

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PRODUZIDAS
PELO FUNGO FILAMENTOSO *PENICILLIUM CITRINUM*.

Manaus – AM
2014

PAMELLA SUELY SANTA ROSA PIMENTEL

**CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PRODUZIDAS
PELO FUNGO FILAMENTOSO *PENICILLIUM CITRINUM*.**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva

Co-orientadores: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

**Manaus-AM
2014**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P644c Pimentel, Pamela Suely Santa Rosa
CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS
PRODUZIDAS PELO FUNGO FILAMENTOSO PENICILLIUM
CITRINUM / Pamela Suely Santa Rosa Pimentel. 2014
102 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Gustavo Nunes da Silva
Coorientador: Edmar Vaz de Andrade
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Celulases. 2. Penicillium citrinum. 3. Trichoderma reesei
QM9414. 4. Hidrólise. I. Silva, Carlos Gustavo Nunes da Il.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

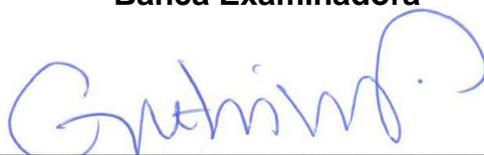
PAMELLA SUELY SANTA ROSA PIMENTEL

Caracterização de Enzimas Celulolíticas Produzidas pelo fungo Filamentoso *Penicillium citrinum*

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 06 de Maio de 2014.

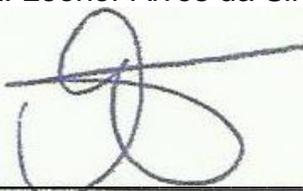
Banca Examinadora



Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva



Dra. Leonor Alves da Silva



Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

DEDICO:

À Deus, ao meu esposo com amor e gratidão por sua compreensão, presença e apoio no decorrer da elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus maravilhoso que tem me abençoado por toda minha vida, que ilumina e dá direção nos meus caminhos em todos os momentos; a minha família, minha mãe e meu esposo, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, sem o qual eu não poderia chegar até aqui.

Ao Meu orientador prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva, por acreditar em mim, pela confiança depositada, pela paciência e encorajamento, por todos os ensinamentos e orientação deste trabalho. Ao professor Dr. Edmar Vaz de Andrade, pelo apoio e direcionamento em várias etapas deste trabalho. Ao professor Dr. Spartaco Astolfi Filho pela oportunidade de ter trabalhado sob sua direção e pela inspiração à pesquisa que ele representa.

À Ana Tana Rosas e Jennifer Salgado da Fonseca, pela colaboração e compartilhamento de experiências, no laboratório de Fermentação do CAM. A Anita Souza, Dina Assunção, Edson Carmo, Eliane Carvalho, Henriette Soares e Suelen Dias pelas contribuições, por toda ajuda e disposições dispensadas no dia-a-dia nos laboratórios de DNA e Proteômica. À Dra. Rosemary Aparecida Roque, pela ajuda e colaboração nas análises estatísticas, pelos conhecimentos que obtive os quais ajudaram a solidificar os resultados obtidos neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa do qual esse trabalho fez parte.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito OBRIGADA!

Depois de um tempo você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.

(William Shakespeare)

RESUMO

As enzimas celulolíticas são biocatalizadores altamente específicos. Estas, são classificadas de acordo com o local em que atuam na fibra celulósica: endoglucanases iniciam a hidrólise, exoglucanases agem nos terminais redutores produzidos pelas endoglucanases e as beta-glicosidases atuam no produto da catálise das exoglucanases liberando monômeros de glicose. Fungos do gênero *Penicillium* são amplamente reportados como ótimos produtores de enzimas celulolíticas. Visando contribuir para os processos biocatalíticos e obtenção de novas fontes de enzimas, neste trabalho avaliou-se as propriedades físico-químicas de enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo *Penicillium citrinum* isolado do bagaço de cana-de-açúcar da Usina Jayoro S/A, localizada no município de Presidente Figueiredo-AM-Brasil. E comparou-se o perfil de produção enzimática durante a fermentação submersa com o da estirpe *Trichoderma reesei* QM9414 que é amplamente reportado como um ótimo produtor de enzimas celulolíticas. *P. citrinum* apresentou desempenho equivalente à *T. reesei* QM9414 nas atividades enzimáticas volumétricas (U/mL) e desempenho superior nas atividades específicas (U/mg). Quanto as propriedades das endoglucanases e beta-glicosidase de *P. citrinum*, a temperatura ótima de atividade foi 60°C para ambas as enzimas. O pH ótimo para a atividade endoglucanásica foi pH 4,2 e para a atividade de beta-glicosidase pH 6,0. *P. citrinum* produziu pelo menos duas endoglucanases com massas moleculares aparente de ~ 50kDa e ~ 35kDa, visualizadas em gel de SDS-PAGE e em gel de atividade (zimograma). Uma fração obtida da eluição de cromatografia de exclusão molecular, apresentou somente atividade de beta-glicosidase e revelou bandas de aproximadamente 100kDa. O desempenho e as características dessas endo e beta-glicosidases demonstram que *P. citrinum* representa uma alternativa para produção de novas enzimas para hidrólise da fibra celulolítica.

Palavras-chave: Celulases; *Penicillium citrinum*; *Trichoderma reesei* QM9414, Hidrólise

ABSTRACT

Cellulolytic enzymes are highly specific biocatalysts. These are classified according to the place where they work in the cellulosic fiber: endoglucanases initiate hydrolysis exoglucanases act on reducing terminals produced by endoglucanases and β -glucosidases act on the product of catalysis of exoglucanases releasing glucose monomers. *Penicillium* fungi are widely reported as a great producer of cellulolytic enzymes. Aiming to contribute to the catalytic process and obtaining new sources of enzymes, this study evaluated the physicochemical properties of enzymes produced by cellulolytic fungus *Penicillium citrinum* isolated from bagasse cane sugar mill Jayoro of S / A, located in the municipality of Presidente Figueiredo -AM - Brazil. And the enzyme production profile was repaired during submerged fermentation with the strain of *Trichoderma reesei* QM9414 which is widely reported as a great producer of cellulolytic enzymes. *P. citrinum* showed equivalent performance to *T. reesei* QM9414 in volumetric enzyme activity (U/mL) and superior performance in specific activities (U/mg). About properties of endoglucanases and β -glucosidase from *P. citrinum*, the optimum temperature for activity was 60 ° C for both enzymes. The optimum pH for endoglucanases activity was pH 4.2 and the activity of β -glucosidase pH 6.0. *P. citrinum* produced at least two endoglucanases with apparent molecular masses of ~ 50kDa and ~ 35kDa, visualized on SDS-PAGE gels and in gel activity (zymogram). An elution fraction obtained from size exclusion chromatography, showed only β -glucosidase activity and revealed bands of approximately 100 kDa. The performance and characteristics of these endo and β -glucosidases demonstrate that *P. citrinum* represents a new alternative for production of cellulolytic enzymes for hydrolysis of fiber.

Keywords: Cellulases; *Penicillium citrinum*; *Trichoderma reesei* QM9414; hydrolysis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura da cadeia de celulose na fibra celulósica.....	21
FIGURA 2 – Representação da estrutura cristalina da fibra celulósica.....	21
FIGURA 3 - Representação esquemática da atuação sinérgica das enzimas celulolíticas.....	27
FIGURA 4 – Representação esquemática da visão atual da degradação da celulose por enzimas celulolíticas de fungos.....	28
FIGURA 5 - imagens representativas do fungo filamentososo <i>Penicillium citrinum</i>	54
FIGURA 6 - Cinética de produção enzimática na FS de <i>P. citrinum</i>	56
FIGURA 7 - Cinética de produção enzimática na FS de <i>T. reesei</i> QM 9414.....	57
FIGURA 8 - Concentração de glicose no sobrenadante de cultivo.....	57
FIGURA 9 - Atividade de celulases totais – FPASE.....	59
FIGURA 10 - Atividade de endoglicanases de <i>P. citrinum</i> e <i>T. reesei</i> QM 9414.	61
FIGURA 11 – Atividade Avicelase de <i>P. citrinum</i> e <i>T. reesei</i> QM 9414.	63
FIGURA 12 - Atividade de beta-glicosidase de <i>P.citrinum</i> e <i>T. reesei</i> QM 9414.	65
FIGURA 13 - Proteínas totais de <i>P.citrinum</i> e <i>T. reesei</i> QM 9414 durante a fermentação submersa.	66
FIGURA 14– Perfil de atividade específica de celulases totais.....	70
FIGURA 15 - Atividade específica de endoglicanases.....	72
FIGURA 16 - Atividade específica de exoglicanase (Avicelase)	74
FIGURA 17 - Atividade específica de beta-glicosidase.....	76
FIGURA 18 - Influência do pH na atividade enzimática de endoglicanase.....	77
FIGURA 19 - Influência do pH na atividade enzimática de beta-glicosidase.....	78
FIGURA 20 - Temperatura ótima para a atividade de endoglicanase.....	79
FIGURA 21 - Temperatura ótima para a atividade de beta-glicosidase.....	80
FIGURA 22 - Efeito da temperatura para a atividade endoglicanase.....	82
FIGURA 23 – Efeito da temperatura para a atividade beta-glicosidase.....	83
FIGURA 24 - Gel de poliacrilamida 12% das proteínas precipitadas com sulfato de amônio.....	84
FIGURA 25 - Atividades enzimáticas e concentração de proteínas do precipitado nas faixas de saturação (%) de sulfato de amônio.	85

FIGURA 26 - Perfil de atividade enzimática (U/mL) e teor de proteínas (µg/mL) das frações eluidas em coluna de gel filtração Superdex 75 10/300 GL.....	87
FIGURA 27 - Gel de poliacrilamida 12% das frações com proteínas e atividade enzimática, coletadas da gel-filtração na coluna Superdex 75.....	88
FIGURA 28 – Zimograma em Gel SDS-PAGE para endoglicanases.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Famílias de celulasas e números EC	24
TABELA 2 - Aplicações de enzimas celulolíticas em diversos setores industriais.....	33
TABELA 3 - Composição do meio BDA.....	37
TABELA 4 - Composição do meio de fermentação submersa.....	40
TABELA 5 - Curva padrão de BSA.....	47
TABELA 6 - Combinação de volumes para obtenção de tampão Citrato/fosfato McILVAINE.....	48
TABELA 7 - Identificação molecular da espécie estudada após alinhamento da sequência com maior identidade (%)	53
TABELA 8 - Valores de diluição e estimativa de concentração de enzima.....	60
TABELA 9 - Atividade volumétrica (U/mL) e atividade em relação à concentração de proteínas (U/mg) de enzimas celulolíticas produzidas por <i>P. citrinum</i>	68
TABELA 10 - Atividade volumétrica (U/mL) e atividade em relação à concentração de proteínas (U/mg) de enzimas celulolíticas produzidas por <i>T. reesei</i> QM 9414.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância
AVICEL: Celulose microcristalina
AVICELASE: Atividade enzimática em Avicel
BDA: Batata Dextrose Ágar
BG: Beta-glicosidases
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BSA: Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Cloreto de cálcio
CBH: Celobiohidrolases (exoglicanases)
CMC: Carboximetilcelulose
CMCase: Atividade enzimática em CMC
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Cloreto de cobalto
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
ENDO: Endoglicanases
EXO:Exoglicanases
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Sulfato de ferro
FIG.: Figura
FPASE: Atividade enzimática em Papel de filtro
FS: Fermentação Submersa
GOD: Glicose oxidase
IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada
KCL: Cloreto de Potássio
kDa: QuiloDalton
 KH_2PO_4 : Fosfato de potássio
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Sulfato de magnésio
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Sulfato de manganês
 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: Sulfato de amônio
PCR: Polymerase Chain Reaction
rDNA : DNA ribossomal

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
(dodecil-sulfato de sódio –Eletroforese em gel de poliacrilamida)

TAB.: Tabela

TRIS: Hidroximetilaminometano

ZnSO₄ · 7H₂O : Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Celulose	20
2.2 Hidrólise enzimática da Celulose	22
2.3 Celulases.....	23
2.3.1 Endoglicanases.....	24
2.3.2 Exoglicanases.....	25
2.3.3 Beta-glicosidases.....	26
2.4 Sinergismo das celulases.....	26
2.5 Micro-organismos celulolíticos	28
2.6 O gênero <i>Penicillium</i> e espécies produtores de enzimas celulolíticas	29
2.7 A espécie <i>Penicillium citrinum</i>	31
2.8 Aplicações industriais das celulases	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Geral.....	35
4.2 Específicos	35
5. METODOLOGIA	36
5.1 Micro-organismos	36
5.2 Reativação de <i>Penicillium citrinum</i> e <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414.....	36
5.3 Manutenção dos micro-organismos.....	37
5.4 Identificação Molecular.....	37
5.4.1 Extração de DNA do fungo filamentoso <i>Penicillium citrinum</i>	37
5.4.2 Amplificação e sequenciamento da região do gene 28S rDNA.....	38
5.5 Produção de conídios e inóculos para fermentação submersa	39
5.6 Meio Indutor para produção de Enzimas celulolíticas	39
5.7 Ensaio Enzimáticos	40
5.7.1 Determinação de Atividade de celulases totais – Fpase.....	42
5.7.2 Determinação de Atividade endoglucanásica - CMCase	43
5.7.3 Determinação de Atividade de exoglicanase (avicelase).....	44
5.7.4 Determinação de atividade beta-glicosidase	45
5.8 Quantificação de proteínas totais em solução.....	46
5.9 Caracterização das atividades enzimáticas.....	47
5.9.1 Determinação do pH ótimo para as atividades enzimáticas.	47

5.9.2	Determinação da Temperatura ótima para as atividades enzimáticas.	49
5.9.3	Estabilidade térmica para atividades enzimáticas.	49
5.10	Purificação parcial de enzimas do complexo celulolítico de <i>P.citrinum</i>	49
5.10.1	Precipitação com sulfato de amônio.....	50
5.10.2	Cromatografia de exclusão molecular – Gel filtração	50
5.11	Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)	51
5.12	Zimografia para Endoglucanases em gel de poliacrilamida(SDS-PAGE).....	52
5.13	Análise estatística.....	52
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1	Identificação molecular	53
6.2	Cinética de produção de celulasas - Atividades enzimáticas (U/mL).....	54
6.3	Atividade enzimática de celulasas totais – FPASE	58
6.4	Atividade enzimática de endoglicanases – CMCase	59
6.5	Atividade enzimática de beta-glicosidades	63
6.6	Quantificação de proteínas solúveis totais no extrato enzimático bruto.....	65
6.7	Atividades enzimáticas em relação ao teor de proteínas totais presentes no extrato bruto.	67
6.7.1	Atividade específica de celulasas totais - FPASE.....	69
6.7.2	Atividade específica de endoglicanases	71
6.7.3	Atividade específica de exoglicanases.....	73
6.7.4	Atividade específica de beta-glicosidase	74
6.8	pH ótimo para as atividades das enzimas endoglicanases e beta-glicosidades produzidas por <i>P.citrinum</i>	76
6.9	Temperatura ótima para a atividade de endoglicanases e beta-glicosidades produzidas por <i>P.citrinum</i>	78
6.10	Estabilidade térmica de endoglicanases e beta-glicosidades de <i>P. citrinum</i>	81
6.11	Purificação parcial de endoglicanase e beta-glucosidade de <i>P. citrinum</i>	83
6.12	Zimografia para endoglicanases	88
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	91
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1.INTRODUÇÃO

A sociedade contemporânea tem buscado a redução da dependência de combustíveis fósseis, como carvão, gás e petróleo, reservas que estão desaparecendo gradativamente. Uma das alternativas para contornar esta realidade e reduzir problemas ambientais e energéticos tem sido o uso de etanol obtido a partir de carboidratos. Alguns países produzem etanol a partir do milho, como é caso dos Estados Unidos e China na União Europeia utiliza-se a beterraba como matéria prima. No Brasil é produzido etanol a partir do caldo da cana, pela ação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por meio da fermentação. (ALCARDE, 2007). O Brasil possui um potencial de crescimento na exportação do álcool, para atender parte da demanda mundial por etanol, pois o produto é renovável e útil como alternativa energética mundial (VIAN, 2007). O país atualmente tem estado em posição de destaque no contexto internacional em relação à obtenção de etanol a partir da cana de açúcar, o etanol de primeira geração.

No entanto o objetivo é o aproveitamento ao máximo de toda a potencialidade que o país tem no quesito fontes renováveis, por isto, tem se buscado produzir em grande escala o etanol de segunda geração, o qual é produzido por via enzimática e utiliza como substrato a biomassa rica em celulose do bagaço da cana. Neste processo é feito a hidrólise da biomassa celulósica que gera glicose, a qual poderá ser fermentada produzindo assim o etanol, logo, além de se utilizar o caldo de cana é possível usar também outras partes da cana de açúcar como, além do bagaço, as folhas e palhas. A biomassa, portanto, tem sido o subsídio para a obtenção de combustíveis alternativos. Pode-se definir biomassa do ponto de vista energético, como qualquer matéria orgânica de origem vegetal que possa ser transformada em energia térmica, mecânica ou elétrica (ANEEL, 2008).

A biomassa pode ser obtida de fontes florestais como a madeira, ou vinda de rejeitos urbanos e industriais sólidos ou líquidos como o lixo, por exemplo, ou pode ainda ser de origem agrícola como o arroz, milho, soja e cana de açúcar entre outros. O principal componente da biomassa é a matéria lignocelulósica. Segundo Jeffries (1990), as biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, as quais são unidas entre si

por ligações covalentes, formando uma rede complexa, resistente a ataques microbianos. A lignina confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. De acordo com Xu e colaboradores (2007) as frações fermentáveis destas matérias-primas incluem celulose (β -1,4-ligada a glicose) e hemicelulose, uma fração substancial heterogênea composta de xilose e açúcares menores de cinco e seis carbonos.

