquecidas durante 5 min em água fervente. A eletroforese foi realizada sob corrente de 200 V em tampão tris/glicina/SDS pH 8,3. Após a corrida, o gel foi fixado e corado com coomassie brilliant blue R-250 0,1 % (m/v), em metanol: ácido acético: água (5: 2: 5, v/v/v), e descorado com a mesma solução, sem corante.

Métodos analíticos

Dosagem da enzima

Para a determinação de GOx foi utilizado o método proposto por HAQ et al., 2014b, modificado. Para a determinação de GOx utilizou-se uma mistura reacional consistindo em 0,1 mL de D-glicose 0,01M, 0,75 mL de o-dianisidina a 0,02% em tampão fosfato pH 6.0, 25 μ g de peroxidase (EC 1.11.1.7) e 0,1 ml de solução enzimática (GOx). A mistura foi incubada durante 10 min a 35° C. A reação foi parada por adição de 0,5 mL de HCl 4N e quantificada a 500 nm. Uma unidade (U) da atividade de GOx foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 mmol de glicose por minuto nas condições de ensaio. Através da equação 1 pode-se calcular a produtividade enzimática.

$$\text{GOx U/mL} = \frac{[(\text{ABS}/\text{teste} - \text{ABS}/\text{controle neg.}) \cdot (\text{V1}) \cdot (\text{Df})] \cdot \text{T}^{-1}}{(7,5) \cdot (\text{V2})} \quad (\text{equação 1})$$

Onde: V1 = volume (em mL) de ensaio; (Df) = fator de diluição do caldo; 7,5 = coeficiente de extinção milimolar para o-dianisidina oxidada a 500 nm; V2 = volume (em ml) de caldo contendo enzima e T = tempo de duração da reação. Uma unidade irá oxidar 1,0 umol de β -D-glicose a gluconolactona e δ -H₂O₂ por minuto a pH 7,0 a 35° C.

Dosagem das proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry. Preparou-se o reagente A, que consistiu na adição de 20 g de bicarbonato de sódio em um litro de hidróxido de sódio 0,1 N. O reagente B consistiu em adicionar 1 g de tartarato de sódio em 100 ml de água e acrescentou-se 0,5 g de sulfato de cobre penta-hidratado. O reagente C foi preparado somente na hora do uso e constituiu em misturar 50 partes do reagente A com 1 parte do reagente B. O reagente D, também preparado na hora do uso constituiu em Reagente Folin-fenol Ciocalteu diluído em proporção de 1:1 em água. Em um tubo de ensaio colocou-se 0,5 ml de amostra, adicionou-se 2,5 ml de reagente C. Os tubos foram agitados em descanso por 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 0.25 ml de reagente D e misturou-se. As amostras foram lidas a 750 nm após 30 minutos ou mais, à temperatura ambiente.

Avaliação das características da enzima purificada

Foram realizadas análises as quais verificaram: melhor temperatura para a ação catalítica, melhor pH para a ação catalítica, estabilidade da enzima e os efeitos de íons na atividade enzimática.

Determinação da melhor temperatura e do melhor pH de ação catalítica

O efeito da temperatura e do pH na atividade de GOx foi determinado segundo Simpson et al. (2006). Os reagentes do ensaio da GOx foram incubados, durante a reação, a temperaturas variando de 20 a 80° C. A determinação do pH ótimo foi realizada utilizando-se tampões acetato 0,1 mol/L (pH 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0) e em tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 6,0 e 7,0). O tampão de ensaio foi substituído pelo tampão testado. A atividade de GOx foi expressa como atividade relativa e foi calculado pela equação 4.

$$\% \text{ de Atividade relativa} = \frac{\text{Atividade enzimática na amostra tratada}}{\text{Atividade enzimática na amostra padrão}} \times 100$$

(equação 4)

Determinação da estabilidade térmica da GOx

A estabilidade térmica da GOx purificada foi determinada com base no método descrito por Simpson et al. (2007). A temperatura foi analisada em 20, 37, 60 e 70° C. Para cada experimento, 0,1 ml da enzima purificada foi previamente diluída em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,0 na proporção de 1:10, de modo a garantir que não ocorra variação no valor de pH. O experimento foi conduzido por 0, 2, 4, 19 e 26 horas. Após cada tempo, amostra foi resfriada em banho de gelo e em seguida foi feita a medida da atividade residual (equação 5) da GOx a 40° C em pH 6,0 por meio de ensaio enzimático como descrito anteriormente.

$$\% \text{ de Atividade residual} = \frac{\text{Atividade enzimática após a incubação}}{\text{Atividade enzimática depois da incubação}} \times 100$$

(equação 5)

Determinação da estabilidade da GOx em relação ao pH.

A estabilidade ao pH da GOx purificada foi determinada com base no método descrito por SIMPSON et al., 2007. A estabilidade da GOx foi analisada em pH 3,0; 4,0; e 5,0 (tampão acetato 0,1 mol/L) e pH 6,0; 7,0 e 8,0 (tampão fosfato 0,1 mol/L). Em cada experimento, 0,1 ml da enzima foi diluída nos tampões acima na proporção de 1:10 e incubados a 30° C. O experimento foi conduzido por 0, 2, 18, 24, 48 horas. Após cada tempo, uma alíquota de 0,5 ml de cada uma das amostras foi separada e diluída em 2 ml de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,0 de modo que o sistema retornasse ao pH ótimo e em seguida foi feita a medida da atividade residual (equação 5) da GOx a 40° C em pH 6,0 por meio de ensaio enzimático como descrito anteriormente.

Efeito de íons na atividade de Glicose Oxidase

Os efeitos dos íons na atividade enzimática foram estudados a uma concentração de 1 mM de diferentes íons, tais como $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, Ag_2SO_4 , Hg_2Cl_2 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Um volume de 100 μL de enzima com atividade enzimática de 1 U/mL foi incubado juntamente com 0,9 mL de íon 1 mM durante 20 minutos [8]. Após o período de incubação foi analisada a atividade enzimática com descrito anteriormente.

Resultados

Produção da enzima Glicose oxidase

Após a incubação, foi realizada a determinação enzimática, onde foi aferido 5,99 U/mL de Glicose oxidase. Este extrato bruto foi submetido a processos de purificação, como demonstrado a seguir.

Purificação da GOx produzida por *Aspergillus niger* LMM01

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram que a atividade específica, a recuperação e a *Fold* de purificação, atingiram os seus valores máximos a uma concentração de sulfato de amônio a 80 %, correspondendo a 14,36 U/mg de proteína com recuperação de enzima de 47,86 % e indicaram 1,02 vezes que a saturação 80% de sulfato de amônio foi ótima para a precipitação da glicose oxidase.

Tabela 1. Padrão de precipitação da Glicose Oxidase de *A. niger* LMM01 por sulfato de amônio.

Concentração de Sulfato de amônio (%)	Volume final (mL)	Atividade de GOx (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento enzimático** (%)	Purificação <i>Fold</i>
Controle*	900	5,99	4,07	1,47	100	1
60	89	17,20	12,02	1,43	28,40	0,97
70	102	19,96	13,42	1,49	37,78	1,01
80	120	21,50	14,36	1,50	47,86	1,02
90	132	18,92	14,55	1,30	46,32	0,88

*Determinação realizada sem precipitação sulfato de amônio (extrato bruto).

Após a precipitação com sulfato de amônio, o precipitado com maior rendimento (80%), foi submetido a diálise contra água destilada, onde ao final do processo, obteve-se 23,5 U/mL de enzima.

As amostras concentradas por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dialisadas foram suspendidas em 100 mL de tampão de citrato 0,1 M (pH 5,0). Esta preparação enzimática foi filtrada em coluna HiTrap QFF em troca iônica, onde o resultado