A viabilidade da produção de etanol de segunda geração é dependente da sustentabilidade ambiental e econômica nas etapas do processo de produção. Na conversão de materiais lignocelulósicos uma das etapas cruciais é o pré-tratamento da biomassa antes de realizar a hidrólise, tanto para que a estrutura cristalina lignocelulósica seja quebrada, quanto para que a lignina seja removida, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática. Pois a lignina presente na biomassa lignocelulósica restringe a hidrólise, devido a ocultar a superfície celulósica e impedir que as fibras sofram intumescimento. Neste sentido tem se buscado estratégias de pré-tratamento adequado, que maximize a atividade enzimática, minimize a perda de açúcares, não necessite de adição de reagentes que venham inibir as enzimas da etapa de hidrólise e os micro-organismos fermentativos, diminua o uso de energia, reagentes e equipamentos e permita o uso da metodologia em escala industrial (ODEDA, 2010; HOLTZAPPLE, 1984; CANILHA, 2009).

As enzimas da hidrólise são uma parte fundamental no processo de obtenção de etanol a partir da biomassa, e a viabilidade destas precisa estar relacionado com alta eficiência de conversão a baixos custos de produção. Capacidade de atuação em pH e temperatura brandas, especificidade alta, possuir baixa inibição por seu produto de hidrólise, atividade elevada em substratos insolúveis, alta estabilidade em pH e temperaturas ótimas, são algumas das características desejáveis para que a enzima seja considerada viável comercialmente (MAKI *et al*, 2009; CASTRO, 2010).

Além de serem utilizadas na hidrólise de substratos para a produção de etanol, as enzimas celulolíticas também possuem outras aplicações bastante amplas, elas têm sido requisitadas na indústria alimentícia, na produção de detergentes, na indústria de papel, e na indústria têxtil. Apesar de seu uso ser bem difundido a compreensão da atuação destas enzimas ainda está nas fases iniciais. Por

conta de sua importancia para vários setores industriais, os estudos com enzimas celulolíticas aumentam cada vez mais.

As celulasas de uma forma geral têm sido estudadas desde a segunda guerra mundial, quando soldados americanos que estavam instalados no pacífico Sul, perceberam a deteriorização de seus objetos a base de algodão. Posteriormente como resultado de várias pesquisas lideradas pelo Dr. Reesei, foi isolado uma linhagem fungica identificada como *Trichoderma viride* que foi determinado como agente responsável por degradar materiais celulósicos (XU *et al.* 2007) de acordo com Castro e Pereira Jr. (2010) as contribuições científicas das pesquisas com celulasas tem aumentado de modo contínuo, envolvendo a prospecção de micro-organismo produtores destas enzimas, o melhoramento genético de espécies celulolíticas para aumentar a produção, a caracterização das enzimas do complexo, a demonstração do potencial industrial dessas enzimas, dentre outros.

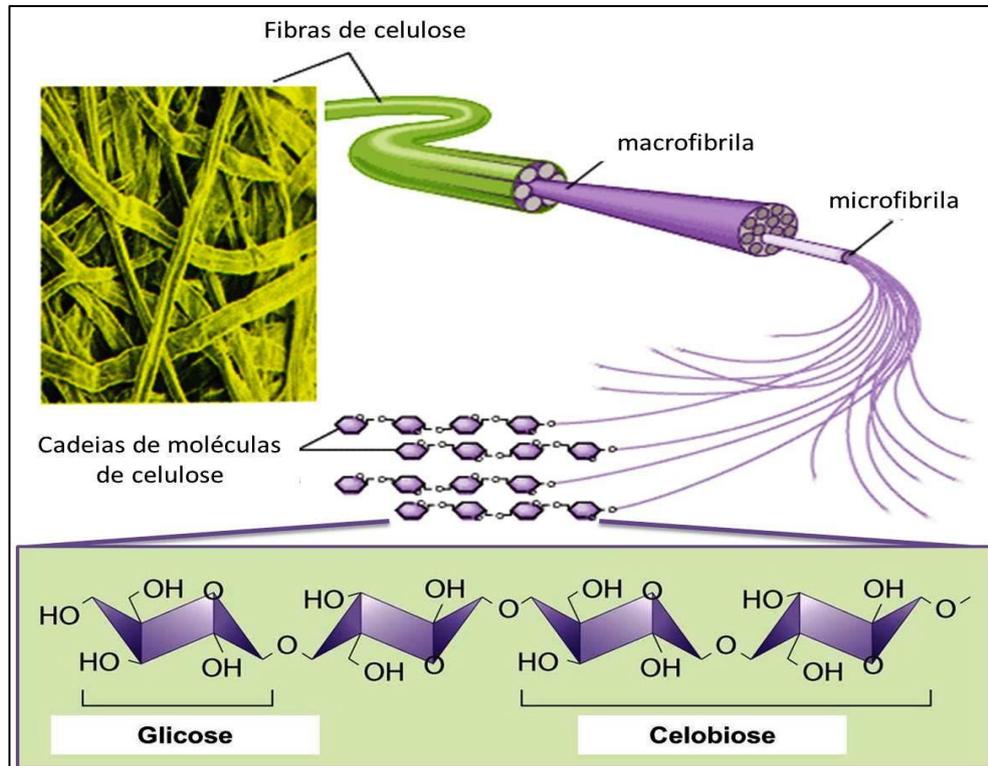
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Celulose

A celulose é o biopolímero mais abundante na terra, esse material é o principal constituinte de plantas, e está presente também em bactérias, fungos e algas (LYND *et al.* 2002). A molécula de celulose é um homopolímero linear não ramificado constituído por cerca de 10 a 15 mil unidades de glicose, cristalina, insolúvel em água e altamente resistente a despolimerização. As unidades de glicose na celulose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo ($\beta 1 \rightarrow 4$) (BECKHAM, 2011). Cadeias de celulose são agregadas paralelamente em estruturas cristalinas chamadas microfibrilas que formam as camadas de microfibrilas da fibra de celulose (FIG.01). As unidades monossacarídicas de D-glicose unidas por ligação $\beta 1 \rightarrow 4$ ao longo de cadeias da celulose cristalina apresentam giros de 180° uma em relação à outra, fazendo que o dissacarídeo (celobiose) seja uma unidade de repetição (HORN *et al.*, 2012).

A cristalinidade (FIG. 02) da celulose significa que ela apresenta uma estrutura organizada, onde as cadeias de celulose estão intimamente unidas entre si por uma rede de ligação de hidrogênio intra e inter-moleculares forte e altamente complexa (ZHOU; WU, 2012). A cristalinidade é uma característica bastante importante da celulose, pois a maneira em que as moléculas são encaixadas e unidas de tal forma faz com que a penetração de enzimas e até de pequenas moléculas como as da água fiquem impedidas (LYND, 2002). Porém embora essa seja a forma estrutural da celulose, ela não se encontra totalmente cristalinizada, ou seja, nas fibras de celulosas existem também regiões desordenadas chamadas de amorfas, e a presença dessa porção amorfa na fibra celulolítica faz com que ela seja susceptível à hidrólise (EICHHORN, 2011).

FIGURA 1 – Estrutura da cadeia de celulose na fibra celulósica

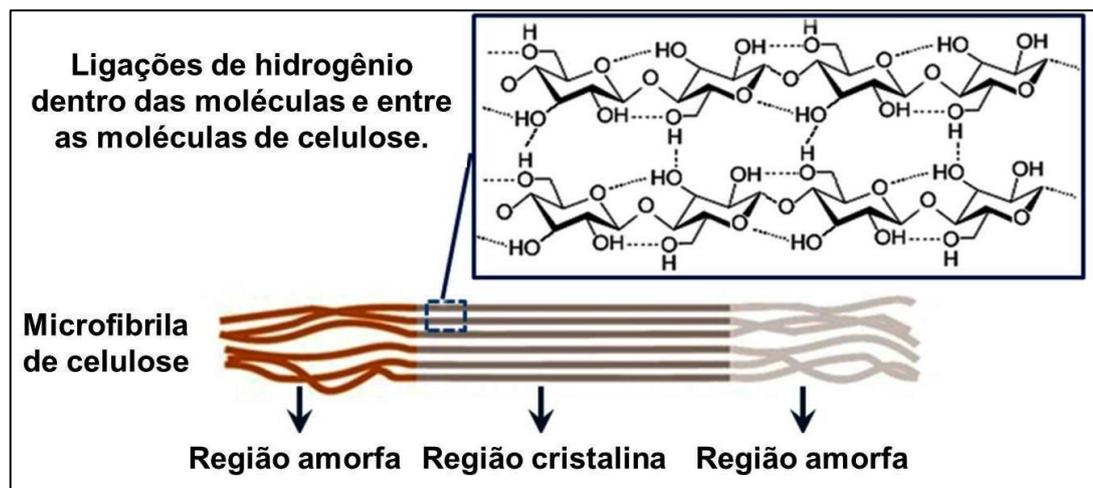


Fonte: U.S. Department of Energy Genomic Science program.

<<http://genomicscience.energy.gov>> Acesso em: 23 fevereiro 2014

(modificado).

FIGURA 2 – Representação da estrutura cristalina da fibra celulósica



Fonte: ZHOU e WU (2012)

2.2 Hidrólise enzimática da Celulose

O processo de hidrólise da celulose é catalisado por enzimas celulolíticas, que podem atuar em complexos denominados celulosomas que ocorrem em bactérias anaeróbicas ou de forma não complexadas como as celulasas de fungos e algumas bactérias aeróbicas (DEVAUX, 2005; SHOHAM, 1999; LYND, 2002). As celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalizadoras altamente específicas que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à sua possibilidade de conversão em etanol (LYND *et al*, 2002; TOLAN, 2002).

As enzimas celulolíticas hidrolisam as ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ entre as unidades monossacarídicas de D-glicose da cadeia de celulose (LEHNINGER, 1988). A degradação enzimática definitiva da celulose gera a glicose que é matéria prima de fermentação para a produção de etanol, essa conversão bioquímica da biomassa celulolítica preserva as estruturas de carbono originais sob a forma de açúcares monoméricos ao contrário da conversão termoquímica da biomassa, que leva a destruição dos hidratos de carbono, logo, a tecnologia enzimática é considerada a mais sustentável para a sacarificação (HORN *et al*, 2012).

O primeiro passo para a hidrólise enzimática da celulose consiste na ligação das enzimas na superfície da celulose, seguido da biodegradação de celulose à açúcares fermentáveis e depois a liberação das enzimas (SUN *et al*, 2002). Em vista desse mecanismo de ação das celulasas muitos autores tem definido que uma etapa importante para a hidrólise da celulose é o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. De acordo com Wyman e colaboradores (2005), para se converter celulose enzimaticamente à glicose inicialmente é necessário que a biomassa celulósica passe por um pré-tratamento para a abrir a estrutura da biomassa permitindo assim o acesso das celulasas. Esse processo de pré-tratamento pode ser físico, químico ou com ambos, desestruturando as fibras de celulose e permitindo que a superfície plana da celulose fique exposta ao ataque das enzimas hidrolíticas. Canilha (2010) reporta que as melhores estratégias para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos são as que combinam princípios físicos e químicos.

Em estudo sobre a eficácia de celulases na hidrólise de substratos lignocelulósicos Arantes e demais autores (2011), obtiveram taxas mais elevadas de hidrólise em substratos celulolíticos que passaram por pré-tratamento do que aqueles que não passaram por este processo. Os autores sugeriram que o fato de haver hidrólise, ainda que pequena, no material que não sofreu pré-tratamento, ocorre porque algumas enzimas celulolíticas são capazes de se ligarem nas regiões amorfas (áreas da fibra lignocelulósica que não são cristalinas, onde a celulose encontra-se exposta). Estas regiões são de tamanho suficiente para acomodar as enzimas, e estas começam a fragmentação das fibras de celulose antes que ocorra a hidrólise significativa. E o fato de que a estrutura lignocelulósica pré-tratada (possui celulose mais exposta) necessitar de menores quantidades de enzimas para atingir níveis de hidrólise elevados, sugere que o passo limitante da velocidade de reação durante a hidrólise pode não ser a clivagem das cadeias de celulose em si, mas sim, a acessibilidade limitada das enzimas às cadeias de celulose dentro da matriz do substrato.

A hidrólise da celulose com utilização de enzimas celulolíticas ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH e apresenta elevada especificidade, eliminando a chance de ocorrência de substâncias (derivados de lignina) as quais são tóxicas para as células microbianas que serão utilizadas na fermentação do meio hidrolisado. (CASTRO, 2010).

2.3 Celulases

De acordo com a nomenclatura de enzimas EC (*Enzyme Commission Numbers*), as celulases estão classificadas dentro do grupo das glicosil hidrolases (EC 3.2.1. -) pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB). As principais famílias de celulases descritas no banco de dados de enzimas e carboidratos ativos (Carbohydrate-Active Enzymes Database – CAZY) estão relacionadas na TAB.01. As enzimas responsáveis pela degradação enzimática da celulose em glicose estão distribuídas em três classes distintas. Estas agem em conjunto e são classificadas de acordo com o local em que atuam na fibra de celulose, em endoglicanases, exoglicanases e beta-glicosidases.

TABELA 1 – Famílias de celulasas e números EC

EC	Reação	Outros nomes	Família
E.C.3.2.1.4 celulase	Endo hidrólise de ligações 1,4-beta-D-glicosídica na celulose, e cereais beta-D-glucanos.	Endoglucanase; Endo-1,4-beta- glicanase; Carboximetilcelulase; Endo-1,4-beta-D-glicanase. Beta-1,4-glicanase. Beta-1,4-endoglicano hidrolase.	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 45, 48 51, 61, 74
E.C.3.2.1.6 Endo-1,3(4)- betaglicanase.	Endo hidrólise de 1,3- ou 1,4-ligações em beta-D-glucanos	Endo-1,4-beta-glucanase. Endo-1,3-beta-glucanase	16
E.C.3.2.1.91 Cellulose 1,4- betacelobiosidase	hidrólise de ligações 1,4-beta-D- glucosídicas libertando celobiose a partir das extremidades não redutoras das cadeias.	Exoglicanase. Exocelobiohidrolase. 1,4-beta-celobiohidrolase	5, 6, 7, 9, 10, 48,
E.C.3.2.1.21 β -glicosidase Beta-glicosidase	Hidrolise de resíduos beta-D-glicose com a libertação de beta-D- glicose	Gentobiase; Celobiase; p-nitrofenil β -glicosidase	1, 3, 9
E.C. 3.2.1.74 Glucano1,4- β - glicosidase	A hidrólise de ligações (1 \rightarrow 4) em (1 \rightarrow 4)- β -D- glicanos, para remover sucessivas unidades de glicose.	Exo-1,4- β -glicosidase; Exocelulase; celodextrinases	1, 3, 5, 9

Fonte: LOMBARD V. *et al*, 2013 - Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZY) – retirado de <<http://www.cazy.org>> Acesso: 14 junho 2013; Xu *et al*. 2011 (modificado)

2.3.1 Endoglicanases

As endoglicanases iniciam a hidrólise da celulose agindo nas regiões amorfas, ou seja, acessíveis da fibra celulósica. Elas Quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose, liberando oligossacarídeos de diversos tamanhos com terminais redutores e não redutores (LYND, 2002; XU *et al.*, 2007).

As endoglicanases atuam de forma aleatória em substratos solúveis e insolúveis. Em ensaios enzimológicos para detecção de atividade endoglicanásica, geralmente são utilizados como substrato da enzima, os derivados de celulose solúvel em água, tais como o CMC (carboximetilcelulose), pois o mesmo possui uma proporção menor de terminais redutores e menor fração acessível a beta-glicosidases. A atividade enzimática pode ser determinada medindo-se os açúcares redutores liberados da hidrólise de CMC (ZHANG *et al.* 2009).

2.3.2 Exoglicanases

As exoglicanases agem nos terminais redutores da fibra celulósica e sobre os novos terminais gerados pelas endoglicanases. As mais reportadas na literatura são as celobiohidrolases (CBH). Estas são distinguidas em dois tipos: as CBH I (enzimas do tipo I), que hidrolisam terminais redutores e as enzimas do tipo II, as CBH II que hidrolisam terminais não redutores, ambas produzem a celobiose (dímero de glicose) como produto de reação (LYND, 2002).

De acordo com Zhang e colaboradores (2006) não existem substratos específicos para as exoglicanases nos ensaios de atividade enzimática conhecidos. Portanto, a mensuração da atividade de exoglicanases em um preparado enzimático pode ser dificultada. No entanto, a celulose microcristalina Avicel, é um bom substrato para ensaios de atividade exoglicanásica, por conter uma maior proporção de terminais redutores do que os outros substratos celulósicos insolúveis como o CMC (Zhang *et al.*, 2009). Por conta disso, muitos pesquisadores consideram que a atividade avicelase, ou seja, a atividade sobre a celulose microcristalina, pode ser considerada como equivalente à atividade de exoglicanase (WOOD; BHAT, 1988).

2.3.3 Beta-glicosidases

As Beta-glicosidases são responsáveis por completar a hidrólise da celulose, elas possuem propriedade de liberar D-glicose a partir de unidades dos produtos de reação liberados pelas exoglicanases, como celobiose, celodextrinas e outros oligossacarídeos solúveis com menos de sete unidades monoméricas. Elas atuam clivando as ligações β -1,4 glicosídicas destes componentes (LYND, 2002; XU *et al*, 2007).