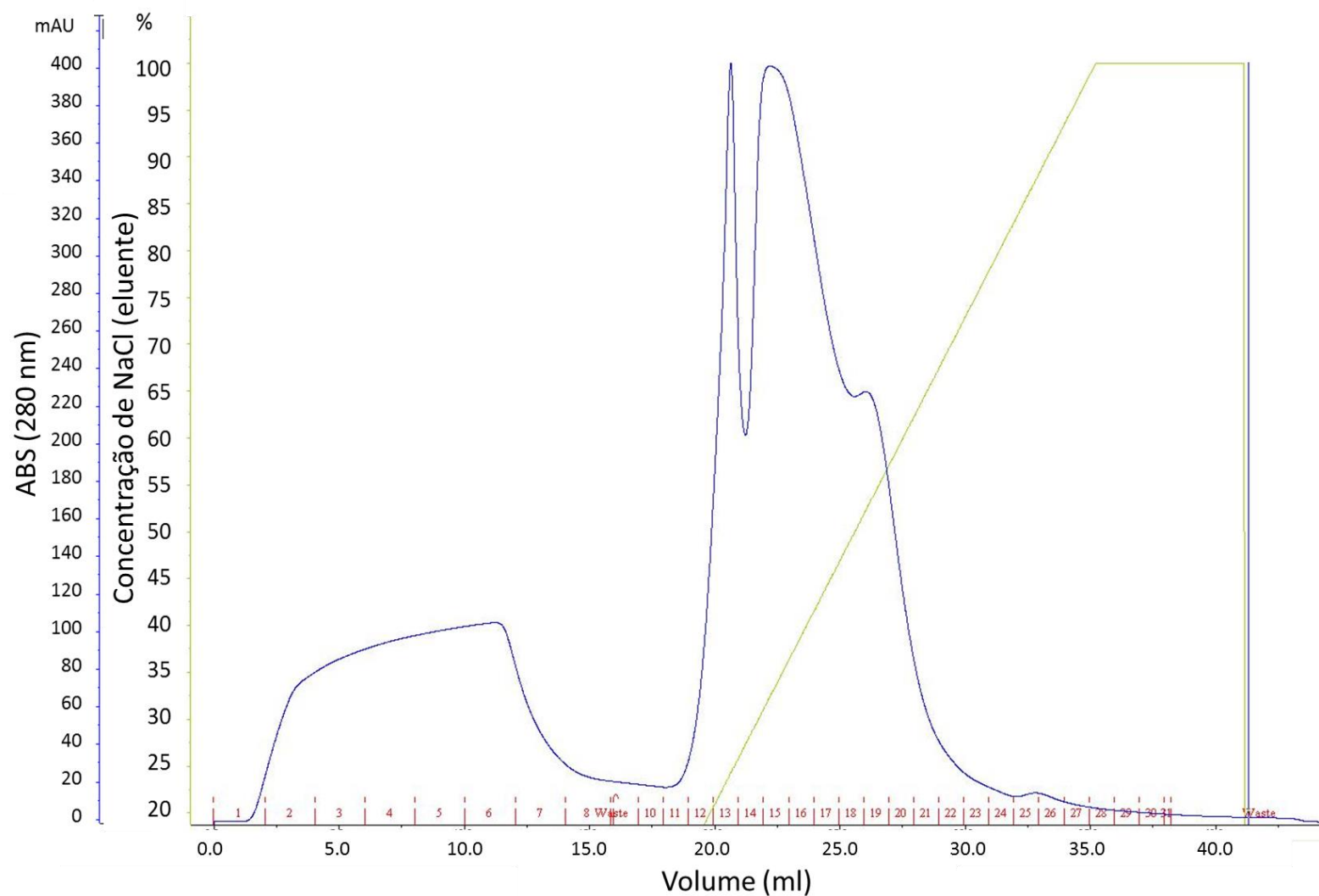


Figura 1. Perfil cromatográfico da enzima Glicose Oxidase, produzida por *Aspergillus niger* LMM01, submetida a cromatografia de troca iônica utilizando coluna HiTrap QFF. Cromatograma emitido pelo aparelho Akta Prime plusGE, Suécia.

cromatográfico é apresentado na figura 1. Foram recolhidas um total de 31 frações de aproximadamente 1,5 mL cada que foram sujeitas a ensaio enzimático e estimativa de proteína, como demonstrado na figura 2. Dois picos cromatográficos da proteína foram observados a 280 nm.

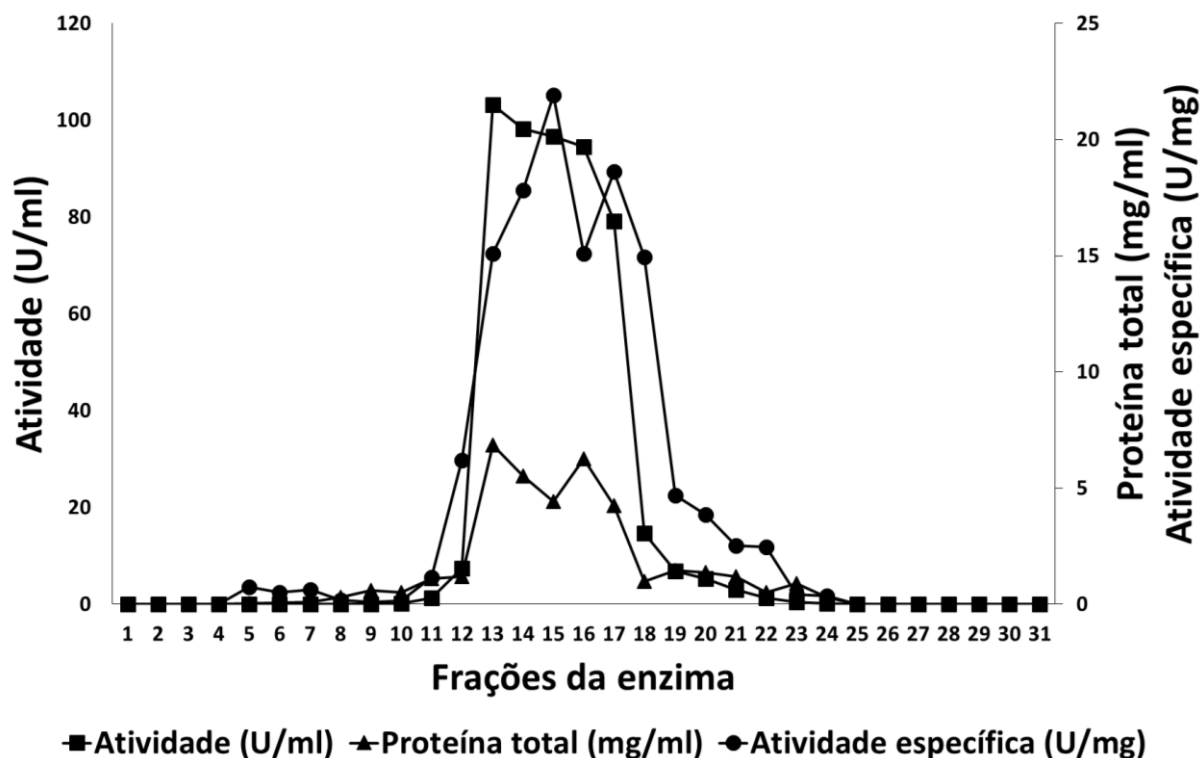


Figura 2. Resultados analíticos da enzima Glicose Oxidase, produzida por *Aspergillus niger* LMM01, submetida a cromatografia de troca iônica utilizando coluna HiTrap QFF.

Após os processos de purificação, obteve-se a tabela 2, onde os resultados mostraram que após o processo de troca iônica, utilizando a coluna HiTrap QFF, a atividade específica atingiu o seu valor máximo, correspondendo a 13,79 U/mg de proteína, com um rendimento de 8.75% e onde a técnica apresentou-se ser 9,38 vezes melhor para a purificação desta enzima.

Tabela 2. Resumo da purificação e recuperação global da glucose oxidase produzida por *A. niger* LMM01.

Amostra	Volume final (ml)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento enzimático (%)	Purificação <i>Fold</i>
Controle*	900	5 391,00	3 665,00	1,47	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (80%)	120	2 580,00	1 684,32	1,53	47,86	1,04
Diálise	42	989,28	520,83	1,90	18,35	1,29
HiTrap QFF	6	471,65	34,19	13,79	8,75	9,38

*Determinação realizada com o extrato bruto.

As frações que demonstraram atividade enzimática significativa (12 a 23), segundo a tabela 2, foram avaliadas em gel de policrilamida 10% (SDS-PAGE). Os produtos de purificação demonstraram um tamanho de aproximadamente 140 KDa, variando a sua intensidade de maneira proporcional à atividade enzimática, como demonstrado na figura 3. Após o procedimento em gel, onde avaliou-se a pureza da enzima, as frações que obtiveram maior concentração enzimática (13 a 18) foram reunidas em uma única solução para a avaliação das características da enzima purificada.

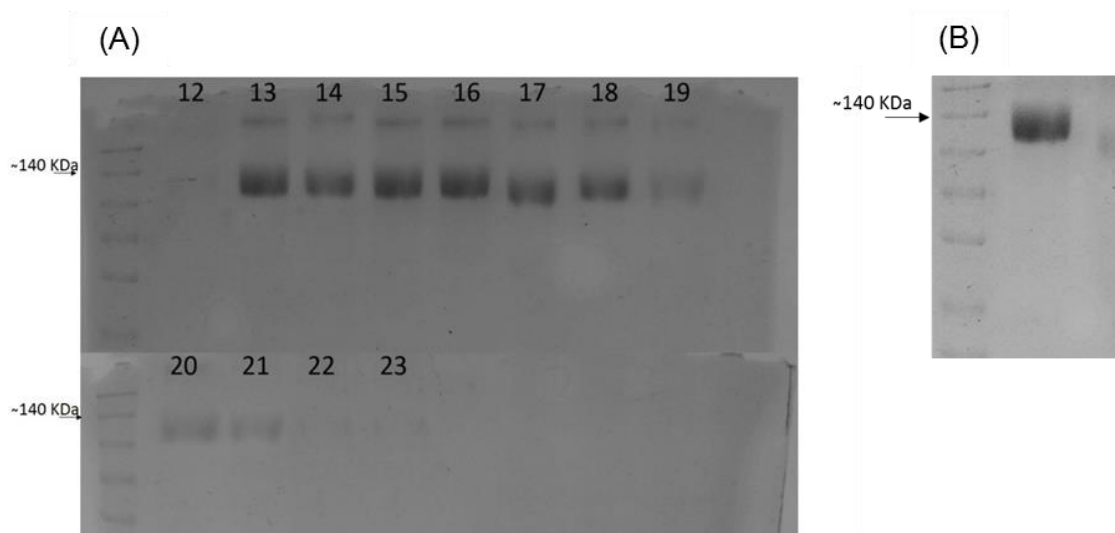


Figura 3. Produto de cromatografia (HiTrapQFF), em Gel (SDS-PAGE). (A) Frações de 12 a 23 da enzima Glicose Oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01. (B) Produto da união das frações de 13 a 18.

Avaliação das características da enzima purificada

Determinação da melhor temperatura e do melhor pH de ação catalítica

A temperatura ótima de ação catalítica da GOx foi 40° C, sendo que a partir de 50° C a enzima demonstrou perder a metade de sua atividade. Em temperaturas acima de 50° C a atividade de GOx diminuiu rapidamente. O pH 6,0 foi observado como o ótimo para a ação catalítica (Figura 4).

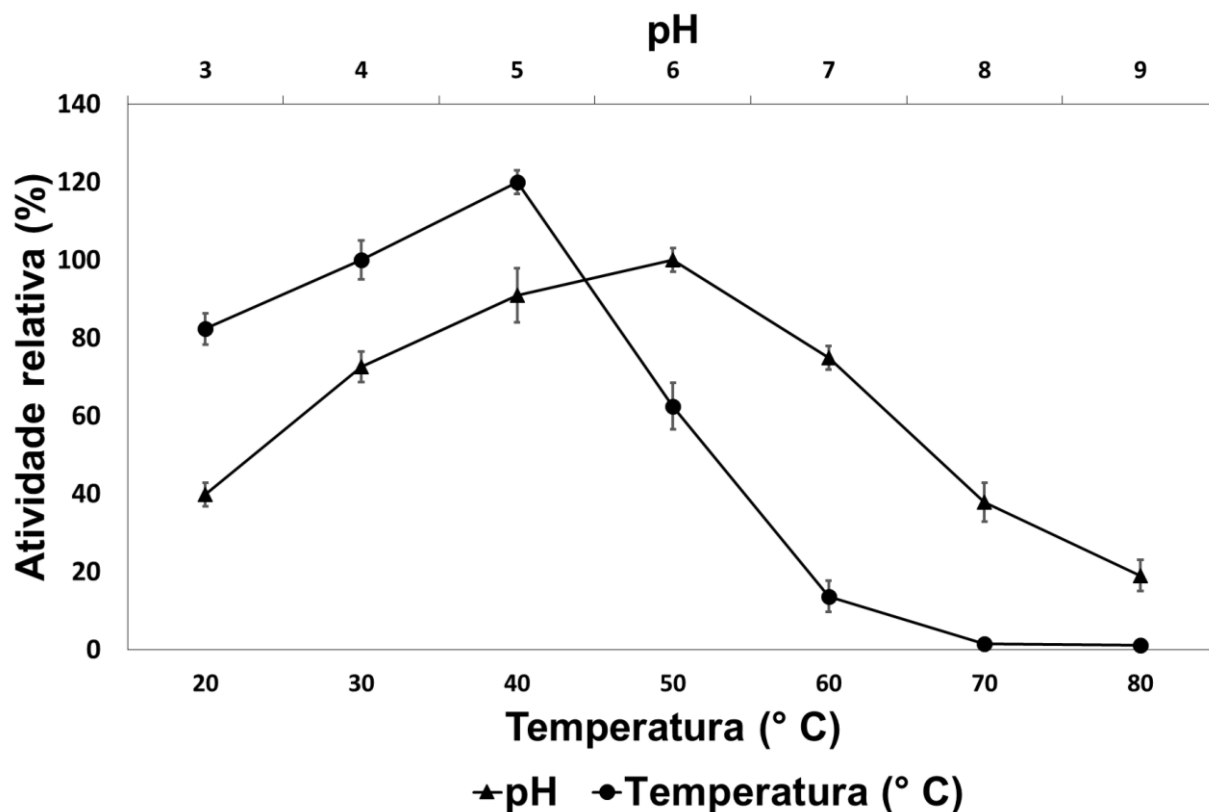


Figura 4. Avaliação da temperatura e pH ótimo de ação catalítica da enzima Glucose Oxidase, produzida por *Aspergillus niger* LMM01.

Determinação da estabilidade térmica da GOx

A estabilidade da enzima foi avaliada frente a diferentes temperaturas (Figura 5), onde os resultados demonstraram que a atividade residual não demonstrou mudança durante 18 h a 25° C, em 70 minutos a atividade residual em 50° C e 60° C foi de 64,1% e 50,8%, respectivamente. Em temperaturas de 70° C e 80° C, a enzima apresentou meia vida em aproximadamente 20 e 30 minutos, respectivamente. A enzima foi totalmente inativa em 80° C por 70 minutos.

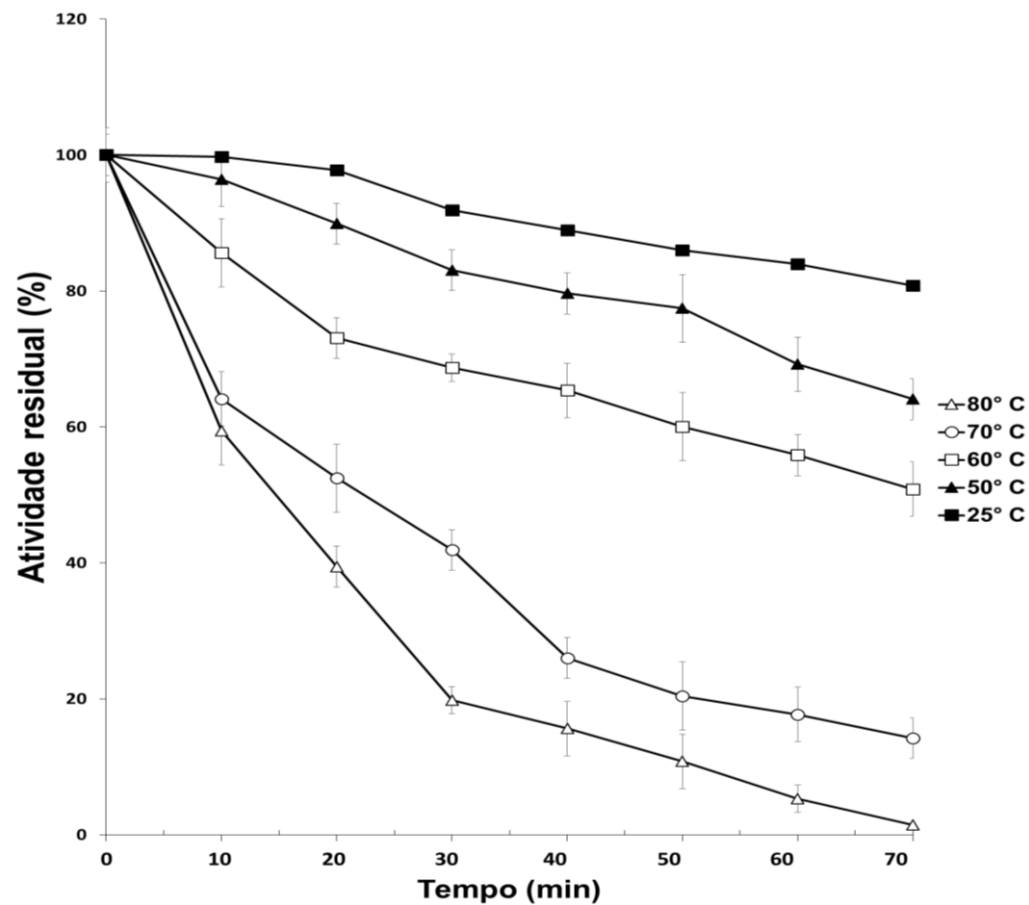


Figura 5. Avaliação da estabilidade térmica da enzima Glucose Oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01.

Determinação da estabilidade da GOx em relação ao pH.

A estabilidade da GOx purificada em relação ao pH foi testada em pH 3, 4, 5, 6, 7, 8. A GOx foi mais estável nos pH entre 5 e 7 (Figura 6).