A atividade beta-glicosidásica pode ser medida através de ensaios utilizando como substratos enzimáticos a celobiose, e o substrato cromogênico p-nitrophenyl. (ZHANG *et al*, 2009). Conforme Singhanian e demais autores (2013) a beta-glicosidase é uma enzima chave envolvida na produção de etanol a partir da biomassa, e no cenário atual a sua utilização comercialmente ainda é limitada devido a vários desafios tecnológicos, que incluem a taxa de degradação enzimática lenta e o processo de inibição que a enzima sofre pelo seu produto.

2.4 Sinergismo das celulases

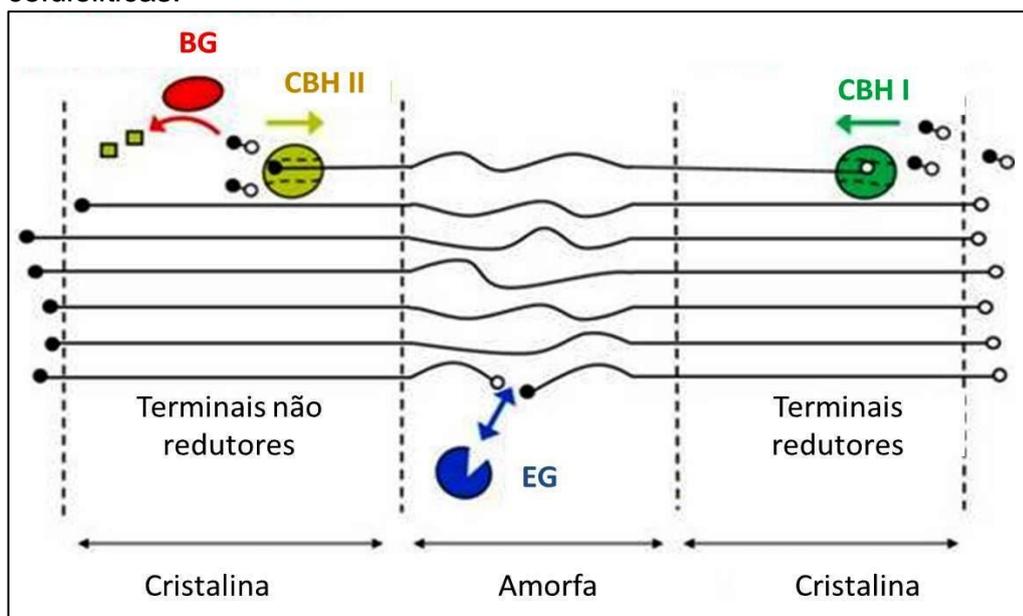
A eficiência da hidrólise enzimática da celulose está ligada com sua atuação em conjunto. As celulases tem um rendimento maior quando atuam juntas do que quando agem isoladamente, essa ação conjunta é chamada de sinergismo (GAN *et al*, 2003). A ação sinérgica das celulases tem sido alvo de muitos estudos a fim de que se possa entender melhor o modo de ação dessas enzimas. Os tipos de sinergismo das enzimas celulolíticas mais reportados são: endo-exo, exo-exo, exo-BG e Endo-BG (FIG. 3).

O sinergismo endo-exo, é conceituado pela ação das endoglicanases nas regiões amorfas da fibra celulósica gerando terminais redutores (com carbonila livre) e não redutores (sem carbonila livre) os substratos de ação para as exoglicanases, de um modo geral, as endoglicanases produzem cortes nos filamentos de celulose e as

extremidades livres geradas são direcionadas para as exoglicanases (HENRISSAT, 1994; JALAK, 2012).

O sinergismo exo-exo, caracterizado pela ação simultânea de duas exoglicanases, conhecidas como celobiohidrolases (CBH I e CBH II), nos terminais redutores e não redutores liberados pelas endoglicanases, ou seja, as CBH I atuando nos terminais redutores e as CBH II nos terminais não redutores (XU *et al*, 2007). O sinergismo exo-BG e endo-BG é demonstrado pela ação de beta-glicosidases sobre os produtos das exoglicanases e endoglicanases, que são celobiose e outros oligossacarídeos respectivamente, os quais servem como substrato para a beta-glicosidase (CASTRO, 2010).

FIGURA 3 - Representação esquemática da atuação sinérgica das enzimas celulolíticas.



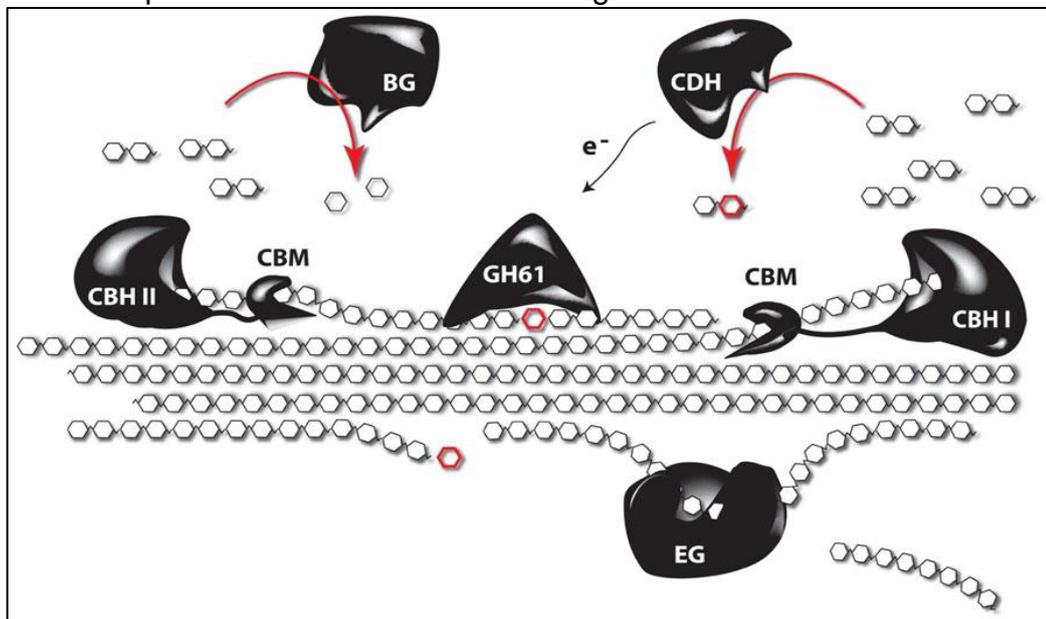
EG: endoglicanase, CBH I e CBH II: exoglicanases, BG: beta-glicosidase.

FONTE: retirado de <http://www.avt.rwth-aachen.de/AVT/index.php?id=888&L=1>. Adaptado. Acesso em 20 fevereiro 2014.

Outros tipos de sinergismo têm sido reportados na literatura (FIG. 04). Um novo tipo de enzimas produzidas por fungos, classificadas como GH61 que são estruturalmente semelhantes às proteínas CBM33. As CBM33 possuem a capacidade de potencializar hidrólise de quitina por quitinases e são comuns em

bactérias e vírus, mas raras em eucariotos (MOSER *et al*, 2008), conforme descrito por Kolstad e cooperadores (2010) elas atuam clivando ligações glicosídicas da quitina, de forma oxidativa. Horn e colaboradores (2012) por sua vez, descrevem que as GH61 de fungos atuam sinérgicamente com celulases promovendo a eficiência de enzimas celulolíticas agindo sobre as superfícies da celulose cristalina promovendo quebras de cadeia nas cadeias de polissacarídeos através da clivagem oxidativa.

FIGURA 4 – Representação esquemática da visão atual da degradação da celulose por enzimas celulolíticas de fungos.



EG: endoglucanase, CBH I e II: celobiose hidrolases, CDH celobiose-desidrogenase, GH61: glicosilhidrolase 61.

FONTE: Vanholme *et al.* (2013)

2.5 Micro-organismos celulolíticos

As enzimas celulolíticas são produzidas por diversos micro-organismos incluindo fungos e bactérias anaeróbicas e aeróbicas e alguns actinomicetes. Devido ao seu metabolismo primário, estes micro-organismos utilizam materiais lignocelulósicos como fonte de glicose, por conta disso, eles produzem enzimas capazes de degradar a celulose utilizando-as para este fim (SINGH; HAYASHI, 1995; LYND *et al*, 2002). Dentre os micro-organismos produtores de celulase

destacam-se os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Entre as bactérias, as mais reportadas como produtoras de celulases estão as pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Cellulomonas* e vários *Bacillus*. E *Thermomonospora fusca* é um representante de actinomicetes produtor de celulases (KUHAD *et al*, 2011) O primeiro micro-organismo utilizado na produção industrial de celulases foi o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* e ainda hoje é a fonte mais utilizada. Ele produz duas exoglicanases, cinco endoglicanases e duas beta-glicosidades (OGEDA; PETRI, 2010).

Os fungos são considerados os melhores produtores de enzimas celulolíticas por produzirem naturalmente as celulases necessárias para a sacarificação completa de lignocelulose (SCHUSTER; SCHMOLL, 2010). O desempenho dos fungos na produção de celulases e secreção de enzimas complexas pode ser devido ao seu sistema de secreção eficiente, o qual as bactérias não possuem, o que as torna difíceis ou inviáveis para serem projetadas na produção de enzimas celulolíticas em grandes quantidades (AMOREA; FARACO, 2012).

2.6 O gênero *Penicillium* e espécies produtores de enzimas celulolíticas

O gênero *Penicillium* compreende um grupo de fungos comumente encontrados no solo, e como decompositores de vários tipos de materiais orgânicos (SAMSON; PITT, 2000). São classificados taxonomicamente em: reino Fungi; filo Ascomycota; subfilo Pezizomycotina; classe Eurotiomycetes; subclasse Eurotiomycetidae; ordem Eurotiales e família Trichocomaceae (ROBERT *et al*, 2013).

Várias espécies de *Penicillium* são importantes produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais têm sido desenvolvidos em antibióticos e outros produtos farmacêuticos. Uma das espécies mais conhecidas é o histórico *Penicillium chrysogenum* que tem sido utilizado comercialmente para a produção de penicilina por mais de 50 anos (ROYERA *et al*, 2004). A diferenciação morfológica de muitas espécies de *Penicillium* é frequentemente associada com a diferenciação bioquímica que leva à produção destes metabólitos secundários (MOSS, 1987; ROBERT *et al*, 2013).

Em relação à produção de enzimas celulolíticas, uma série de estudos vem sendo realizados com fungos do gênero *Penicillium*, onde se tem avaliado ótimos desempenhos na produção de enzimas de caráter celulolítico. Em um “*screening*” de fungos do gênero *Penicillium* produtores de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, Krogh e colaboradores (2004), analisaram 12 espécies de fungos desse gênero isolados de lugares como solo, frutas e sementes de soja e encontram várias espécies produtoras destas enzimas, dentre as quais se destacou o fungo *Penicillium brasilianum*, com atividades em papel de filtro (Fpase), endoglicanases, exoglicanases e beta-glicosidases mais elevadas do que a espécie *T. reesei* Rut C30 utilizada como controle.

Outra espécie de *Penicillium*, *P. echinulatum* foi investigada quanto à produção de celulases por Martins e cooperadores (2008) e comprovaram que *P. echinulatum* é um potencial produtor de celulase. Ao comparar as atividades enzimáticas de suas celulases com as de *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L FG®, Novozymes) verificaram que ambos os complexos enzimáticos obtiveram atividades de celulases totais celulase e xilanase similares. Dentro da grande variedade de espécies de fungos do gênero *Penicillium* utilizados para a produção de celulases encontram-se também *Penicillium funiculosum*, estudado por Maeda e co-autores (2013) com a produção elevada de endoglicanases e beta-glicosidases, na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Marjamaa e cooperadores (2013) avaliaram os sistemas celulolíticos de duas novas cepas de *Penicillium*, *P. pulvillorum* TUB F-2220 e *P. simplicissimum* TUB F-2378, os autores indicaram que ambas as linhagens secretam alto nível das atividades de celulases e que as atividades específicas para o tipo selvagem *P. pulvillorum* TUB F-2220 são aproximadamente duas vezes mais elevadas em comparação com *T. reesei* RUT C30.

2.7 A espécie *Penicillium citrinum*

A espécie *P. citrinum* foi descrita por Thom e Raper (1949) como uma espécie com características de crescimento com aparência de couro, de coloração verde azul, e reverso normalmente amarelo para laranja, com produção de conídios globosos a subglobosos de hialino a esverdeado. São muito comuns no solo, em cereais e especiarias tropicais, e já foram isolados de raízes, caule e folhas de plantas de café, e também ocorrem em ambientes internos (POSADA *et al*, 2007). De acordo com Houbraken e cooperadores (2011), a distribuição das espécies parece estar relacionada com o clima. *P. citrinum* é mais comum em solos tropicais e menos frequente em solos de regiões de clima temperado. Os membros desta espécie também são conhecidos por produzirem a micotoxina citrinina, que é um composto nefrotóxico (SAMSON *et al*, 2004). O papel da produção deste metabólito por *P. citrinum* permanece em grande parte desconhecido (HOUBRAKEN *et al*, 2010).

P. citrinum, assim como diversas outras espécies de *Penicillium*, tem sido estudado quanto a sua capacidade de produção de enzimas de interesse biotecnológico, como celulasas, no entanto, os trabalhos voltados a esta questão ainda são escassos na literatura. Em um relato mais antigo, Olutiola (1976) descreveu a liberação de um complexo de enzimas celulolíticas por *Penicillium citrinum*, durante o crescimento deste fungo em um meio líquido com fonte de carbono celulósica. O autor relata que após separar o complexo enzimático através da filtração em gel e cromatografia de troca iônica, obteve um componente com caráter de enzima celulolítica. Mais recentemente, Tanaka e colaboradores (2005) purificaram uma enzima ligada à degradação da biomassa, a endo-xilanase, a partir do filtrado de culturas do fungo *P. citrinum* crescidas em xilano de madeira.

Uma estirpe de *P. citrinum* isolado do solo, cultivado em cultura submersa e em estado sólido tendo farelo de trigo como fonte de carbono, produziram duas enzimas celulolíticas termoestáveis e tolerantes à alcalinidade, estas, foram descritas e caracterizadas por Dutta e demais autores (2008). A partir de uma triagem e isolamento de fungos filamentosos oriundos de resíduos lignocelulósicos, Rathnan e cooperadores (2012) encontraram uma estirpe de *Penicillium citrinum* potente na produção de celulasas.

2.8 Aplicações industriais das celulasas

As celulasas estão entre as enzimas com maior importância industrial, e são produzidas comercialmente por diversas indústrias a nível mundial, na TAB. 02 encontram-se descritas suas principais aplicações. Segundo Wilson (2009) enzimas celulolíticas fazem parte das enzimas comerciais com maiores geração de lucros, devido o seu uso no processamento de algodão, reciclagem de papel, em detergentes, na extração se sucos, e como aditivos na alimentação animal.

As principais aplicações industriais de celulasas estão na indústria têxtil, onde elas são utilizadas para o bio-polimento de tecidos e em detergentes para roupas de uso doméstico e para melhorar a suavidade e o brilho de tecidos (CAVAVO, 1998). De acordo com Miettinen-Oinonen (2007) o uso de celulasas e enzimas em geral na indústria têxtil oferece uma variedade de vantagens: as enzimas são fáceis de utilizar e os tratamentos podem ser adaptados para funcionar em diferentes estágios dos processos têxteis; permitem o emprego de condições suaves de tratamento (temperatura e pH); enzimas são biodegradáveis e não se acumulam no ambiente; o uso de enzimas como celulasas economizam produtos químicos e energia, e podem reduzir o tempo de processamento.

Considerando o amplo uso das enzimas celulolíticas, e somando-se ao advento crescente da necessidade de substituição de combustíveis fósseis por renováveis, as celulasas irão tornar-se as enzimas de maior valor comercial, se o etanol, butanol ou qualquer outro produto de fermentação de açúcares, produzidos por enzimas a partir da biomassa, se tornar o principal combustível de transportes (BALSAN *et al*, 2012). Diante da demanda atual de utilização da biomassa para produção de biocombustíveis, a aplicação de celulasas na hidrólise de materiais lignocelulósicos tem sido bastante requerida. Dentro deste contexto, a perspectiva da demanda por enzimas celulolíticas cresce cada vez mais a cada desenvolvimento de processos industriais de sacarificação para produção de etanol. Mohanram e demais autores (2013) descrevem que atualmente a otimização dos processos de conversão de polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis, envolvem a utilização de coquetéis enzimáticos que permitam maior rentabilidade a custos reduzidos, e dentro deste contexto, a utilização diversificada de celulasas permite a adaptação desses coquetéis.