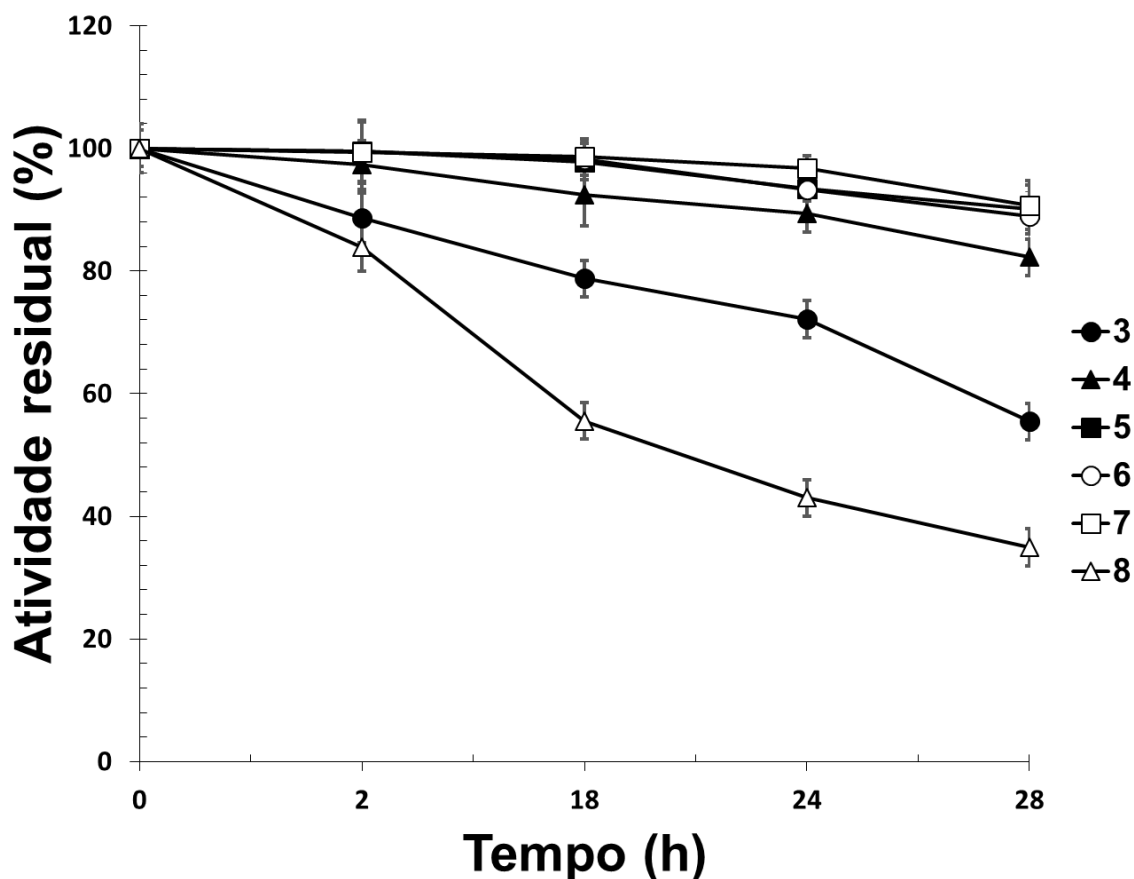


Figura 6. Estabilidade ao pH da Glicose oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01.

Efeito de íons na atividade de Glicose Oxidase

Com base nos resultados obtidos, o sulfato de cobre, o sulfato de prata e o cloreto mercúrio inibiram notavelmente a atividade de GOx mesmo a uma concentração de 1 mM. O sulfato de ferro e o acetato de chumbo inibiram 5,5% e 11%, respectivamente, a atividade da enzima, conforme os resultados apresentados na tabela 3. A sequência de inibição foi da seguinte ordem: acetato de cobre > sulfato de prata > cloreto de mercúrio > acetato de chumbo > sulfato de ferro, na mesma concentração inicial.

Tabela 3. Efeito de íons na atividade de Glicose Oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01.

Íons	Concentração [M]	Atividade Residual (%)	Classificação
Mg ⁺⁺	10 ⁻³	103	Ativador
Ca ⁺⁺	10 ⁻³	104	Ativador
Zn ⁺⁺	10 ⁻³	110	Ativador
Mn ⁺⁺	10 ⁻³	112	Ativador
Fe ⁺⁺⁺	10 ⁻³	94,5	Inibidor
Pb ⁺⁺	10 ⁻³	89	Inibidor
Ag ⁺	10 ⁻³	0	Inibidor
	10 ⁻⁴	0	
	10 ⁻⁵	22	
Cu ⁺⁺	10 ⁻³	0	Inibidor
	10 ⁻⁴	3	
	10 ⁻⁵	6	
Hg ⁺⁺	10 ⁻³	40,5	Inibidor
	10 ⁻⁴	82,1	

Discussão

No presente trabalho foi realizada a caracterização da enzima GOx produzida por *Aspergillus niger* LMM01. Os achados foram peso molecular, pH ótimo e temperatura ótima de 140 KDa, 6,0 e 40° C, respectivamente. Em adição, observou-se que a enzima possui meia vida maior que 18 h em temperatura de 40° C (pH entre 3-8). O presente trabalho é o primeiro a realizar a caracterização bioquímica e molecular da enzima GOx produzida por um fungo isolado da amazônia Brasileira. O mundo passa por uma mudança no cenário industrial onde a bio economia e bio indústria apresentam-se como parte fundamental da economia das nações desenvolvidas. O modelo de bioeconomia também deve ser observado como estratégia alternativa para o desenvolvimento do Brasil.

No presente estudo, a temperatura ótima de ação catalítica da GOx analisada foi temperatura e pH 40° C e o pH 6,0, respectivamente. Uma

observação semelhante foi relatada por OZYILMAZ; TUKEL; ALPTEKIN, 2005 onde observaram o pH 5,5 como ótimo, no entanto, a GOx é descrita na literatura como enzima com características variáveis [1]. GOUDA et al., 2003 relataram que a dissociação da molécula FAD da enzima em meio aquoso ocorreu a 59° C e concluiu que essa dissociação é responsável pela inativação térmica da GOx. Gulozyilmaz et. al., 2005 também observaram que, a temperatura de 60° C afetou significativamente a atividade da GOx em 33% e que a atividade máxima foi atingida em 35° C.

Nas condições experimentais a massa molecular da GOx de *Aspergillus niger* LMM01 correspondeu a aproximadamente 140 KDa. Esse resultado está de acordo com trabalhos anteriores onde foi relatada uma variação de 130 kDa a 175 kDa na massa de GOx. A semelhança dos dados pode ser atribuída a frequente utilização do gênero *Aspergillus* na produção desta enzima [2]

A GOx foi mais estável nos pH entre 5 e 7 e em 25° C. A estabilidade desta enzima é adequada para as atividades da GOx na indústria. Os trabalhos realizados demonstraram que a GOx é mais estável em faixas de pH 4- 6 e temperatura 20 – 40° C, abaixo do pH 2, acima de pH 8 e em temperaturas acima de 40° C a enzima é rapidamente perdida [4,11].

Os íons Fe⁺⁺⁺, Pb⁺⁺, Ag⁺, Hg⁺⁺ e Cu⁺⁺ exibiram uma inibição na atividade de GOx. Estes resultados estão em concordância com os obtidos. Nakamura e Ogura, 1986 relataram que a reação catalisada pela GOx de *A niger* foi inibida por Ag⁺, Hg⁺⁺ e Cu⁺⁺, demonstrando que a enzima estudada neste trabalho possui características inibitórias semelhantes às descritas na literatura. Estes mesmos autores descrevem que Ag⁺ e Hg⁺⁺ inibem a oxidação da molécula de FAD reduzida, competindo com o oxigênio molecular utilizado como aceitador de

hidrogênio e concluíram que os locais de ligação para estes dois íons metálicos são diferentes.

Nos últimos anos, a importância da GOx aumentou. Numerosos estudos [12–15] mostraram aumentos nos usos tradicionais desta enzima. Além disso, a GOx foi mais recentemente utilizada em aplicações de biossensores [16–18] e outras aplicações nanotecnológicas foram demonstradas [19,20]. Neste contexto, o conhecimento das características de uma nova Glicose Oxidase descrita demonstra a importância do presente trabalho. No futuro, a otimização da purificação e a expressão heteróloga desta enzima devem ser investigadas para tornar a sua utilização mais atraente economicamente e seu uso mais difundido.

Referências

- [1] Bankar SB, Bule M V, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase--an overview. *Biotechnology advances* 2009;27:489–501.
doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- [2] Ferri S, Kojima K, Sode K. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases : 2011;5:1068–76.
- [3] Sousa DRT, Santos ES, Cortez ACA, Souza VB. *Aspergillus niger* LMM01 : A new source of glucose oxidase in Amazon 2017;11:955–64.
doi:10.5897/AJMR2017.8566.
- [4] Singh J, Verma N. Glucose oxidase from *Aspergillus niger* : Production , characterization and immobilization for glucose oxidation 2013;4:250–7.
- [5] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the

- head of bacteriophage T4. *nature* 1970;227:680–5.
- [6] Haq IU, Nawaz A, Mukhtar H, Ahmed W. Isolation and Identification of Glucose Oxidase Hyper Producing Strain of *Aspergillus niger*. 2014.
- [7] Simpson C, Jordaan J, Gardiner NS, Whiteley C. Isolation , puri W cation and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp . CBS 120262 optimally active at neutral pH 2007;51:260–6.
doi:10.1016/j.pep.2006.09.013.
- [8] Lu T, Peng X, Yang H, Ji L. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase 1996;0229:339–42.
- [9] Ozyilmaz G, Tukul SS, Alptekin O. Activity and storage stability of immobilized glucose oxidase onto magnesium silicate. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 2005;35:154–60.
- [10] Gouda MD, Singh SA, Rao AGA, Thakur MS, Karanth NG. Thermal inactivation of glucose oxidase mechanism and stabilization using additives. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:24324–33.
- [11] Flores RVG, Elda PSC, Rosalba de LG, Cecilia BG, Jos LMH, Gerardo GL, et al. Production and partial characterization of glucose oxidase and catalase from xerophytic strain of *Aspergillus niger*. *African Journal of Microbiology Research* 2014;8:2788–800. doi:10.5897/AJMR2014.6850.
- [12] Talbert JN, He F, Seto K, Nugen SR, Goddard JM. Modification of glucose oxidase for the development of biocatalytic solvent inks. *Enzyme and microbial technology* 2014;55:21–5.

- [13] Wong CM, Wong KH, Chen XD. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology* 2008;78:927–38.
- [14] Choi J-M, Han S-S, Kim H-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances* 2015. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.
- [15] Singh H, Reddy MS. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology* 2011;47:30–4.
- [16] Devasenathipathy R, Mani V, Chen S-M, Huang S-T, Huang T-T, Lin C-M, et al. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes. *Enzyme and Microbial Technology* 2015;78:40–5.
doi:10.1016/j.enzmictec.2015.06.006.
- [17] Turkmen E, Bas SZ, Gulce H, Yildiz S. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode. *Electrochimica Acta* 2014;123:93–102.
doi:10.1016/j.electacta.2013.12.189.
- [18] Hwa K. Immobilization of Glucose Oxidase on Gold Surface for Applications in Implantable Biosensors 2015;4:297–301.
doi:10.12720/jomb.4.4.297-301.
- [19] Aber S, Mahmoudikia E, Karimi A, Mahdizadeh F. Immobilization of

Glucose Oxidase on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and its Application in the Removal of Acid Yellow 12. *Water, Air, & Soil Pollution* 2016;227:93. doi:10.1007/s11270-016-2754-x.

- [20] Sapountzi E, Braiek M, Vocanson F, Chateaux J-F, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F. Gold nanoparticles assembly on electrospun poly(vinyl alcohol)/poly(ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2017;238:392–401. doi:10.1016/j.snb.2016.07.062.

7. CAPÍTULO 3

ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE GLICOSE, UTILIZANDO A GLICOSE OXIDASE, PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* LMM01

Resumo

Recentemente foi isolado da Floresta Amazônica um fungo produtor da enzima GOx. Essa enzima apresenta, entre as suas várias aplicações, o potencial para a quantificação de glicose. O presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial desta enzima na elaboração de um Kit de quantificação de Glicose. Foram estudados dois Kits: Kit A (comercial) e o Kit B (desenvolvido a partir da GOx produzida pelo fungo amazônico). Foram obtidas as curvas de calibração dos kits e o coeficiente de regressão e coeficiente de Pearson foi usado para determinar a correlação entre as diferentes medidas dos níveis de glicose do Kit B em relação ao Kit A. Com base nos resultados alcançados no presente trabalho, pode-se observar que a determinação do nível de glicemia do Kit B foi satisfatória, em relação ao Kit A, com coeficiente de $r = 0,9978$, caracterizando uma correlação forte positiva. Esses dados demonstram, pela primeira vez, a utilização da Glicose Oxidase de *Aspergillus niger* LMM01, isolado amazônico, para mensuração de glicose.

Introdução

A determinação da glicose é útil no diagnóstico e monitoração terapêutica do diabetes mellitus, na avaliação de distúrbios do metabolismo de carboidratos, no diagnóstico diferencial das acidoses metabólicas, desidratações,

hipoglicemias e na avaliação da secreção inapropriada de insulina (1–6). Para a detecção da glicose utiliza-se como principal ferramenta o teste enzimático com glicose oxidase (GOx) (1,6–11)

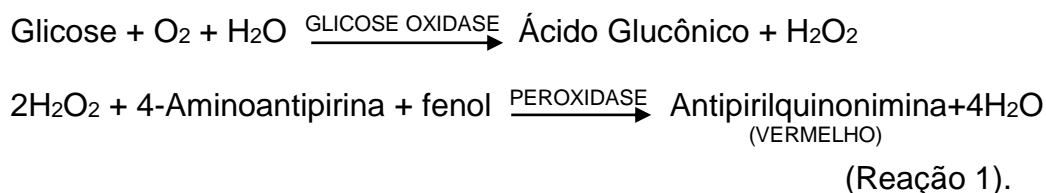
Na maioria dos testes bioquímicos, glicemia é quantificada por meio da GOx que catalisa a oxidação da glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (7,10,8). Através de uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 500 nm é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra. Atualmente, as enzimas utilizadas são oriundas de fungos do gênero *Aspergillus* e tem como característica a alta afinidade por β -D-Glicose (10).

Recentemente foi isolado, da Floresta Amazônica, um novo produtor de GOx, no entanto, pouco se sabe sobre a enzima produzida por *Aspergillus niger* LMM01 (12). A abordagem, neste trabalho, investiga a utilização da GOx produzida pelo fungo amazônico na quantificação de glicose.

Material e métodos

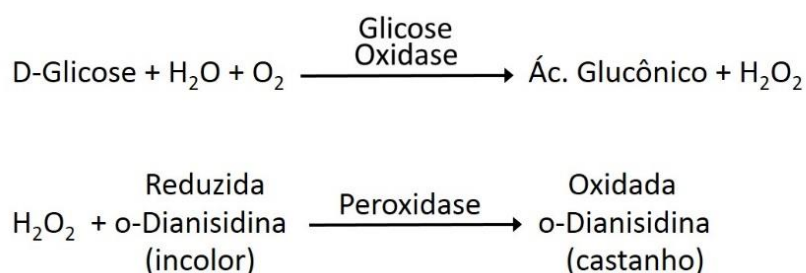
Kit comercial

Para a preparação da curva de calibração, utilizou-se o Kit Glicose Liquiform – Labtest: Reagente 1- Contém tampão fosfato 30 mmol/L; pH 7,5; glicose oxidase ≥ 12.500 U/L; peroxidase ≥ 800 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 μ mol/L; fenol ≥ 1 mmol/L; azida sódica 7,5 mmol/L e surfactantes. Adicionou-se 10 μ l da amostra teste em 1 ml do reagente 1. Após a incubação em banho maria a 37° durante 10 minutos a leitura ocorreu em 500 nm, em espectrofotômetro (FEMTO 600S). A determinação da glicose ocorreu conforme a reação 1.



Kit desenvolvido

O Kit B para a detecção de glicose utilizou uma mistura reacional consistindo em 0,1 mL da amostra de glicose (teste), 0,75 ml de o-dianisidina a 0,02% em tampão fosfato a pH 6, 0,25 ug de peroxidase (EC 1.11.1.7) e 12,5 U de Glicose Oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01. A mistura reacional foi incubada a 37° C durante 10 min e quantificada a 500 nm. A determinação da glicose ocorre conforme a reação 2.



(Reação 2)

Soluções investigadas

Soluções de glicose foram elaboradas analiticamente nas concentrações de: 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg/dL. As soluções foram preparadas com Glicose p. a. e solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9 %, em pH 7,3.

Análise estatística

A regressão linear foi utilizada para a estimativa dos valores de glicose. O coeficiente de Pearson foi usado para determinar a correlação entre as diferentes medidas dos níveis de glicose em relação ao Kit A (teste colorimétrico utilizado comercialmente para a dosagem de glicose). Esta análise de correlação entre métodos foi baseada em padrões estabelecidos pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (13). Foi realizada a análise de variância (ANOVA), onde foi estabelecido um intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Dosagem com Kit A (Comercial)

Para a preparação da curva de calibração, utilizou-se o Kit Glicose Liquiform – Labtest. Pode-se observar na figura 1, os valores referentes a absorvância e a equação da reta para a determinação da glicose, utilizando o Kit comercial.

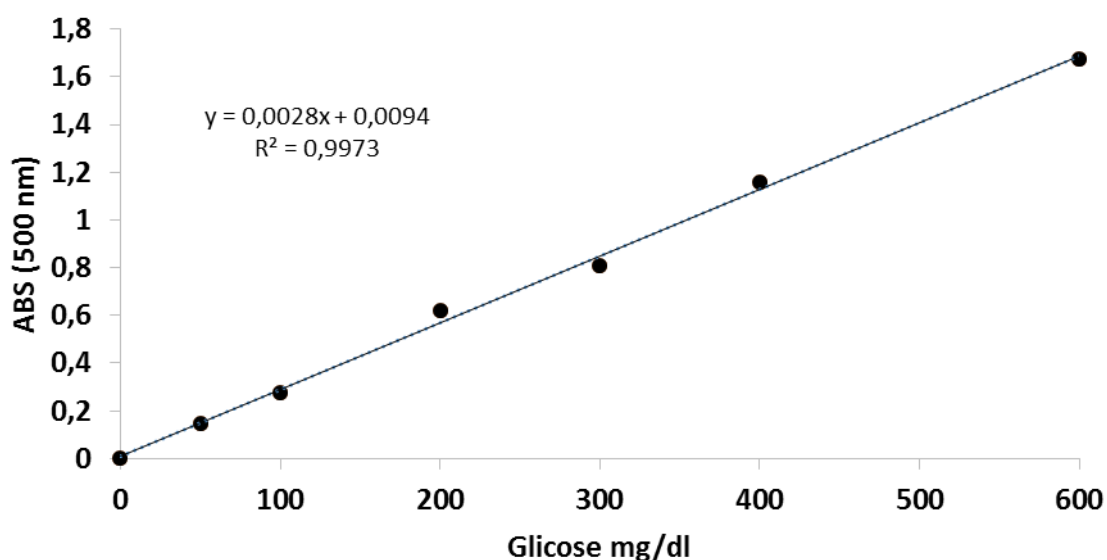


Figura 1. Curva padrão de detecção de Glicose, utilizando o Kit A (comercial).