TABELA 2 - Aplicações de enzimas celulolíticas em diversos setores industriais

Setores industriais	Aplicações
Agricultura	Controle de doenças e patógenos de plantas, melhoramento da germinação, maior crescimento e florescimento da planta, melhoramento da qualidade do solo, redução da dependência de fertilizantes minerais.
Bioconversão Pecuária	Conversão de materiais celulósicos em etanol, outros solventes, ácidos orgânicos, lipídios, produção de alimentos ricos em energia para animais, melhoramento da qualidade nutricional de alimento de animais; melhora o desempenho de ruminantes; melhora da digestão e absorção alimentar.
Detergentes	Detergentes à base de celulases com ação de limpeza superior sem danificar as fibras; melhora o brilho da cor e a remoção de sujeira; remove protuberâncias ásperas em tecidos de algodão.
Fermentação	Melhoria na prensagem e extração da cor de uvas, melhoria do aroma de vinhos, melhoria na fermentação primária e qualidade da cerveja, melhora na taxa de filtração e estabilidade do vinho.
Alimentação	Melhoria de rendimentos na extração de amido e proteínas; melhoria na maceração e extração de cores de frutas e legumes; clarificação de sucos de frutas; melhoria da textura e qualidade dos produtos de padaria; melhora na viscosidade de purês de frutas; melhoria da textura, sabor, aroma e propriedades voláteis de frutas e verduras; controle do sabor amargo de frutas cítricas.
Polpa de celulose e papel	Co-aditivo no branqueamento de celulose; consumo de energia e cloro reduzido, melhoramento do brilho da fibra, propriedades de resistência e grau de refinação de celulose e limpeza; melhoramento da drenagem em fábricas de papel, produção de papelão biodegradáveis, toalhas de papel e papel higiênico.
Têxtil	Biolapidação de jeans; biopolimento de fibras têxteis; melhora da qualidade de tecidos; suavização de peças de vestuário; remoção do excesso de corantes dos tecidos; restauração do brilho da cor.
Outros	Melhora a extração de carotenoides; melhora a oxidação e a estabilidade da cor de carotenoides; melhora a extração de óleo de oliva; melhora da qualidade do azeite; redução dos riscos de resíduos de biomassa; produção de moléculas híbridas.

FONTE: Kuhad *et al*, 2011 (adaptado)

3. JUSTIFICATIVA

As enzimas celulolíticas de origem microbiana possuem uma vasta aplicação industrial como, por exemplo, nas indústrias têxtil, de papel, detergentes, de processamento de alimentos, além de outros bioprocessos em geral. Um dos setores que mais tem motivado as pesquisas com celulases tem a sido indústria do bioetanol, pois devido à necessidade de obtenção de combustíveis oriundos de fontes renováveis, os aspectos biológicos do processamento da biomassa celulósica tem se tornado o centro das pesquisas. Portanto, o desenvolvimento de processos eficientes e a obtenção de novas fontes de enzimas, tem como fim, aumentar a produção a baixos custos, da maneira mais sustentável possível.

Neste contexto, espécies de fungos filamentosos do gênero *Penicillium* tem se destacado como ótimos produtores de celulases, em estudos que demonstram a produção de endoglicanases, exoglicanases e beta-glicosidases por estes micro-organismos. *Penicillium citrinum*, espécie abundante em solos tropicais, já foi indicado como produtor de enzimas celulolíticas, e, portanto, promissor para os processos que dependem de biocatálise. A caracterização do funcionamento destas enzimas é um passo importante para suas utilizações futuras, visto que esta etapa fornece informações relevantes tanto para estudos posteriores quanto para a aplicação industrial, pois permite conhecer aspectos particulares da enzima e fatores que influenciam na sua atividade.

Diante do exposto, frente à demanda de obtenção de novas enzimas celulolíticas para bioindústrias, o desenvolvimento de trabalhos técnico-científicos que descortinem novos horizontes na utilização desses biocatalizadores é fundamental para o Brasil. Existem poucos dados em literatura com relação a *P. citrinum*, o qual é comumente encontrado em solos tropicais como os da Amazônia; a determinação das atividades enzimáticas e a caracterização das enzimas celulolíticas produzidas por este fungo filamentoso é oportuna, tendo em vista o contexto mencionado. Neste intuito, visou-se contribuir para os processos biocatalíticos, obtendo-se novos dados de enzimas secretadas por um micro-organismo da biodiversidade brasileira.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Caracterizar as enzimas celulolíticas produzidas pelo fungo filamentosso *Penicillium citrinum*.

4.2 Específicos

1. Determinar as atividades enzimáticas de ceulases totais (FPase), endoglicanases (CMCase), exoglicanases (Avicelase) e beta-glicosidases produzidas por *P. citrinum*.
2. Determinar as atividades específicas de celulases totais, endoglicanases , exoglicanases e beta-glicosidases.
3. Comparar a produção enzimática de *P. citrinum* com a estirpe comercial *Trichoderma reesei* QM 9414, nas mesmas condições.
4. Determinar a temperatura e pH ótimos das atividades enzimáticas de endoglicanases e beta-glicosidases no extrato enzimático bruto.
5. Avaliar a estabilidade térmica de endoglicanases e beta-glicosidases no extrato enzimático bruto.
6. Inferir a massa molecular aproximada de endoglicanases e beta-glicosidases produzidas por *P. citrinum*

5. METODOLOGIA

5.1 Micro-organismos

O fungo filamentoso utilizado neste trabalho, *P. citrinum* foi isolado do Bagaço de cana-de-açúcar da Usina Jayoro S/A, por Carvalho (2006), e prospectado como micro-organismo produtor de celulases por Silva (2008), (dados não publicados). O micro-organismo encontrava-se armazenado de acordo com o método de Castellani (1939), e em perfeitas condições no Laboratório de Fermentação do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas.

A fim de se comparar a produção de enzimas celulolíticas com uma espécie descrita na literatura como excelente produtor de celulases, utilizou-se a estirpe *Trichodema reesei* QM 9414, adquirido na Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas-SP), o micro-organismo foi enviado em forma de cultura liofilizada.

5.2 Reativação de *Penicillium citrinum* e *Trichodema reesei* QM 9414

O fungo *Penicillium citrinum*, foi reativado a partir das amostras preservadas em água destilada. Foi retirada uma alíquota do preservado contendo esporos, e inoculado com auxílio de alça de drigalski em placas de petri com o meio Batata-dextrose- ágar (BDA) (TAB.03) e incubados a 28°C por 7 dias. Com o objetivo de observar a forma de crescimento e aspectos morfológicos foi retirado um bloco de ágar do preservado e semeado no centro de placas de petri contendo o meio BDA e incubados a 28°C para crescimento. A estirpe comercial *T reesei* QM9414, foi reativada seguindo-se instruções do fornecedor. O liofilizado foi hidratado por 30 minutos e o conteúdo foi vertido sobre a superfície do meio sólido BDA.

TABELA 3 - Composição do meio BDA

Componentes	Concentração g/L
Batata	200
Glicose	20
Agar	15

5.3 Manutenção dos micro-organismos

Para manutenção das linhagens fungicas *T. reesei* QM9414 e *P. citrinum*, foram feitos repiques regulares, em meio BDA sólido em placas de petri, além de serem mantidas preservadas em frascos contendo água destilada estéril (CASTELLANI, 1939). Periodicamente eram feitas observação das hifas e estruturas de frutificação, através da visualização de laminas de raspagem em microscópio óptico. Todos os procedimentos de reativação dos fungos filamentosos, e de repiques foram feitos levando-se em consideração os cuidados necessários para se evitar contaminações, utilizando sempre material estéril e/ou flambado e câmara de fluxo laminar.

5.4 Identificação Molecular

5.4.1 Extração de DNA do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*

O micro-organismo foi inoculado em meio rico apropriado (TAB. 2) para crescimento. Após, procedeu-se à extração de DNA total seguindo a metodologia descrita por Płaza e colaboradores (2004). Uma pequena quantidade de micélio foi adicionada a microtubos contendo microesferas de vidro (*beads*) de 0,5mm seguido da adição de Tris-HCL 10mM; pH 8,0 e EDTA 1mM. Os tubos foram levados ao disruptor de células por *beads* Mini-Beadbeater™, e depois foi adicionado SDS10%

e proteinase K. Em seguida agitou-se os tubos por inversão e incubou-se por 30 minutos a 55°C. Após, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi passado para outro tubo e adicionado a ele, acetado de potássio 5M e incubado a -20 °C por 30 minutos. Depois desse período amostras foram agitadas vigorosamente e coletado o sobrenadante para outro tubo, ao qual foi adicionado isopropanol e continuado a -20°C por mais 30 minutos. Então se procedendo à etapa de precipitação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 1X com etanol 70%, centrifugado, deixado secar, e posteriormente ressuspendido em 50 µL de TE-RNase pH7,0.

5.4.2 Amplificação e sequenciamento da região do gene 28S rDNA

Foram utilizados os primers universais específicos de fungos NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG) para amplificação da região D1-D2 da subunidade maior (28S) do gene de rDNA.

A amplificação por PCR foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems), em um volume de reação total de 25µL composto de: tampão da Taq.polimerase 1X; MgCl₂ 1,5mM; dNTPs 0,2 mM (de cada um), 0,4mM de cada iniciador (ITS1/ITS4) ou (D1/D2), 5µL de DNA (produto da extração), 0,13µL (5U/µL⁻¹) de Taq DNA polimerase e H₂O mili-Q q.s.p. 25µL. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos de: desnaturação (95°C 30s), anelamento (59°C 30 s) e extensão (72°C 30 s) e extensão final a 72°C por 10 min.

O produto da amplificação foi sequenciado utilizando o sequenciador automático de DNA, modelo ABI 3130 xL (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi preparada com um KIT BigDye Terminator (v3.1), e foi composta de 2 µL de BigDye Terminator, 5,5 µL do produto da PCR e 0,5 µL de iniciador. A reação foi colocada no termociclador Veriti (Applied Biosystems) em um programa de 40 ciclos de 95 °C 30 s, 50 °C 30 s e 60 °C por 2 minutos.

Após a reação de sequenciamento o material foi purificado, e o precipitado armazenado a -20°C. Posteriormente as amostra foram ressuspendidas em 10µL de formamida e submetidas ao sequenciamento automático. E em seguida as

sequencias obtidas foram analisadas pelo software Bioedit Sequence Aligmentet Editor® e depois através da ferramenta BLASTn (Zhang *et al*, 2000), as sequencias foram comparadas com os bancos de dados disponíveis no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.5 Produção de conídios e inóculos para fermentação submersa

A partir das linhagens reativadas os conídios foram transferidos para tubos de ensaio estéreis contendo 10 mL de meio BDA sólido inclinado, e incubados a 30°C para crescimento e esporulação por 7 dias, após este período, preparou-se uma suspensão com água destilada esterilizada e foi determinada a concentração de esporos em suspensão através da contagem dos mesmos em câmara de Neubauer (ALFENAS; MAFIA, 2007). O volume de solução de conídios utilizada para inocular o meio de fermentação submersa foi de 1mL de solução com a concentração de $6,4 \times 10^6$ para *P. citrinum* e $6,0 \times 10^6$ para *T. reesei* QM9414.

5.6 Meio Indutor para produção de Enzimas celulolíticas

Para a produção de celulasas foi utilizado o meio de cultura de fermentação submersa (FS) baseado no descrito por Szijártó e colaboradores (2004) a composição do meio está descrito na TAB. 4. Após o preparo, o pH do meio foi ajustado para 5,0 e em seguida foi esterilizado a 1 atm por 15 min. Foram utilizados Elermeyers de 2L contendo 500 mL do meio de FS, em triplicatas, nos quais foram inoculados 1mL de solução de conídios com a concentração conforme descrito no item 5.5. Os frascos foram, incubados a 30°C sob agitação constante de 150rpm por 216 horas.

TABELA 4 - Composição do meio de fermentação submersa.

Componente	Concentração
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6 g/L
KH ₂ PO ₄	4,5g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,8 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,6 g/L
Peptona	1,8 g/L
Extrato de levedura	0,5 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10,0 mg/L
MnSO ₄ · 4H ₂ O	3,2 mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,8 mg/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	40,0 mg/L
Carboximetilcelulose	7,5g/L

Fonte: (SZIJÁRTÓ *et al*, 2004)

5.7 Ensaio Enzimáticos

Para realização dos ensaios enzimáticos foram retiradas alíquotas de 15 mL dos frascos de fermentação submersa de *P. citrinum* e *T. reesei* QM9414, nos intervalos de 24h, pelo período de 216h, essas alíquotas foram imediatamente centrifugadas por 5 minutos, 4.000 rpm a 5°C, e os sobrenadantes foram estocados a 4°C para as análises posteriores (GHOSE, 1987).

Para determinação das atividades enzimáticas foram utilizadas as metodologias padrão para medição de celulases de acordo com as determinações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) descritas por Ghose, (1987). Os ensaios foram realizados em triplicata e baseados na quantificação dos açúcares redutores liberados nas hidrólises dos substratos (papel de filtro, CMC, Avicel), através do método DNS (MILLER, 1959), que consiste na capacidade de aldoses e cetoses com hidroxilas livres em reduzir uma solução alcalina de ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, formando assim um composto de

coloração escura, a leitura em espectrofotômetro foi feita a 540 nm. Com exceção do ensaio de beta-glicosidase, onde foi quantificado a liberação de glicose como produto da reação do extrato enzimático sobre o substrato celobiose, utilizou-se um KIT comercial baseado a reação da glicose oxidase (GOD) onde, na presença de glicose oxidase ocorre a oxidação enzimática da glicose formando o peróxido de hidrogênio o qual reage sob catálise de peroxidase com fenol e 4-aminofenazona originando quinoneimina que é um cromógeno vermelho-violeta, a leitura da absorbância foi feita 500 nm .

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos foram medidos em U (unidade de atividade). De acordo com Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por ml de caldo por minuto, ou seja, $U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$. A atividade enzimática em U/ml foi calculada, utilizando-se as equações para cada atividade enzimática definida pelas derivações de Ghose (1987).

A atividade específica (U/mg) foi obtida a partir dos valores de atividade enzimática em U/ml em razão da concentração de proteínas totais (mg/mL), obtida após a dosagem de proteínas. O cálculo de atividade específica foi utilizado para se estimar a porcentagem das proteínas correspondentes às enzimas celulolíticas do total de proteínas extracelulares produzidas por *P.citrinum* e *T. reesei* QM9414. De acordo com a fórmula abaixo:

Atividade específica:

$$U/mg = (U / ml)/(mg / ml)$$

Onde:

mg/mL = Concentração de proteínas totais.

U/mL = Atividade enzimática

5.7.1 Determinação de Atividade de celulases totais – Fpase

A atividade FPásica consiste na capacidade das celulases em hidrolisar tiras de papel de filtro (1X6 cm) ~ 50mg, a medição da atividade das enzimas sobre um substrato celulósico cristalino, o papel de filtro, avalia a ação sinérgica das enzimas celulolíticas, ou seja, as celulases totais: endoglicanases, exoglicanases e beta-glicosidases. Para a quantificação da atividade enzimática em papel de filtro, foi utilizada a metodologia de Ghose (1987).

Foi inserido uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 de 1x6 cm em tubos contendo 1mL de tampão citrato pH 4,8 e no mesmo adicionado 0,5 mL do extrato enzimático, foram investigadas pelo menos duas diluições que liberaram um pouco mais e um pouco menos que 2,0 mg (quantidade absoluta) de glicose e/ou açúcares redutores como a glicose nas condições da reação, os tubos foram incubados imediatamente a 50°C por 1 hora. Depois desse tempo, os tubos foram agitados em vortex e retirado 100 µL para outro tubo, adicionado 200 µL de reagente DNS, e incubado a 100°C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 1,5 ml de água e homogeneizado por inversão. A intensidade da cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm e registrado. O branco reacional foi constituído pela tira de papel de filtro e o tampão, e utilizado para zerar equipamento. Além do branco reacional foi feito também o branco da enzima que foi constituído de tampão e extrato enzimático, sem adição do substrato, os valores de absorbância destes foram subtraídos dos valores obtidos dos tubos de reação.

Para determinar a concentração de açúcares redutores liberados na reação foi utilizada a equação da reta padrão de glicose construída a partir de uma solução padrão na concentração de 10mg/mL, em seguida a atividade enzimática foi calculada utilizando a equação abaixo, onde [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 2mg de glicose (quantidade absoluta) durante o tempo de reação, e foi determinada por plotagem de duas diluições que liberaram um pouco mais e um pouco menos que a quantidade absoluta de glicose, através da representação gráfica da glicose liberada (mg/mL) em função da concentração de extrato enzimático.

$$\textit{Atividade (FPU)} = \frac{0,37}{[E] \textit{ para liberar 2.0mg de glicose}} \textit{ U/mL}$$

Obtenção de [E] a partir da diluição usada

$$\textit{Concentração} = \frac{1}{\textit{diluição}} \left(= \frac{\textit{volume de extrato enzimático utilizado}}{\textit{Volume total da diluição}} \right)$$

Nos casos em que não foi possível se obter a quantidade crítica de glicose liberada, mesmo que se tenha utilizado o extrato enzimático não diluído, neste caso foi calculado as atividades das quantidades de glicose (valores absolutos) liberada pela atuação enzimática conforme á fórmula abaixo:

$$\textit{FPU} = \textit{mg de glicose liberada} \times 0,185 \textit{ U/mL}$$

5.7.2 Determinação de Atividade endoglucanásica - CMCcase

A quantificação da atividade enzimática endoglucanásica foi realizada de acordo com Ghose, 1987. Com objetivo de utilizar quantidades reduzidas de amostras e reagentes, os ensaios de CMCcase foram realizados em uma escala microvolumétrica com redução da escala em 10X. Para a reação foram adicionados 50 µL de extrato enzimático diluído em tampão citrato pH 4,8, e 50 µL de solução de CMC 2% (m/v), em seguida foi incubado imediatamente a 50 °C por 30 min. decorrido esse tempo foi determinado a quantidade liberada de açúcares redutores totais pelo método do DNS adicionando-se 300 µL de reagente de DNS, e de incubado a 100 °C por 5 min, após completar o volume com água destilada e homogeneizar foi feito o registro da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, o equipamento foi zerado com o branco reacional, obtido nas mesmas condições da amostra, sendo que durante a reação a 50 °C no tubo havia somente a solução de CMC em tampão, brancos de enzima contendo o extrato enzimático em tampão

foram reagidos com DNS e os valores obtidos das Absorbâncias foram subtraídos dos valores das reações apropriadas.