Dosagem com Kit B (Desenvolvido)

A curva padrão do Kit B para a detecção de glicose utilizou uma mistura reacional consistindo de Glicose Oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01. A figura 2 demonstra os valores de absorbância e a equação da reta para a determinação de glicose a partir do Kit desenvolvido.

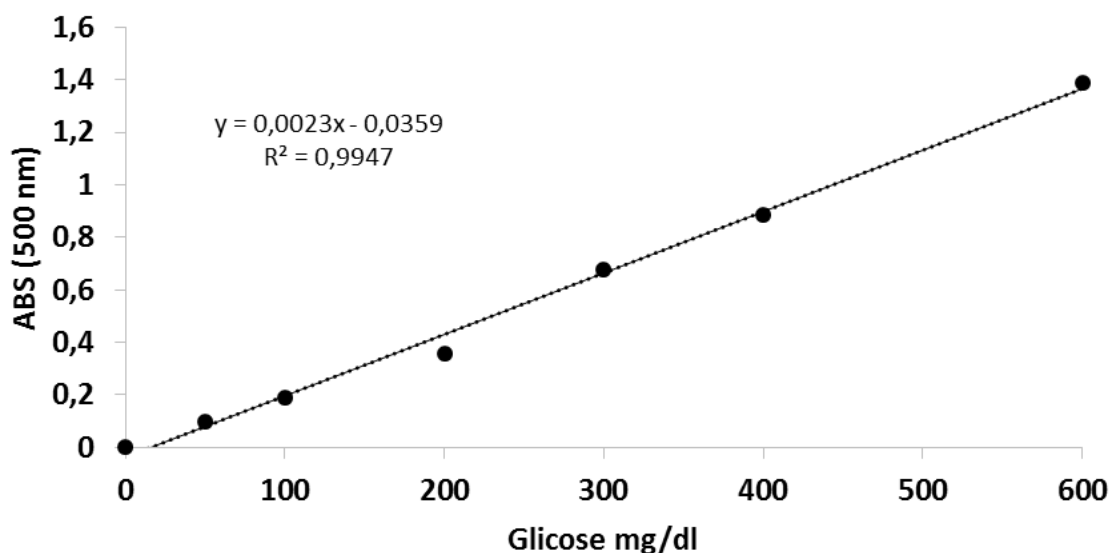


Figura 2. Curva padrão de detecção de Glicose, utilizando o Kit B (desenvolvido).

Análise estatística

O coeficiente de Pearson foi usado para determinar a correlação entre as diferentes medidas dos níveis de glicose em relação ao Kit A. Na figura 3 pode-se observar que a determinação do nível de glicemia do Kit B foi satisfatória, em

relação ao Kit A, com coeficientes de $r = 0,9978$ e $p = 0,83792$, caracterizando uma correlação forte positiva.

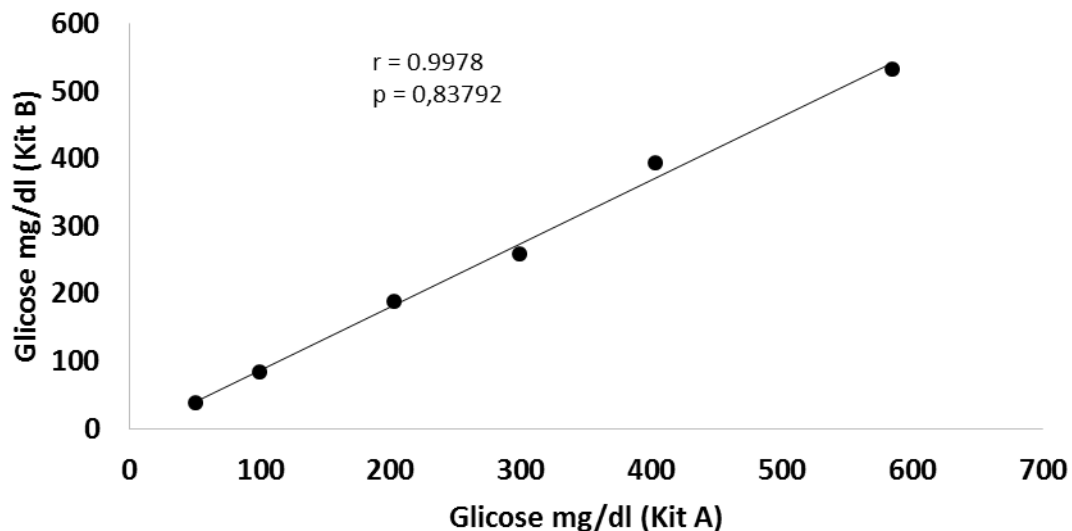


Figura 3. Valores de correlação de Pearson para a determinação do nível de Glicose, utilizando o Kit A (comercial) e o Kit B (desenvolvido, utilizando Glicose Oxidase de *Aspergillus niger* LMM01).

Discussão

Os resultados do presente trabalho demonstram uma correlação forte positiva entre o Kit desenvolvido e o Kit comercial. Foi estudado a comparação de dois métodos de detecção de glicose, utilizando a glicose oxidase produzida por *Aspergillus niger* LMM01. Especificamente, avaliou-se o Kit desenvolvido com o Kit comercialmente utilizado. Esses dados demonstram, pela primeira vez, a utilização da Glicose Oxidase de *Aspergillus niger* LMM01 para mensuração de glicose, proporcionando do desenvolvimento bioeconômico de produtos de origem amazônica.

No presente estudo, o coeficiente de Pearson ($r = 0,9978$) demonstrou uma correlação forte positiva. Como estabelecido pelo Manual CLSI, a equivalência dos métodos é significativa quando o coeficiente é maior que 0,9751 e ambos apresentarem valores dentro dos limites aceitáveis de variação (± 15 mg/dl) (13,14). Mesmo os Kits apresentando diferenças de mensuração, possivelmente pela utilização de diferentes reagentes, o Kit B apresentou sensibilidade equivalente, no entanto revelando necessidade de otimização da estabilidade.

Nos últimos anos, a importância da mensuração da glicose aumentou. Numerosos estudos mostraram aumento no uso de metodologias para a dosagem de glicose (2,14–17). Neste contexto, o conhecimento do potencial de utilização de uma nova GOx, de origem amazônica, demonstra a importância do presente trabalho. Novos estudos necessitam ser feitos para a otimização do Kit desenvolvido, a validação do método diagnóstico e a comparação com outras metodologias, objetivando tornar a utilização desta enzima mais atraente economicamente e seu uso mais difundido.

Referências

1. Klonoff DC, Lias C, Beck S, Parkes JL, Kovatchev B, Vigersky RA, et al. Development of the Diabetes Technology Society blood glucose monitor system surveillance protocol. *Journal of diabetes science and technology*. 2016(e)ko ;10(3):697–707.
2. Nicholls AR, Böhning D, Holt R, Sharp P. The use of glucose measurements to improve screening for diabetes in clinical practice. *British Journal of Diabetes*. 2016(e)ko ;16(3):123–7.
3. Gu Z, Aimetti AA, Wang Q, Dang TT, Zhang Y, Veiseh O, et al. Injectable

- nano-network for glucose-mediated insulin delivery. *ACS nano*. 2013(e)ko ;7(5):4194–201.
4. Newman JD, Turner APF. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005(e)ko ;20(12):2435–53.
 5. Song Y, Qu K, Zhao C, Ren J, Qu X. Graphene oxide: intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection. *Advanced Materials*. 2010(e)ko ;22(19):2206–10.
 6. Wang H-C, Lee A-R. Recent developments in blood glucose sensors. *journal of food and drug analysis*. 2015(e)ko ;23(2):191–200.
 7. Ferri S, Kojima K, Sode K. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases : 2011(e)ko ;5(5):1068–76.
 8. Wilson R, Turner APF. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*. 1992(e)ko ;7(3):165–85.
 9. Liu A, Lang Q, Liang B, Shi J. Sensitive detection of maltose and glucose based on dual enzyme-displayed bacteria electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017(e)ko ;87:25–30.
 10. Bankar SB, Bule M V, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase-- an overview. *Biotechnology advances*. 2009(e)ko ;27(4):489–501.
 11. Huggett ASG, Nixon DA. Use of glucose oxidase, peroxidase, and O-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *The Lancet*. 1957(e)ko ;270(6991):368–70.
 12. Sousa DRT, Santos ES, Cortez ACA, Souza VB. *Aspergillus niger* LMM01 : A new source of glucose oxidase in Amazon. 2017(e)ko ;11(22):955–64.

13. Sacks DB, Bernhardt P, Jr LJD, Goldstrein DE, Hortin GL, Muller P. Point-of-care blood glucose testing in acute and chronic care facilities; approved guideline -second edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002(e)ko ;22(17):C30–A2.
14. Dunka Jr LJ, Astles JR, Bernhaedt P. Glucose monitoring in settings without laboratory support; approved guideline - second edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2005(e)ko ;25(12):AST4–A2.
15. Famulla S, Pieber TR, Eilbracht J, Neubacher D, Soleymanlou N, Woerle HJ, et al. Glucose exposure and variability with empagliflozin as adjunct to insulin in patients with type 1 diabetes: continuous glucose monitoring data from a 4-week, randomized, placebo-controlled trial (EASE-1). *Diabetes technology & therapeutics*. 2017(e)ko ;19(1):49–60.
16. Lind M, Polonsky W, Hirsch IB, Heise T, Bolinder J, Dahlqvist S, et al. Continuous glucose monitoring vs conventional therapy for glycemic control in adults with type 1 diabetes treated with multiple daily insulin injections: the GOLD randomized clinical trial. *Jama*. 2017(e)ko ;317(4):379–87.
17. McMillan KA, Kirk A, Hewitt A, MacRury S. Objective, continuous measurement of sedentary behaviour and glucose in people with Type 2 Diabetes. In: *DIABETIC MEDICINE*. 2017. or. 122–3.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ No presente estudo, as linhagens de fungos isoladas de amostras de solo pertenceram principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

- ✓ Os dados demonstram, pela primeira vez, o potencial de linhagens de solo amazônico para produção de GOx, em um processo semi-contínuo com altos níveis enzimáticos usando sacarose (como alternativa à glicose).

- ✓ No presente trabalho, o estudo cinético demonstrou que a produção de GOx ocorreu na fase de crescimento exponencial e que *A. niger* LMM01 foi o melhor produtor.

- ✓ Após o processo de purificação, a atividade da enzima melhorou 938%, a temperatura de 40° C e o pH 6,0 foram os ótimos para a ação catalítica da enzima e a estabilidade apresentou-se adequada as suas principais necessidades industriais.

- ✓ Os íons Fe^{+++} , Pb^{++} , Ag^+ , Hg^{++} e Cu^{++} exibiram inibição significativa na atividade de GOx.

- ✓ No presente estudo, a correlação de Pearson do Kit desenvolvido e o Kit comercial foi forte positiva, com valor de $r = 0,9978$.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABER, S. et al. Immobilization of Glucose Oxidase on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and its Application in the Removal of Acid Yellow 12. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 3, p. 93, 2016.

AHMAD, I. Propagation of *Aspergillus niger* in Stirred Fermentor for the Production of Glucose Oxidase. n. April, 2014.

AHMED, I. et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 148–154, 2016.

AMIRI, A. et al. Evaluation of physicochemical properties of gluten modified by Glucose oxidase and Xylanase. **Journal of Cereal Science**, v. 227, n. 3, p. 660–670, 2016.

BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 5–10, 1989.

BANKAR, S. B. et al. Glucose oxidase--an overview. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 4, p. 489–501, 2009a.

BANKAR, S. B. et al. Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 4, p. 344–352, 2009b.

BASSI, N. S.; IEIS, F.; POIT, D. R. O uso de estudos prospectivos na elaboração do planejamento estratégico de uma instituição científica-tecnológica brasileira. p. 173–192, [s.d.].

BHAT, S. V et al. Isolation and charecterization of Glucose Oxidase (GOD) from *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 2, n. 6, p. 153–161, 2013.

BLAZ, M. et al. Cloning , Heterologous Expression , Purification and Characterization of M12 Mutant of *Aspergillus niger* Glucose Oxidase in Yeast *Pichia pastoris* KM71H. p. 305–311, 2014.

BODADE, R. G.; KHOBRAGADE, C. N.; ARFEEN, S. Optimization of culture conditions for glucose oxidase production by a *Penicillium chrysogenum* SRT 19 strain. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 35–39, ots. 2010.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and soil**, v. 232, n. 1-2, p. 147–154, 2001.

CELESTINO, J. DOS R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, apr. 2014a.

CELESTINO, R. et al. *Aspergillus* 6V4 , a Strain Isolated from Manipueira , Produces High Amylases Levels by Using Wheat Bran as a Substrate. v. 2014, 2014b.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413–33, 10 eka. 2006.

CHEN, H.-C. et al. Direct electron transfer of glucose oxidase and dual hydrogen peroxide and glucose detection based on water-dispersible carbon nanotubes derivative. **Analytica chimica acta**, v. 867, p. 83–91, 31 martx. 2015.

CHENG, Y. et al. Highly sensitive luminol electrochemiluminescence immunosensor based on ZnO nanoparticles and glucose oxidase decorated graphene for cancer biomarker detection. **Analytica chimica acta**, v. 745, p. 137–42, 1 urr. 2012.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, 5 martx. 2015.

CICATIELLO, P. et al. Marine fungi as source of new hydrophobins. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 1229–1233, 2016.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467–1478, 13 abz. 2014.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Endophytes and associated marine derived fungiecological and chemical perspectives. **Fungal Diversity**, v. 57, n. 1, p. 45–83, 2012.

DELABONA, P. DA S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, ots. 2012.

DEVASENATHIPATHY, R. et al. Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 78, p. 40–45, urr. 2015.

DUNKA JR, L. J.; ASTLES, J. R.; BERNHAEDT, P. Glucose monitoring in

settings without laboratory support; approved guideline - second edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**., v. 25(12), p. AST4–A2, 2005.

FAMULLA, S. et al. Glucose exposure and variability with empagliflozin as adjunct to insulin in patients with type 1 diabetes: continuous glucose monitoring data from a 4-week, randomized, placebo-controlled trial (EASE-1). **Diabetes technology & therapeutics**, v. 19, n. 1, p. 49–60, 2017.

FAPYANE, D.; POULSEN, C. H.; FERAPONTOVA, E. E. Bioelectrocatalytic oxidation of glucose by hexose oxidase directly wired to graphite. **Electrochemistry Communications**, v. 65, p. 1–4, 2016.

FARID, M. A. et al. Statistical optimization of glucose oxidase production from *Aspergillus niger* NRC9 under submerged fermentation using response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 523–531, 18 uzt. 2012.

FAROOQ, A. et al. Comparative performance evaluation of conventional bleaching and enzymatic bleaching with glucose oxidase on knitted cotton fabric. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 167–171, martx. 2013.

FERREIRA, S. J. F. et al. Nutrientes na solução do solo em floresta de terra firme na Amazônia Central submetida à extração seletiva de madeira. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 1, p. 59–68, 2006.

FERRI, S.; KOJIMA, K.; SODE, K. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases : v. 5, n. 5, p. 1068–1076, 2011.

FIEDUREK, J.; GROMADA, A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 1, p. 85–89, 2000.

FISCH, G.; MARENGO, J. A.; NOBRE, C. A. Clima da Amazônia. **Climanálise-Boletim de Monitoramento e Análise Climática-Edição Comemorativa de**, v. 10, 2006.

FLORES, R. V. G. et al. Production and partial characterization of glucose oxidase and catalase from xerophytic strain of *Aspergillus niger*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 29, p. 2788–2800, 16 uzt. 2014.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and conservation**, v. 16, n. 1, p. 69–72, 2007.

GAO, Z.; LI, Z.; ZHANG, Y. High-level expression of the *Penicillium notatum* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* using codon optimization. p. 507–514, 2012.

GOMES, E. et al. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* a 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* a 13.37. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 75 – 82, 2005.

GOUDA, M. D. et al. Thermal inactivation of glucose oxidase mechanism and stabilization using additives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24324–24333, 2003.

GU, L. et al. High-level extracellular production of glucose oxidase by recombinant *Pichia pastoris* using a combined strategy. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1429–47, ots. 2015.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. SCREENING OF FILAMENTOUS FUNGI FOR PRODUCTION OF ENZYMES OF BIOTECHNOLOGICAL INTEREST. p. 474–480, 2006.

HAMED, S. A. M. In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 98–102, 2013.

HAQ, I. U. et al. Random Mutagenesis of *Aspergillus niger* and Process Optimization for Enhanced Production of Glucose Oxidase. n. JUNE 2014, 2014a.

HAQ, I. U. et al. Isolation and Identification of Glucose Oxidase Hyper Producing Strain of *Aspergillus niger*. 2014b.

HAYASHI, A. et al. *Aspergillus Sydowii* Marine Fungal Bloom in Australian Coastal Waters, Its Metabolites and Potential Impact on Symbiodinium Dinoflagellates. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 59, 2016.

HWA, K. Immobilization of Glucose Oxidase on Gold Surface for Applications in Implantable Biosensors. v. 4, n. 4, p. 297–301, 2015.

IQBAL, J.; UTARA, U. Isolation of *Aspergillus niger* Strains from Soil and their Screening and Optimization for Enhanced Citric Acid Production using Cane Molasses as Carbon Source. n. August, 2016.

JITHENDAR, T.; SAIRAM, K. V. S. S.; VERMA, V. Enrichment of Glucose oxidase production by *Aspergillus niger* PIL7 in submerged cultivation based on Conventional Optimization Approach. **Journal of Pharmacy Research**, v. 8, n. 10, p. 1462–1466, 2014.

JO ATILDE O, M. S. L. et al. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 24, p. 1217–

1223, 2016.

KHAN, I. et al. Molecular cloning and sequence analysis of a PVGOX gene encoding glucose oxidase in *Penicillium viticola* F1 strain and its expression quantitation. **Gene**, p. 1–12, 2016.

KHURSHID, S. et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger*. v. 10, n. 9, p. 1674–1678, 2011.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, abz. 2002.