Calculou-se a concentração de glicose decorrente da reação, através da equação da reta padrão previamente elaborada nas mesmas condições das amostras e depois procedeu-se ao cálculo da atividade enzimática de endoglucanases utilizando a equação abaixo, onde [E] é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 0,5mg de glicose durante o tempo de reação, que foi determinada através da representação gráfica da glicose liberada em função da concentração de enzima. Para obtenção da [E] seguiu-se os passos mostrados no item 5.7.1.

$$Atividade (CMC) = \frac{0,185}{[E] \text{ para liberar } 0,5 \text{ mg de glicose}_{\text{diluição crítica}}} U/mL$$

Para valores de glicose liberada encontrados abaixo de 0,5mg de glicose no tempo de reação, mesmo tendo utilizado o extrato enzimático não diluído, a atividade endoglucanásica foi calculada conforme equação abaixo:

$$Atividade (CMC) = \text{mg de glicose liberada} \times 0,37 U/mL$$

5.7.3 Determinação de Atividade de exoglucanase (avicelase)

Para a determinação de atividade avicelase foi utilizado a metodologia descrita por Zhang e colaboradores (2009). Foi utilizado Avicel 1,25% em tampão citrato de sódio 50 mM; pH 4,8. Em 1,6 ml da solução de Avicel foi adicionado 0,4 ml de extrato enzimático, a solução foi incubada a 50°C por 2 horas, após esse tempo a reação foi parada por submersão dos tubos em banho-maria gelado. Em seguida retirou-se 1ml dessa solução para novos tubos e procedeu-se com quantificação de açúcares redutores pelo método DNS, utilizou-se 300 µL e após a reação completou-se o volume para 2mL com água destilada, em seguida foi feita a leitura da absorbância a 540 nm. O branco da reação foi feito nas mesmas condições da

amostra e continha apenas tampão citrato de sódio e a suspensão de Avicel. A atividade exoglinásica foi calculada de acordo com a fórmula abaixo (Basso, 2010). Onde uma unidade de atividade exoglicanásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto a partir de Avicel.

$$\text{Atividade} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{concentração de açúcares (g/L)} \times 10^6}{180} \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{t(\text{min})} \times \frac{Vt(\text{mL})}{Ve(\text{mL})} \times Fd$$

Onde:

t = tempo de reação

Vt = volume total do meio reacional

Ve = volume de enzima empregado no ensaio

Fd = fator de diluição do extrato enzimático

180 = massa molar da glicose

5.7.4 Determinação de atividade beta-glicosidase

A atividade beta-glicosidase foi quantificada seguindo-se metodologia de Ghose (1987). Foi usado como substrato 50 μL de solução de celobiose a qual foi dissolvida em tampão citrato pH 4,8; essa solução de celobiose foi adicionada em microtubos tipo eppendorf de 2 mL contendo 50 μL de extrato enzimático diluído no mesmo tampão, depois de agitar em vórtex os tubos foram incubados a 50 °C por 30 min, decorrido a reação determinou-se a concentração de glicose liberada através de um KIT GOD seguindo-se instruções do fabricante. E depois precedeu-se à leitura da absorbância em espectrofotômetro a 500 nm, o branco foi utilizado para zerar o equipamento e foi composto de solução de celobiose em tampão.

A atividade enzimática beta-glicosidase foi calculada utilizando a equação abaixo, onde $[E]$ é a concentração expressa de acordo com a diluição de enzima adicionada necessária para liberar 1,0 mg de glicose durante o tempo de reação,

que foi determinada através da representação gráfica da glicose liberada em função da concentração de enzima:

$$\text{Atividade (Beta - glico)} = \frac{0,0926}{[E] \text{ para liberar } 1,0 \text{ mg de glicose}_{\text{diluição crítica}}} \text{ U/mL}$$

5.8 Quantificação de proteínas totais em solução

A quantificação de proteínas totais presentes em solução foi realizada através do método de Bradford (1976). Foi utilizado o Reagente Bradford (sigma-aldrich[®]) que é composto por corante *Coomassie blue*, Ácido fosfórico (H₃PO₄) e Metanol (CH₃OH). Esse método é baseado na ligação de proteínas ao corante *Coomassie blue* ocasionando uma mudança do comprimento de onda de máxima absorção do corante (de 465 para 595 nm), logo, a quantidade de proteínas em solução é proporcional à quantidade de absorção.

Para o ensaio de dosagem das proteínas foi adicionado 200 µl do reagente de Bradford em tubos estéreis contendo 50 µl de extrato enzimático e 750 µl de H₂O Mili -Q, a solução foi agitada e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e depois a cor formada foi quantificada em espectrofotômetro a 595 nm, o branco reacional foi obtido adicionando-se 200 µl do reagente de Bradford 800 µl de água destilada, e foi utilizado para zerar o equipamento.

As concentrações de proteínas foram calculadas em mg/mL a partir da equação da reta padrão de proteínas. Os valores obtidos de concentração de proteínas totais (mg/mL) foram utilizados para calcular a atividade específica (U/mg). A curva padrão de proteínas foi construída utilizando uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) na concentração 0,2 g/L, a partir da qual foram feitas diluições com H₂O Mili-Q para se obter 0,15mL (150µL) de solução final para cada concentração de BSA correspondente a um ponto na reta de acordo com a TAB. 5, esse volume de solução final foi utilizado para as réplicas na reação, seguindo-se os mesmos procedimentos das amostras.

TABELA 5 - Curva padrão de BSA

Padrão BSA (mL) (2mg/mL)	H ₂ O Mili -Q (mL)	Vol. Final (mL)	[BSA] mg
0	0,15	0,15	0,00
0,00075	0,14925	0,15	0,01
0,0015	0,1485	0,15	0,02
0,003	0,147	0,15	0,04
0,0045	0,1455	0,15	0,06
0,006	0,144	0,15	0,08
0,0075	0,1425	0,15	0,10

5.9 Caracterização das atividades enzimáticas

Foram caracterizadas as enzimas do complexo celulolítico de *P. citrinum* correspondentes a endoglicanases e beta-glicosidases no extrato enzimático bruto. Foram determinados parâmetros bioquímicos como pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade térmica nas atividades enzimáticas de endo e beta-glicosidases.

Devido as exoglicanases não possuírem substrato enzimático específico (ZHANG *et al*, 2006), a caracterização bioquímica não é aplicável em uma mistura de enzimas pois as endoglicanases podem também atuar sobre o substrato Avicel. Zhang and Lynd (2004) descrevem que apesar do Avicel ser constituído de celulose microcristalina, este ainda contém frações significativas da celulose amorfa, e por isso algumas endoglicanases podem liberar açúcares redutores a partir de avicel.

5.9.1 Determinação do pH ótimo para as atividades enzimáticas.

Para o teste de pH ótimo foi utilizado o tampão McIlvaine (Citrato/fosfato), nas faixas de pH's: 2,6 – 3,0 – 3,6 – 4,2 – 4,6 – 5,0 – 5,4 – 6,0 – 7,0 e 8,0. Para se obter soluções tampão nestas faixas de pH's, foi preparado uma solução de fosfato de

sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,2M e outra solução de ácido cítrico 0,1M, estas soluções foram misturadas nas proporções mostradas na TAB. 6, para um volume final de 20mL. Após misturar e homogeneizar as soluções, foi feito a medição do pH por método eletrométrico para se averiguar se o valor estava correspondendo ao pH requerido para a quantidade de Na_2HPO_4 e ácido cítrico misturados, em caso que o pH não estivesse correspondendo, foram feitos ajustes utilizando NAOH ou KCL.

O pH ótimo foi determinado como a faixa de pH onde foi possível verificar a maior atividade enzimática. As reações para endoglicanases e beta-glicosidades foram procedidas conforme descrito nos itens 5.7.2 e 5.7.4. As amostras do extrato enzimático bruto foram oriundas dos tempos de cultivo onde se obteve maior atividade para cada enzima testada. Estas, foram diluídas substituindo-se o tampão original da reação pela solução tampão McIlvaine nas faixas de pH's descritas.

TABELA 6 - Combinação de volumes para obtenção de tampão Citrato/fosfato McILVAINE

Faixa de pH	Na_2HPO_4 0,2M (mL)	Ácido cítrico 0,1M (mL)
2.6	2,18	17,82
3.0	4,11	15,89
3.6	5,70	14,30
4.2	8,28	11,72
4.6	9,35	10,65
5.0	10,30	9,70
5.4	11,15	8,85
6.0	12,63	7,37
7.0	16,47	3,53
8.0	19,45	0,55

Fonte: (McILVAINE, 1921)

5.9.2 Determinação da Temperatura ótima para as atividades enzimáticas.

Para se estabelecer a temperatura ideal para atuação das enzimas endo e beta-glicosidases, a atividade enzimática foi averiguada de acordo com os métodos dos itens 5.7.2 e 5.7.4. As amostras de extrato bruto foram diluídas na concentração de 1:1 em tampão Citrato/fosfato - McIlvaine nas faixas de pH's onde se obteve melhor desempenho para cada atividade enzimática. As reações, em triplicata, foram incubadas com os substratos específicos das enzimas por 30 minutos, em diferentes temperaturas de 20° a 80°C, após o tempo reacional procedeu-se a análises pelo método DNS e GOD-POD para avaliação da atividade endoglicanase e beta-glicosidase respectivamente.

5.9.3 Estabilidade térmica para atividades enzimáticas.

A termoestabilidade das enzimas foi avaliada incubando-se o extrato enzimático bruto por 60 minutos em temperaturas estabelecidas anteriormente onde se obteve melhor atividade, e a cada 15 minutos foram feitas coletas amostrais. Após o período de pré-incubação, realizou-se os testes de atividade de endoglicanases e beta-glicosidases das amostras coletadas, seguindo-se os passos descritos nos itens 5.7.2 e 5.7.4.

5.10 Purificação parcial de enzimas do complexo celulolítico de *P.citrinum*

A fim de se separar as endoglicanases e beta-glicosidases das outras proteínas do complexo celulolítico de *P. citrinum*, o sobrenadante de cultivo correspondente aos períodos de máxima atividade enzimática, foi submetido à duas etapas: a precipitação com sulfato de amônio seguida da cromatografia de exclusão molecular (BURGESS, 2009). Após realização de cada uma destas etapas foram feitas dosagens de proteínas totais pelo método de Bradford e realizado a

eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (item 5.11), bem como avaliação das atividades enzimáticas.

5.10.1 Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada para concentrar as proteínas extracelulares presentes no sobrenadante de cultivo de *P. citrinum*. Foram testadas as seguintes faixas de saturação: 0 a 20%, 20 a 40%, 40 a 60%, 60 a 80% e 80 a 100%, utilizando-se as quantidades requeridas para atingir a concentração final de sulfato de amônio para cada percentual de saturação (ENGLARD; SEIFTER, 1990; BURGESS, 2009)

O volume de extrato enzimático utilizado foi de 100mL, ao qual era adicionado sulfato de amônio (gramas) lentamente e mantido sob leve agitação por um período de 30 a 40 minutos em banho gelado (20°C). Após completa solubilização a amostra foi centrifugada por 30 minutos, o sobrenadante foi separado do precipitado e recuperado. Com o sobrenadante recuperado prosseguia-se adicionando a quantidade de sulfato de amônio para atingir a faixa de saturação seguinte.

O precipitado formado em cada faixa de saturação foi ressuspenso em tampão citrato pH 4.8 50mM, para verificar qual a melhor faixa de precipitação na qual foi possível se obter uma maior atividade de endoglicanases e beta-glicosidases, foi testada a atividade enzimática em cada uma das faixas de saturação. As proteínas totais precipitadas foram quantificadas pelo método de Bradford, e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e coradas com Comassie *brillant blue* R-250 para análise do perfil eletroforético.

5.10.2 Cromatografia de exclusão molecular – Gel filtração

Após determinar qual a melhor faixa de saturação, procedeu-se a uma precipitação direta nesta faixa. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão citrato pH4.8 50mM. Um volume de 0,5mL do

ressuspendido foi injetado na coluna de gel filtração Superdex-75 10/300 GL acoplada ao AKTA Purifier System (GEHealthcare), o eluente utilizado foi o tampão citrato pH 4.8 50mM, A velocidade da vazão foi de 0,5mL/min, com um volume de coluna de 1,5mL e as frações coletas foram de 1mL. A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão.

Das frações coletadas foi feita a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, e onde se detectou proteínas procedeu-se aos testes da atividade enzimática de endoglicanases e betaglicosidases (itens 5.7.2 e 5.7.4). Das frações com atividade enzimática foram retirados alíquotas de 100µL e concentradas 10X em SpeedVac™ em seguida foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%.

5.11 Análise das proteínas em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

Para determinar a massa molecular das enzimas celulolíticas, o perfil eletroforético das proteínas foram analisados em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS/PAGE) com gel de separação de 12% e gel concentrador de 5% (LAEMMLI, 1970). As amostras a serem aplicadas no gel foram primeiramente concentradas 10x (de 100µL para 10µL) em concentrador à vácuo SpeedVac™.

Volumes de 10 µL de cada amostra concentrada, correspondente às frações de purificação por gel filtração que obtiveram atividade de endoglicanase e beta-glicosidase, ao extrato bruto e ao precipitado foram misturadas a 5µL de tampão de amostra 5x concentrado, depois foram incubadas em banho-maria a 100°C por 5 minutos, e em seguida todo o volume das mesmas foram aplicadas no gel. Foi usado como padrão de peso molecular o Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific), que contém proteínas pré-coradas na faixa de 10 a 260kDa.

A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-glicina a 50 mA, 200W, por 1:30h. Após a eletroforese o gel foi corado com Coomassie *blue* R-250 a temperatura ambiente por aproximadamente 1h e em seguida foi descorado por incubação do gel em solução descorante contendo metanol e ácido acético, até visualização das bandas de proteínas. Então foi feita a captura da imagem do gel através do escaneamento do mesmo.

5.12 Zimografia para Endoglucanases em gel de poliacrilamida(SDS-PAGE)

A Zimografia consiste em uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida copolimerizado com dodecil sulfato de sódio (SDS) e com o substrato preferencial da enzima em análise (KUPAI *et al*, 2010). A zimografia em gel SDS-PAGE 12%, foi realizada para se confirmar a atividade de endoglucanases presentes nas frações obtidas da purificação parcial e no extrato enzimático bruto, baseando-se na degradação do CMC copolimerizado com o gel de eletroforese (SCHWARZ, 1987; HEUSSEN, 1980). O gel separador foi preparado conforme protocolo de preparação de gel de poliacrilamida a 12%, e adicionado 1,5% (m/v) do substrato CMC. Após polimerização à temperatura ambiente, foi adicionado o gel concentrador. As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra 2x sem β -mercaptoetanol, depois, estas foram fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas no gel. O tampão de carga utilizado foi o Tris-glicina e o tempo de corrida foi de aproximadamente 1:30h a 150V/ 50mA/30W.

Ocorrido à eletroforese, o gel foi incubado em tampão Triton X-100 1% (v/v) sob leve agitação por 1hora para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Depois o gel foi lavado 3 vezes com água destilada e incubado em tampão de reação (citrato de sódio pH 4,8 50 mM) durante 12 horas para que ocorresse a reação. Após esse período o gel foi lavado com água destilada e incubado em vermelho congo a 0,1% sob agitação durante 20 minutos e em seguida foi descorado em solução de NaCl 1M, até o aparecimento de bandas claras contra o fundo vermelho indicando a degradação de CMC.

5.13 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando os Softwares BioEstat[®] versão 5.3 e ORIGIN[®] versão 8.0. Os testes estatísticos realizados foram: Análise de variância (ANOVA), seguido de teste Tukey. Teste *t* de *Student* para amostras independentes, e estatística descritiva com determinação dos desvios-padrão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Identificação molecular

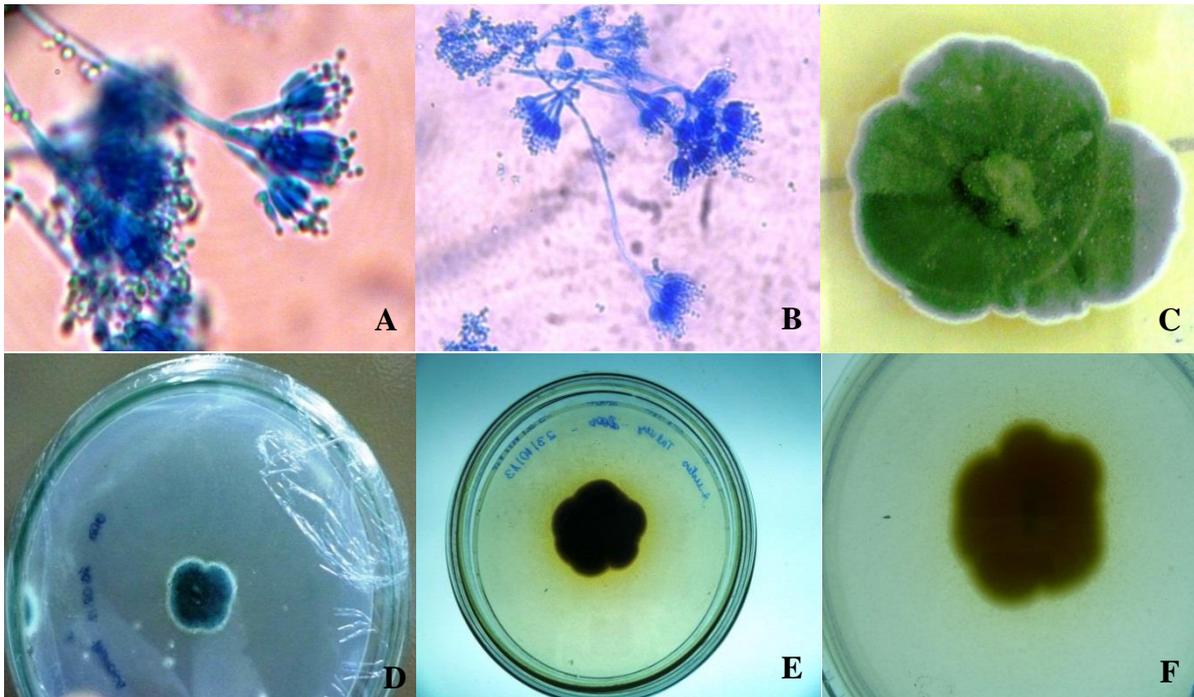
Após reativação do fungo filamentososo, procedeu-se a identificação molecular do mesmo, através da amplificação das regiões D1 e D1 do gene 28S rDNA e sequenciamento. Através da ferramenta BLASTn, as sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as do banco de dados (GenBak) depositadas no NCBI. Além disso, foram analisadas as estruturas de reprodução e micélios através de microscopia óptica e observado a forma de crescimento dos cultivos, os achados morfológicos foram comparados com descrições e ilustrações da base de dados de fungos e nomenclatura (MycoBank) (ROBERT *et al*, 2013).