KLONOFF, D. C. et al. Development of the Diabetes Technology Society blood glucose monitor system surveillance protocol. **Journal of diabetes science and technology**, v. 10, n. 3, p. 697–707, 2016.

KONA, R. P.; QURESHI, N.; PAI, J. S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. **Bioresource technology**, v. 78, n. 2, p. 123–126, 2001.

KONISHI, T. et al. Safety evaluation of glucose oxidase from *Penicillium chrysogenum*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 13–23, 2013.

KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Producing *Aspergillus tubingensis* k38 Glucose oxidase by Solid state fermentation versus submerged fermentation: process optimization and enzyme stability by an intermediary metabolite in relation with diauxic growth. 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAROCCA, T. J. et al. Bactericidal Action of a Complement-Independent Antibody against Relapsing Fever *Borrelia* Resides in Its Variable Region. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6222–6228, 18 apr. 2008.

LIN, Y. et al. Electrochemical glucose biosensor with improved performance based on the use of glucose oxidase and Prussian Blue incorporated into a thin film of self-polymerized dopamine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 210, p. 513–518, apr. 2015.

LIND, M. et al. Continuous glucose monitoring vs conventional therapy for glycemic control in adults with type 1 diabetes treated with multiple daily insulin injections: the GOLD randomized clinical trial. **Jama**, v. 317, n. 4, p. 379–387, 2017.

LIU, D. et al. Glucose Oxidase-Catalyzed Growth of Gold Nanoparticles Enables Quantitative Detection of Attomolar Cancer Biomarkers. 2014.

LIU, J.-Z. et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 317–323, 2003.

LU, T. et al. The production of glucose oxidase using the waste myceliums of *Aspergillus niger* and the effects of metal ions on the activity of glucose oxidase. v. 0229, n. 96, p. 339–342, 1996.

MACRIS, H. B. J. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. v. 0229, n. 94, p. 530–534, 1995.

MALHERBE, D. F. et al. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine

production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 502–11, eka. 2003.

MCMILLAN, K. A. et al. **Objective, continuous measurement of sedentary behaviour and glucose in people with Type 2 Diabetes**. DIABETIC MEDICINE. **Anais...**2017

MENDES, M. M. G. DA S. et al. Screening of Amazon fungi for the production of hydrolytic enzymes. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 10, p. 741–748, 2015.

MENG, Y. et al. Production and characterization of recombinant glucose oxidase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*. p. 393–400, 2013.

MILLER, G. L. Use of DNS reagent for the measurement of reducing sugar. **Anal. Chem**, v. 31, n. 1, p. 426–428, 1959.

MIRHENDI, H. et al. *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* as the dominant black *Aspergillus*, use of simple PCR-RFLP for preliminary differentiation. **Journal de mycologie médicale**, v. 26, n. 1, p. 9–16, 2016.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. In: **Revista processos químicos**. Goiânia: SENAI, 2009. v. 3p. 9–23.

NAKAMURA, S.; OGURA, Y. Mode of Inhibition of Glucose Oxidase by Metal Ions By SATOSHI NAKAMURA and YASUYUKI OGURA (From the Department of Biophysics and Biochemistry , Faculty of Science , for publication , *Aspergillus niger* was markedly inhibited by Ag + , Hg ++ , Cu ++ , PCM. **The Journal of Biochemistry**, v. 64, 1968.

NICHOLLS, A. R. et al. The use of glucose measurements to improve screening for diabetes in clinical practice. **British Journal of Diabetes**, v. 16, n. 3, p. 123–127, 2016.

NOGUERA, N. et al. Comunicación Efecto del sistema glucosa oxidasa / glucosa sobre el crecimiento de Escherichia coli ATCC 25922 en leche Effect of glucose oxidase / glucose system on the growth of Escherichia coli ATCC 25922 in milk. v. 5, n. 1, p. 57–69, 2014.

OLIVEIRA, L. G. et al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 95, p. 49–54, 2013.

OZYILMAZ, G.; TUKEL, S. S.; ALPTEKIN, O. Activity and storage stability of immobilized glucose oxidase onto magnesium silicate. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 35, n. 4, p. 154–160, 2005.

PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, 2009.

PICKERING, G. .; HEATHERBELL, D. .; BARNES, M. . Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. **Food Research International**, v. 31, n. 10, p. 685–692, 1998.

PINHEIRO, E. A. A. et al. Chemical constituents of *Aspergillus* sp EJC08 isolated as endophyte from *Bauhinia guianensis* and their antimicrobial activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 85, n. 4, p. 1247–1252, 2013.

RAMANAVICIUS, A. et al. Biofuel cell based on glucose oxidase from *Penicillium*

funiculosum 46.1 and horseradish peroxidase. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 165–173, martx. 2015.

RAMZAN, M.; MEHMOOD, T. Enhanced production of glucose oxidase from UV-mutant of *Aspergillus niger*. v. 8, n. 2, p. 288–290, 2009.

RÖCKER, J. et al. The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine. **Food Chemistry**, v. 210, p. 660–670, 2016.

ROGALSKI, J. et al. Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 8, p. 508–511, 1988.

RUSSELL, J. R. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6076–84, ira. 2011.

SACKS, D. B. et al. Point-of-care blood glucose testing in acute and chronic care facilities; approved guideline -second edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**., v. 22(17), p. C30–A2, 2002.

SALONY, A. P. et al. The use of Amazon fungus (*Trametes* sp.) in the production of cellulase and xylanase. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 20, p. 843–853, 2016.

SANTOS, Y. V. S. DOS et al. Production of laccase from a white rot fungi isolated from the Amazon forest for oxidation of Remazol Brilliant Blue-R. v. 10, n. 4, p. 132–136, 2015.

SAPOUNTZI, E. et al. Gold nanoparticles assembly on electrospun poly(vinyl

alcohol)/poly(ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 392–401, 2017.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: BLUCHER, E. (Arg.). . **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**. São Paulo: [s.n.]. p. 179–192.

SESSEGOLO, T. et al. Microbiota fúngica em amostras de água potável e esgoto doméstico Fungal microbiota in drinking water and domestic sewage. **Semina: Ciências agrárias**, v. 32, n. 1, p. 301–306, 2011.

SIMPSON, C. et al. Isolation , puri W cation and characterization of a novel glucose oxidase from *Penicillium* sp . CBS 120262 optimally active at neutral pH. v. 51, p. 260–266, 2007.

SINGH, H.; REDDY, M. S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 1, p. 30–34, 2011.

SINGH, J.; VERMA, N. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: Production , characterization and immobilization for glucose oxidation. v. 4, n. 3, p. 250–257, 2013.

ŠNAJDR, J. et al. Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. **FEMS microbiology ecology**, v. 78, n. 1, p. 80–90, 2011.

SONDHIA, S. et al. Biodegradation of the herbicide penoxsulam

(triazolopyrimidine sulphonamide) by fungal strains of *Aspergillus* in soil. **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 196–206, 2016.

SONJAK, S. et al. *Penicillium svalbardense*, a new species from Arctic glacial ice. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 43–51, 2007.

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 207–216, 2006.

SOUSA, D. R. T. et al. *Aspergillus niger* LMM01: A new source of glucose oxidase in Amazon. v. 11, n. 22, p. 955–964, 2017.

TALBERT, J. N. et al. Modification of glucose oxidase for the development of biocatalytic solvent inks. **Enzyme and microbial technology**, v. 55, p. 21–25, 2014.

TONELOTTO, M. et al. Isolation and characterization of a β -galactosidase from a new Amazon forest strain of *Aspergillus niger* as a potential accessory enzyme for biomass conversion. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 13–22, 2014.

TOUAHAR, I. E. et al. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. **The Science of the total environment**, v. 481, p. 90–9, 15 mai. 2014.

TURKMEN, E. et al. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode. **Electrochimica Acta**, v.

123, p. 93–102, març. 2014.

VOLKOFF, B.; CERRI, C. C. Húmus em solos da floresta Amazônica na região do rio Madeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 5, n. 1, p. 15–21, 1981.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, p. 315–322, 1990.

WILSON, R.; TURNER, A. P. F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 3, p. 165–185, 1992.

WITT, S. et al. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. **Biochemical Journal**, v. 347, n. 2, p. 553–559, 2000.

WONG, C. M.; WONG, K. H.; CHEN, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927–938, 2008.

XIA, Y. et al. Colorimetric Visualization of Glucose at the Submicromole Level in Serum by a Homogenous Silver Nanoprism – Glucose Oxidase System. 2013.

ZHANG, H. et al. Freshwater ascomycetes: *Lophiostoma vaginatispora* comb. nov. (Dothideomycetes, Pleosporales, Lophiostomaceae) based on morphological and molecular data. **Phytotaxa**, v. 176, n. 1, p. 184–191, 2014.

ZHANG, T. et al. Diversity and Distribution of Aquatic Fungal Communities in the Ny-Ålesund Region, Svalbard (High Arctic). **Microbial Ecology**, v. 71, n. 3, p. 543–554, 2016.

ZHOU, M. et al. Antiviral and Cytotoxic Isocoumarin Derivatives from an Endophytic Fungus *Aspergillus oryzae*. **Planta Med**, p. 414–417, 2016.

APÊNDICE I