A comparação das sequências gerou alinhamento satisfatório que identificou a espécie estudada como *Penicillium citrinum* (TAB. 7), esse resultado confirmou o que foi observado no cultivo, quanto à forma de crescimento e alterações do meio, bem como o observado nas lamínas de microscopia (FIG 05), que demonstraram compatíveis com o gênero *Penicillium*.

TABELA 7 - Identificação molecular da espécie estudada após alinhamento da sequência com maior identidade (%)

Sequência com maior identidade no GenBank	<i>Penicillium citrinum</i>
Nº de Pares de bases (Query)	587
Nº de acesso (Subjct, NCBI)	DQ914658.1
Identidade (%)	99 %
<i>E-value</i>	0.0

FIGURA 5 - imagens representativas do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*.



(A, B) aspectos microscópicos, lamina coradas com azul de bromofenol [objetivas, 40X e 100X]. (C, D) crescimento em meio BDA após 7 dias a temperatura ambiente. (E) coloração amarela ao redor da colônia, cultivo com 20 dias de crescimento, (F) lado reverso com coloração amarelo para laranja.

6.2 Cinética de produção de celulasas - Atividades enzimáticas (U/mL)

O meio de cultivo é um fator que tem grande influência na produção de enzimas por micro-organismos. Dentre os componentes principais envolvidos estão a fonte de carbono e nitrogênio, fatores físicos, tais como temperatura, pH, tempo de incubação a densidade do inóculo. No presente estudo optou-se por utilizar como fonte de carbono a carboximetilcelulose, a fim de induzir a produção de enzimas do complexo celulolítico (endoglicanases, exoglicanases e beta-glicosídeos). Os fatores físicos foram escolhidos conforme o descrito na literatura para fungos filamentosos produtores de enzimas celulolíticas, a temperatura em torno de 28-30°C, e pH em torno de 5,0. A densidade do inóculo 10^6 (GHOSE, 1987; SZIJÁRTÓ *et al*, 2004).

Na cinética de produção enzimática por *T. reesei* QM9414 (FIG. 7) a atividade enzimática de FPASE que corresponde à atividade de celulasas totais, obteve perfil

comparável com a produção de endoglicanases, diferindo apenas no tempo de 120h onde os valores de endoglicanases caíram e de FPASE aumentaram. As exoglicanases apresentaram um aumento nos períodos onde ocorreu diminuição da atividade de endoglicanases, porém no tempo de 120h ambas as atividades (endo e exoglicanases) apresentaram declínio assim como também ocorreu queda da atividade de beta-glicosidases neste período. As beta-glicosidases de *T. reesei* QM9414 apresentaram um perfil de produção parecido com o ocorrido para endoglicanases, os períodos de maior e menor atividades foram os mesmos observados na produção de endoglicanases.

Na FIG. 06 é demonstrada a cinética de produção enzimática por *P. citrinum* em 216h de fermentação submersa, observa-se a atividade FPASE seguiu um perfil de atividade parecido com a produção de endoglicanases tendo picos de produção nos mesmos períodos com exceção de 144h, onde a atividade de endoglicanase aumentou e a atividade FPASE diminuiu. A atividade de exoglicanases seguiu um perfil inverso, tendo atividades mais altas nos períodos em que as atividades de endoglicanases estavam em declínio. Já a atividade de betaglicosidases subiu gradualmente tendo um declínio em 144h, período em que a atividade de endoglicanases voltou a aumentar.

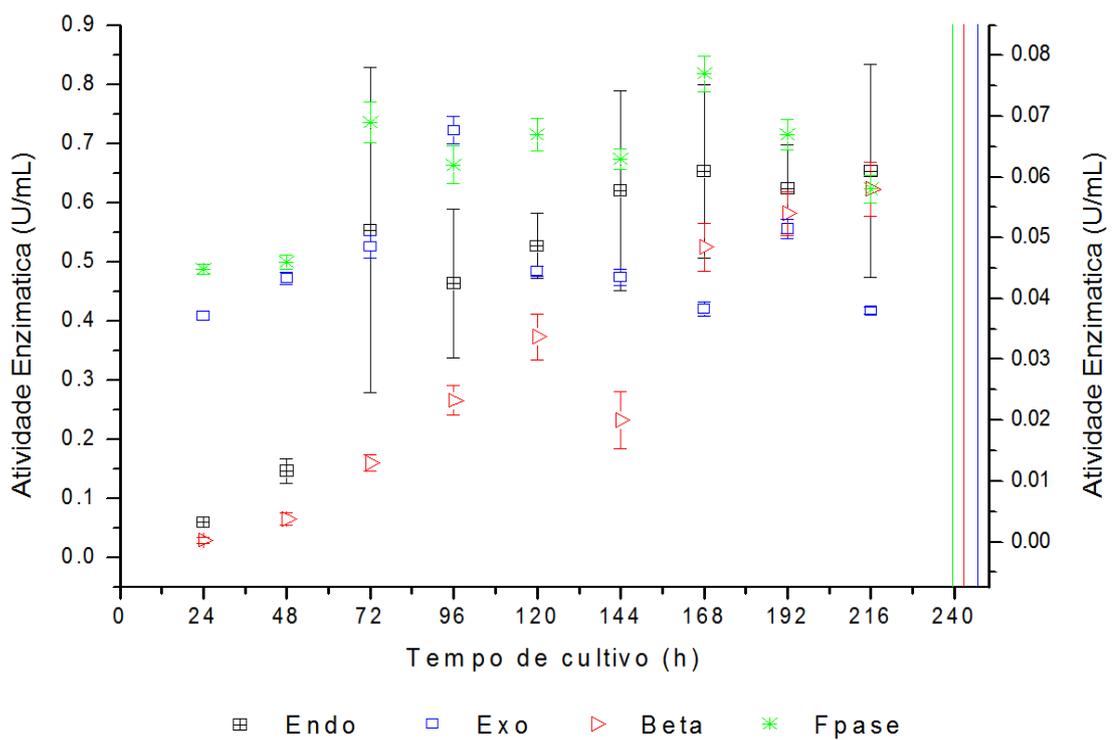
Os resultados da cinética de produção enzimática em U/mL, considerando o extrato bruto, mostraram uma atividade mais elevada de endoglicanases, tanto para *P. citrinum*, quanto para *T. reesei* QM9414, em relação às outras enzimas. Este resultado é comparável com o que Zampiere e co-autores (2013) descreveram após analisar várias fontes de carbonos na produção de celulasas por *P. echinulatum*, eles verificaram que o uso de diversas fontes de carbono resultou em diferenças claras nas enzimas secretadas, onde culturas crescidas em meios formulados com carboximetilcelulose exibiram uma alta atividade de endoglicanases.

O declínio da atividade de endoglicanase em detrimento do aumento de exoglicanase observados tanto em *T. reesei* QM9414 quanto em *P. citrinum*, podem ser um reflexo de sinergismo exo-endo. A atividade de endoglicanases é inibida por celobiose e glicose conforme vai aumentando a concentração destes produtos, por ação das exoglicanases e beta-glicosidases (Zhang e Lynd, 2004). A concentração de glicose (FIG. 08) aumentou a partir de 48h nos sobrenadantes de cultivo de *T. reesei* QM9414 e *P. citrinum*. Quando as concentrações de açúcares redutores

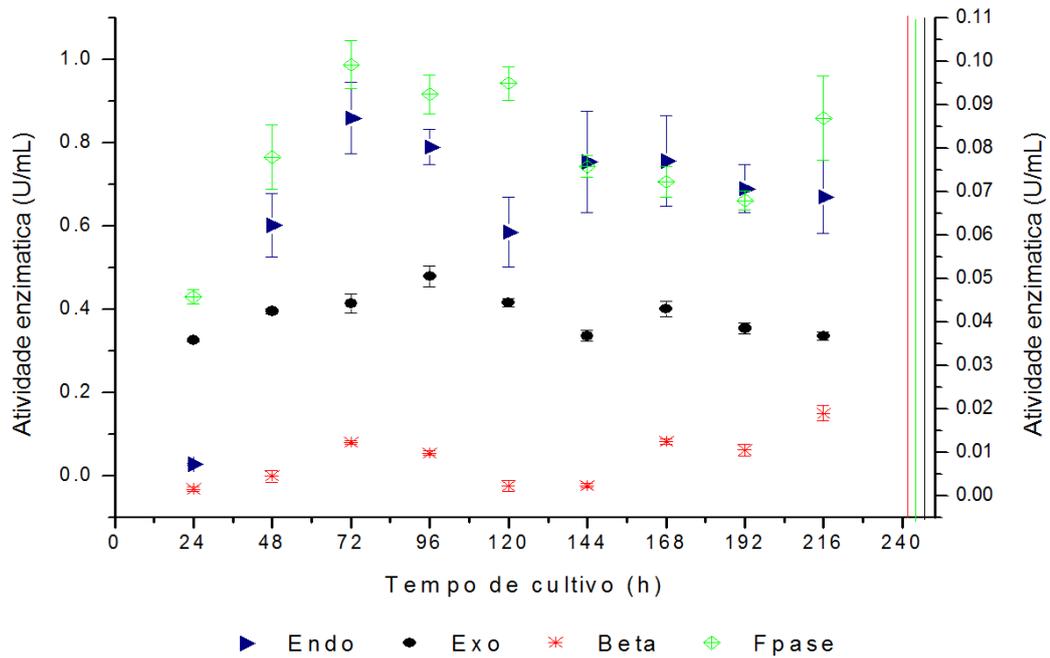
diminuíram em 120h, a atividade de celulases totais (fpase) aumentou e com o aumento açúcares redutores presentes no meio os níveis de atividade de FPASE decaíram assim como a atividade das enzimas exoglicanases. A queda nos valores de atividade exoglicanásica é relacionada com a inibição que esta sofre pelo seu produto de catálise, a glicose (GAN *et al* 2003).

Apesar do perfil de atividade enzimática observados, não foi possível descrever com mais clareza o sinergismo entre as enzimas celulolíticas de *P. citrinum*, pois a atividades das enzimas teriam que ser avaliadas separadamente, para se determinar o grau de sinergismo (GS) de acordo com Zhang e Lynd (2004) e isso implica na determinação das atividades enzimáticas em soluções puras.

FIGURA 6 - Cinética de produção enzimática na FS de *P. citrinum*.

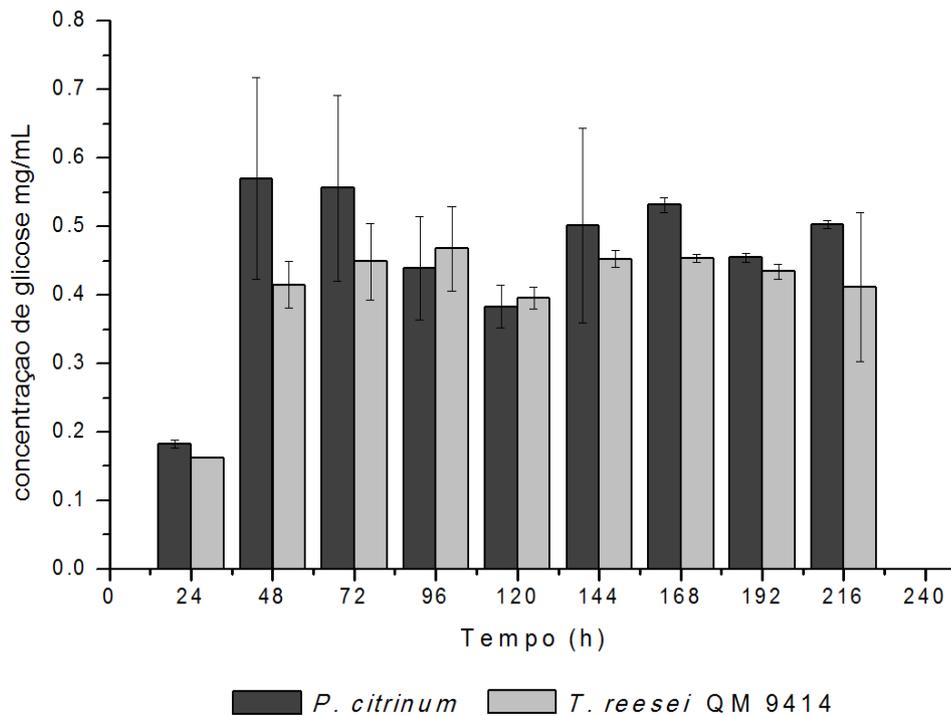


Eixo y a esquerda corresponde à atividade enzimática de endoglicanases (Endo), eixo y a direita corresponde às atividades de exoglicanases (Exo), betaglicosidases (Beta) e atividade Fpase (N=6).

FIGURA 7 - Cinética de produção enzimática na FS de *T. reesei* QM 9414.

Eixo y a esquerda corresponde à atividade enzimática de endoglicanases (Endo), eixo y a direita corresponde às atividades de exoglicanases (Exo), betaglicosidases (Beta) e atividade Fpase (N=6).

FIGURA 8 - Concentração de glicose no sobrenadante de cultivo.



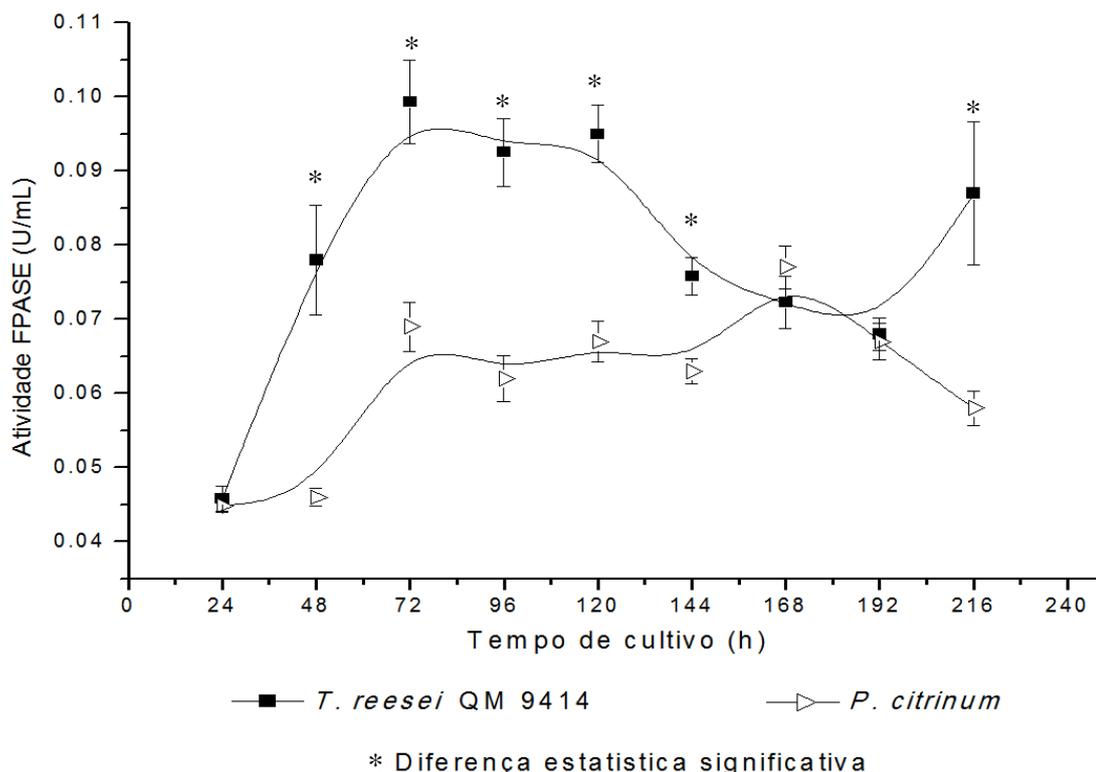
6.3 Atividade enzimática de celulases totais – FPASE

A atividade de celulases totais produzidas por *P. citrinum* e *T. reesei* QM9414 foi mensurada após determinação de açúcares redutores liberados na reação, utilizando a equação da reta padrão de glicose ($y = 0,2606x - 0,0602$; $R^2 = 0,9997$). No tempo de 72h ocorreu o primeiro pico de produção de celulases totais, tanto para *P. citrinum* (0,070 U/mL) quanto para *T. reesei* QM9414 (0,099 U/mL) (FIG. 9). Embora o perfil de produção enzimática entre as duas espécies tenha sido parecido no período de 72h, a atividade Fpase de *P. citrinum* quando comparada à de *T. reesei* QM9414 que obteve valores inferiores, evidência que a atividade fphase de *T. reesei* QM9414 foi melhor que a de *P. citrinum* (Teste t de student; $p < 0,0001$; $t=10.8584$; $gl=8$). No entanto, *P. citrinum* obteve um bom desempenho expressando seu complexo celulolítico capaz de liberar açúcares redutores a partir de um substrato celulósico como o papel de filtro.

Na cinética de produção de celulases totais por *P.citrinum*, pode ser observado que após o aumento da atividade em 72h de cultivo ocorreu um decréscimo às 96h, e voltou a aumentar em 168h, esse perfil de declínio da atividade às 96h de cultivo também foi observado na cinética de *T. reesei* QM9414, mas o aumento de atividade às 168h não foi observado para este. Para *P. citrinum* não houve diferença significativa entre os tempos de produção de 72h, 120h e 192h ($p>0,05$) e a sua melhor atividade ocorreu em 168h (0,077 U/mL) (ANOVA, $gl=45$, $f=42.5652$, $p < 0.0001$).

Analisando a produção de celulases em relação ao tempo de cultivo de *P. citrinum* isolado de ambientes fechados na Índia, Dutta e colaboradores (2008) demonstraram que o aumento da atividade FPASE ocorreu no terceiro dia de cultivo (72h). As atividades de celulases totais fphase em culturas de duas estirpes de *Penicillium* novas isoladas do solo e de plantas em decomposição foram estudadas por Marjamaa e demais autores (2013) eles obtiveram níveis semelhante ao *T. reesei* RUT C30 (uma estirpe mutante com um alto nível de secreção de proteínas). Os resultados obtidos para atividade FPASE (U/mL) são corroborantes com o reportado na literatura, para espécies de fungos do gênero *Penicillium*.

FIGURA 9 - Atividade de celulases totais – FPASE.



Médias e desvios-padrão (N=6)

6.4. Atividade enzimática de endoglicanases – CMCase

Para a determinação de atividade de endoglicanases produzidas por *P. citrinum* e *T. reesei* QM9414, nos ensaios de atividade enzimática, testou-se pelo menos 7 diluições do extrato enzimático bruto, com o objetivo de obter duas diluições que liberassem valores de glicose um pouco acima e um pouco abaixo de 0,5mg (quantidade absoluta), foi preparada uma solução mãe de 200µL para cada diluição em tampão citrato 50mM pH4,8. Na TAB. 8 estão descritos os valores dessas diluições e a concentração de enzima correspondente a cada diluição utilizada.

Utilizando a equação da curva padrão ($y = 0.4313x - 0.0627 / R^2 = 0.9997$), foram calculados os valores de glicose liberados no ensaio de cada diluição e do extrato enzimático sem diluição. E então foi estimada a concentração de enzima (diluição crítica) que teria liberado exatamente 0,5mg de glicose, por plotagem de

glicose liberada x concentração de enzima, em um gráfico, através da equação da reta. E depois calculado a atividade em U/mL para cada tempo de cultivo.

TABELA 8 - Valores de diluição e estimativa de concentração de enzima

Diluição	Vol. de Enzima (μL)	Vol. de tampão citrato (μL)	Concentração de enzima estimada
1	20	180	0.100
2	30	170	0.150
3	35	165	0.175
4	45	155	0.225
5	60	140	0.300
6	80	120	0.400
S/D	100	100	0.500

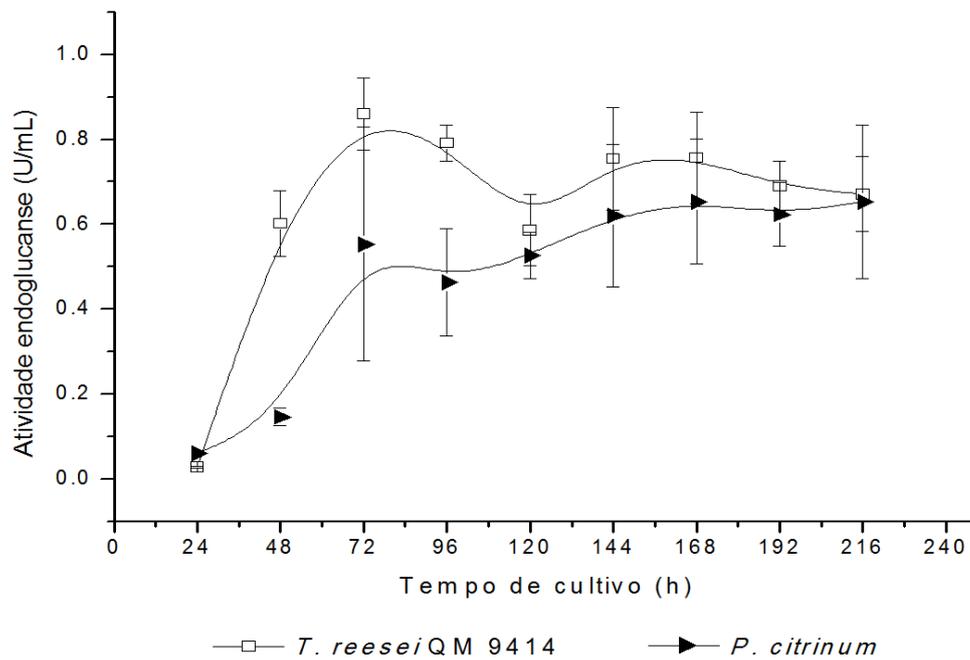
S/D = Sem diluição

Na FIG. 10 está sendo demonstrada a atividade de endoglicanases produzidas por *P. citrinum* e *T. reesei* QM9414 em U/mL. O perfil de produção enzimática observado em *P. citrinum* foi semelhante ao que ocorreu com a espécie comercial *T. reesei* QM9414. Com aumento de atividade até 72h, seguido de uma diminuição às 96h de cultivo, voltando a aumentar em 144h. Vale ressaltar, que no período de 72h de cultivo as réplicas de fermentação submersa de *P. citrinum* apresentaram um coeficiente de variação alto nos valores de atividade de endoglicanase, o que justifica valores elevados dos desvios-padrão nesse período. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de uma das réplicas ter apresentado uma produção de endoglicanases muito mais elevada em relação aos demais, em 72h.

A atividade mais alta de endoglicanases de *P. citrinum* ocorreu em 168h com atividade de 0,65 U/mL. No período de 72h, *T. reesei* QM9414 obteve um desempenho na produção volumétrica (U/mL) de endoglicanases melhor do que *P. citrinum* (Teste t; $t = 10,1822$; $gl = 2$; $p = 0,01$), com atividade de 0,86 U/mL enquanto que *P. citrinum* teve atividade de 0,56 U/mL para o mesmo tempo de cultivo. O perfil

de aumento na atividade de endoglicanases no tempo de 72h seguido de declínio da mesma no tempo 96h, também ocorreu em uma pesquisa realizada por Zampieri e colaboradores (2013), com um fungo da espécie *Penicillium echinulatum*, em meio de fermentação submersa tendo carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono.

FIGURA 10 - Atividade de endoglicanases de *P. citrinum* e *T. reesei* QM 9414.



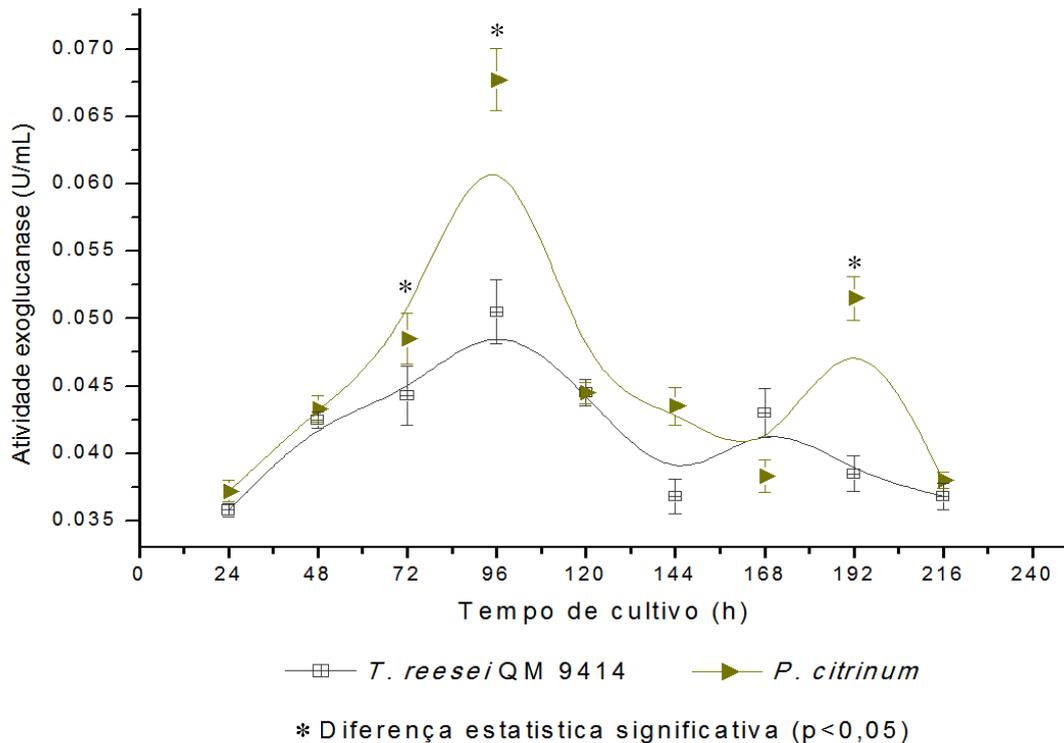
Médias e desvios-padrão (N=6)

6.4 Atividade enzimática de exoglicanases – Avicelase

A produção de exoglicanases por *P. citrinum* foi crescente a partir de 48h e atingiu pico de atividade enzimática às 96h (0,068 U/mL), este foi o melhor tempo de produção de exoglicanases em relação aos demais horários durante o cultivo de *P.citrinum* (ANOVA; $p < 0,001$). No período de 120h observou-se uma queda na atividade que continuou até 168h, e voltou a aumentar às 192h com atividade de 0,052 U/mL (FIG. 11). Semelhantemente ocorreu com *T. reesei QM9414*, o qual apresentou um pico na produção de exoglicanases às 96h (0,050 U/mL), seguido de diminuição nos valores de atividade enzimática no tempo de 120h até 144h voltando a aumentar em 168h (0,043U/mL). O tempo onde se observou valores mais altos de atividade de exoglicanases produzida por *T. reesei QM9414* foi em 96h ($p < 0,001$).

A atividade enzimática sobre o substrato avicel, crescente e constante durante a fermentação submersa até o tempo aproximado de 96h, também foi observado por Maeda e colaboradores (2013), ao avaliar a produção de celulases por *Penicillium funiculosum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, como fonte de carbono. Nos dois tratamentos realizados (concentração do pré-inóculo 5% e 10%) a atividade enzimática sobre o avicel foi crescente a partir de 48h e manteve-se constante até o tempo de 84h, tempo máximo de FS realizada pelos autores.

Na FIG. 11 está sendo apresentado o perfil de atividade avicelase de *P. citrinum* e *T. reesei QM9414* a partir dos valores de atividade enzimática. Como já foi mencionado, O tempo de cultivo de 96h obteve a atividade enzimática mais alta para os dois micro-organismos. Porém, comparando-se os valores de atividade de *P. citrinum* com os de *T. reesei QM9414* neste tempo, evidenciou-se que *P. citrinum* foi superior na produção de exoglicanases, com valores de atividade enzimática avicelase mais elevada (0,068 U/mL), em relação à atividade avicelase de *T. reesei QM9414* (0,050 U/mL), ($t = 12.5766$, $gl = 8$; $p < 0,0001$).

FIGURA 11 – Atividade Avicelase de *P. citrinum* e *T. reesei* QM 9414.

Médias e desvios-padrão (N=6)

6.5 Atividade enzimática de beta-glicosidades

A atividade de beta-glicosidases por *P. citrinum* apresentou níveis de atividade enzimática crescente a partir de 48h de FS (FIG. 12), e teve um declínio no tempo 144h, voltando a aumentar a partir de 168h continuamente até 216h (0,058 U/mL), sendo o tempo de 216h o que obteve a maior atividade enzimática, com diferença estatística significativa em relação às medias de atividade nos demais tempos (ANOVA, $p < 0,01$). A atividade de beta-glicosidases obteve menores índices nos tempos de 48h (0,003 U/mL), 72h (0,013 U/mL) e no tempo de 144h (0,020 U/mL). No período de 24h de cultivo não se observou atividade de beta-glicosidases.

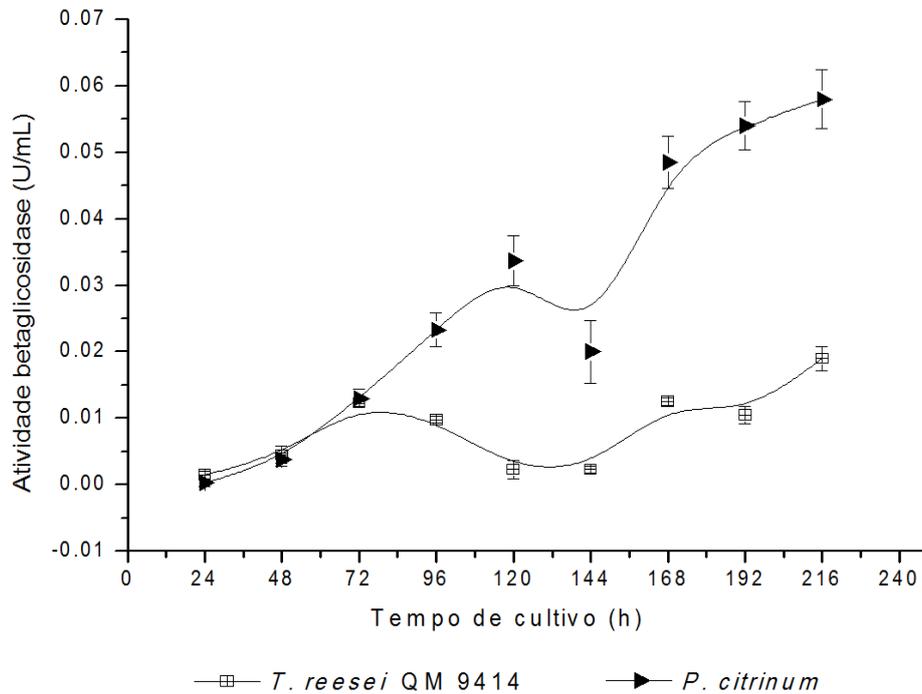
A produtividade de beta-glicosidases por *T. reesei* QM9414 demonstrou atividade baixa em 24h e 48h, e em 72h aumentou a atividade para 0,012 U/mL, em 96h de cultivo a atividade começou a decrescer e manteve-se baixa até 144h. Ao chegar em 168h de FS, a atividade aumentou (0,013 U/mL), atingindo valores mais

altos (0,019 U/mL) em 216h (ANOVA, $p < 0,0001$). A atividade de beta-glicosidases presente nos sobrenadantes de cultivo de *P. citrinum* e *T. reesei* QM9414 apresentaram perfis de produção com atividade crescente até 120h (*P. citrinum*) e até 96h (*T. reesei* QM9414), no tempo 144h de FS a atividade foi baixa para os dois fungos, e a partir de 168h as atividades foram mais altas. Os períodos de cultivo com as atividades de beta-glicosidase mais elevadas para *P. citrinum* e *T. reesei* QM9414 foram correspondentes com os mesmos tempos em que a concentração de proteínas totais estavam altas (FIG. 13), e uma menor concentração de proteínas ocorreu nos mesmos períodos de baixa atividade beta-glicosidásica.

Esse perfil de atividade de beta-glicosidase mais elevada nos pontos de tempo mais tardios, é condizente com o descrito por Zampeiere e co-autores (2013) para beta-glicosidases produzidas por *Penicillium echinulatum*, onde, obtiveram níveis de atividade mais altos em 96h, 108h e 132h, de um total de 144h de FS. De acordo com os autores, os níveis de proteínas solúveis também foram maiores nestes períodos e coincidiram com o início da redução da massa micelial, sugerindo que as proteínas foram obtidas a partir da degradação do micélio, e assim as beta-glicosidases intracelulares puderam ser detectadas.

Os valores de atividade enzimática produzidos por *P. citrinum* foram mais altos do que os de *T. reesei* QM9414, em quase todos os tempos observados neste trabalho. Em 168h de FS a atividade de *P. citrinum* foi de 0,048 U/mL e chegou a 0,058U/mL em 216h, enquanto que *T. reesei* QM9414 teve atividade de 0,013 e 0,019U/mL para os mesmos tempos ($t = 23.1355$, $gl = 8$, $p < 0,0001$). No período de 72h, uma maior proximidade foi observada nos valores de atividade entre os dois fungos, de 0,013U/mL para *P. citrinum* e 0,012 U/mL para *T. reesei* QM9414, não sendo verificada diferença estatística para as duas espécies de fungos durante este tempo avaliado ($p > 0,05$).

FIGURA 12 - Atividade de beta-glicosidase de *P.citrinum* e *T. reesei* QM 9414.



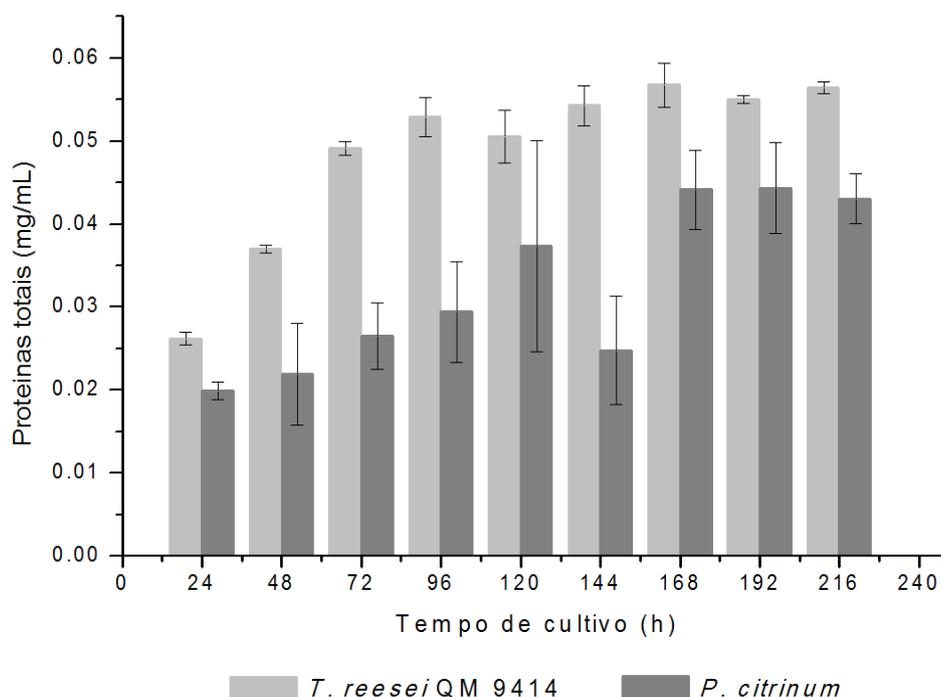
6.6 Quantificação de proteínas solúveis totais no extrato enzimático bruto

O nível de proteínas produzidas pelo fungo *P. citrinum* foi crescente a partir de 24h de FS (FIG. 13), apresentando um declínio nos valores de concentração de proteínas em 144h (0,025 mg/mL), e valores mais altos a partir de 168h (0,044 mg/mL) ($p < 0,01$). O perfil de produção de proteínas totais por *T. reesei* QM9414 demonstrou aumento nos índices de concentração, partindo do tempo de 24h e atingindo 0,053 mg/mL no período de 96h. Em 120h observou-se diminuição nos valores de concentração de proteínas (0,051 mg/mL) de *T. reesei* QM9414, porém, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os valores de concentração de proteínas nos períodos de 96h e 120h ($p > 0,05$). Nos últimos períodos de FS de *T. reesei* QM9414 o teor de proteínas totais permaneceu sem grandes alterações. *T. reesei* QM9414 obteve uma produção de proteínas mais elevada do que *P. citrinum* em todos os períodos de FS (FIG. 13). O valor mais alto

de concentração proteica foi de 0,057 mg/mL para *T. reesei* QM9414 e 0,044 mg/mL para *P. citrinum*, com diferença estatística significativa ($t = 3,444$; $gl = 16$, $p = 0,003$).

Resultados similares foram encontrados na literatura em estudos realizados com fungos do gênero *penicillium* quando comparados com *T. reesei*, onde autores relatam uma maior concentração de proteínas em extratos enzimáticos de *T. reesei* do que nos da espécie estudada, utilizando o método de Bradford para determinação da concentração de proteínas totais. De acordo com Martins e colaboradores (2008) a concentração de proteínas em um preparado de enzimas comerciais de *T. reesei* (60,04 mg/mL), foi muito maior do que obtido a partir do extrato enzimático concentrado de *P. echinulatum* (0,149 mg/mL). Maeda e co-autores (2011) avaliaram níveis altos de teor de proteínas em *Trichoderma harzianum* em relação a espécie *Penicillium funiculosum* estudada por eles, após concentrar o extrato enzimático destes fungos a concentração de proteínas foi de 2,6 mg/mL para *P.uniculosum* e de 6,4 mg/mL para *T. harzianum*. De fato, a espécie *T. reesei* é bastante conhecido na literatura por produzir naturalmente grandes quantidades de proteínas extracelulares (MARTINEZ *et al*, 2008).

FIGURA 13 - Proteínas totais de *P.citrinum* e *T. reesei* QM 9414 durante a fermentação submersa.



6.7 Atividades enzimáticas em relação ao teor de proteínas totais presentes no extrato bruto.

Os valores de atividade específica das enzimas foram atribuídos baseando-se na concentração de proteínas totais (mg/mL) e expressos em U/mg. Na TAB. 9 e TAB. 10 estão descritas as atividades enzimáticas em relação ao teor de proteínas (U/mg) para *P. citrinum* e *T. reesei QM9414*. Para algumas atividades enzimáticas os valores mais altos de atividade específica se apresentaram em tempos de FS diferentes dos tempos em que ocorreram valores mais altos observados na determinação de atividade enzimática volumétrica (U/mL), esse fato sugere que para um determinado tempo de FS a enzima analisada estava em maior concentração nas proteínas do extrato enzimático.

O fungo *P. citrinum* apresentou valores mais elevados de atividade específicas (U/mg) quando comparado com os valores obtidos por *T. reesei QM 9414*, para todas as atividades enzimáticas testadas, esse ocorrido foi devido *T. reesei* ter apresentado uma produção de proteínas extracelulares muito mais elevada do que *P. citrinum*. Esse resultado demonstra que *P. citrinum*, embora apresente níveis de produção volumétrica de FPASE, endoglicanases e exoglicanases inferiores ou próximos ao fungo modelo *T. reesei QM9414*, uma grande quantidade das proteínas excretadas por este fungo correspondem a celulases, o que torna esse micro-organismo muito promissor para melhoramento genético visando obter estirpes altamente produtoras de enzimas celulolíticas.

TABELA 9 - Atividade volumétrica (U/mL) e atividade em relação à concentração de proteínas (U/mg) de enzimas celulolíticas produzidas por *P. citrinum*

Ensaio Enzimático	Tempo de FS (h)	Proteínas totais mg/mL	Atividades U/mL	Atividades U/mg
FPASE (Celulases totais)	72	0,026 ± 0,004	0,069 ± 0,003	2,654 ± 0,545
	168	0,044 ± 0,005	0,077 ± 0,003	1,750 ± 0,155
CMCase (Endglicanases)	72	0,026 ± 0,004	0,555 ± 0,275	21.346 ± 8,273
	144	0,025 ± 0,007	0,618 ± 0,168	24,720 ± 7,4637
	168	0,044 ± 0,005	0,653 ± 0,146	14,841 ± 3,205
Avicelase (exoglicanases)	96	0,029 ± 0,006	0,068 ± 0,002	2,345 ± 0,446
Beta-glicosidases	192	0,044 ± 0,006	0,054 ± 0,004	1,227 ± 0,078
	216	0,043 ± 0,003	0,058 ± 0,004	1,349 ± 0,099

Médias e desvios-padrão (N = 6)

TABELA 10 - Atividade volumétrica (U/mL) e atividade em relação à concentração de proteínas (U/mg) de enzimas celulolíticas produzidas por *T. reesei* QM 9414

Ensaio Enzimático	Tempo de FS (h)	Proteínas totais mg/mL	Atividades U/mL	Atividades U/mg
FPASE (Celulases totais)	48	0,037 ± 0,001	0,078 ± 0,007	2,109 ± 0,183
	72	0,049 ± 0,001	0,099 ± 0,006	2,017 ± 0,117
CMCase Endoglicanase	72	0,049 ± 0,001	0,860 ± 0,085	17,200 ± 2,079
Avicelase Exoglicanase	96	0,053 ± 0,002	0,050 ± 0,002	0,954 ± 0,036
B-glicosidase	72	0,049 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,245 ± 0,014
	168	0,057 ± 0,003	0,013 ± 0,001	0,228 ± 0,012
	216	0,057 ± 0,001	0,019 ± 0,002	0,333 ± 0,032

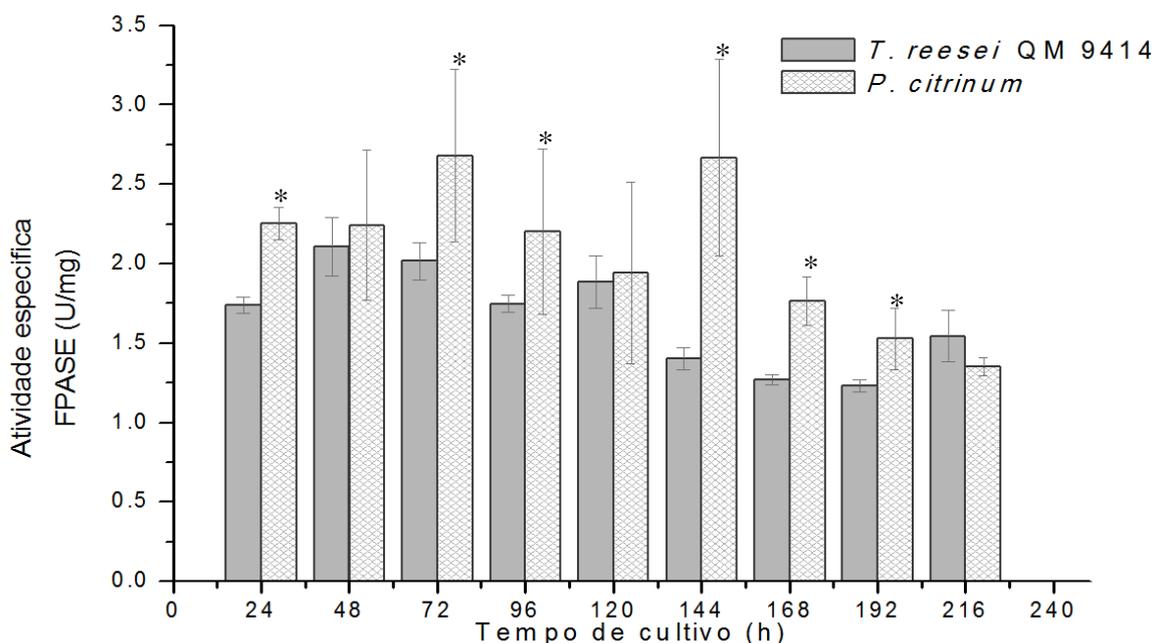
Médias e desvios-padrão (N = 6)

6.7.1 Atividade específica de celulases totais - FPASE

Os resultados de atividade específica das enzimas celulolíticas produzidas por *P. citrinum* mostraram um perfil diferente em relação à atividade expressa em U/mL, dependendo da concentração de proteínas totais presentes no extrato enzimático bruto, nos diferentes tempos de fermentação submersa. Valores de atividade mais altos foram observados nos tempos 72h (2,65 U/mg), 120h (1,81 U/mg) e 168h (1,75 U/mg), o tempo de 72h foi considerado o melhor período de atividade específica de celulases totais, com diferença estatística significativa quando comparado com os demais tempos avaliados (ANOVA, $p < 0,0001$). Quando avaliada a atividade volumétrica (item 6.3) no tempo de 144h ocorreu um queda nos valores de atividade, mas em relação à atividade específica neste tempo, observou-se aumento nos valores (2.52 U/mg), logo, o tempo de 144 foi o segundo tempo com maior atividade específica de celulases totais.

As celulases totais produzidas por *T. reesei* QM 9414 apresentaram atividade específica crescente a partir de 24h com aumento significativo em 48h, nesse período a atividade foi de 2,11 U/mg, sendo a mais alta observada em todos os horários (ANOVA, $F=65.1979$, $gl= 24$, $p<0.0001$). Após realizar os cálculos de atividade por unidades de proteína, os perfis de produção de celulases totais entre *P. citrinum* e *T. reesei* QM 9414 se apresentaram mais próximos um do outro. Devido ao desempenho de *T. reesei* QM 9414 no quesito produção de proteínas totais ter sido bem mais elevado do que o observado em *P.citrinum*, a atividade específica de FPASE em *P. citrinum* foi superior do que em *T. reesei* QM9414 em quase todos os tempos (FIG. 14).

FIGURA 14– Perfil de atividade específica de celulases totais



* Diferença estatística significativa

Os resultados de atividade FPASE levando-se em consideração o teor de proteínas secretas por *P. citrinum*, são comparáveis com alguns dados reportados na literatura para atividade específica de celulases totais produzidas por fungos filamentosos, como por exemplo, *P. echinulatum* que em relação a concentração de proteínas dosadas através do método Bradford, obteve atividade FPASE de 1,81 U/mg (MARTINS *et al.* 2008), valor abaixo do encontro no presente estudo.

Um fungo filamentoso que vem sendo estudado e sugerido como uma alternativa potencial para *T. reesei* é o *Acremonium cellulolyticus*, por produzir celulases com alto rendimentos (GOTTSCHALK *et al.*, 2013). Fujii e colaboradores (2009) obtiveram atividade específica de FPASE de 0,66 U/mg de proteína no sobrenadante de cultivo de *A. cellulolyticus* em material lignocelulósico pré-tratado, atividade melhor do que a estirpe *T. reesei* CDU-11 (0,25 U/mg) usada por eles para comparação. Hideno e co-autores (2011) relataram atividade de 0,42 U/mg para uma estirpe mutante de *A. cellulolyticus* CF-2612, a partir de cultura em FS tendo como fonte de carbono palha de arroz pré-tratada. Ainda que as fontes de carbono no cultivo tenham sido diferentes do utilizado neste estudo, esses dados da literatura

permitem mencionar que *P. citrinum* obteve um ótimo desempenho comparado com os obtidos por espécies descritas como ótimas produtoras de celulases totais em relação ao total de suas proteínas extracelulares.

6.7.2 Atividade específica de endoglicanases

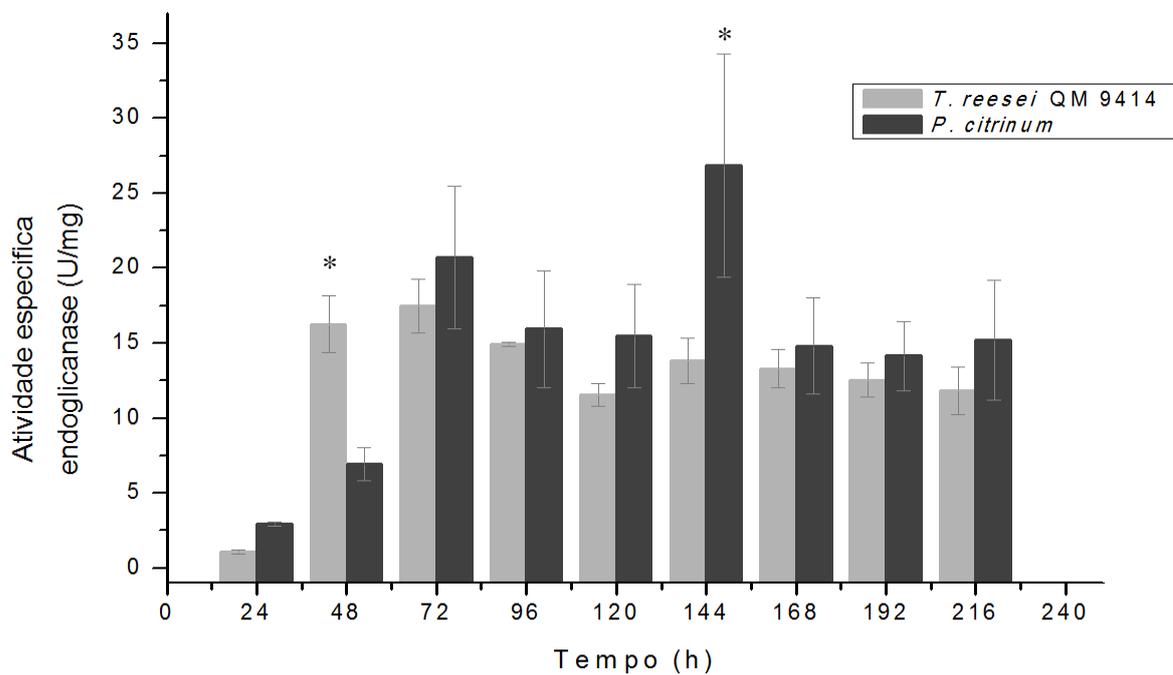
Os valores mais altos de atividade específica endoglicanases para *P. citrinum* ocorreram nos tempos de 72h (21,346 U/mg) e 144h (24,720 U/mg). No tempo de 168h onde se observou um valor alto de atividade enzimática volumétrica (TAB. 2), foram obtidos valores baixos de atividade específica endoglicanásica, devido ao teor de proteínas elevado nesse tempo de FS. O perfil de atividade específica de endoglicanases produzidas por *P. citrinum* (FIG. 15), com valores de atividade diminuídos em 96h e que voltam a aumentar nos tempos posteriores teve um padrão similar com a atividade específica de celulases totais, assim como ocorreu na atividade enzimática volumétrica, onde foi observado semelhança no perfil cinético de celulases totais e endoglicanases. Denotando novamente, que o complexo celulolítico expresso por *P. citrinum* durante este trabalho foi representado em sua maioria por endoglicanases.

Para *T. reesei* QM 9414 a atividade específica de endoglicanases apresentou valor mais alto no tempo de 72h (17,200 U/mg). Basso e co-autores (2010) avaliando a atividade celulolítica de vários fungos mencionaram maior atividade específica de endoglicanases para *Aspergillus fumigatus* (2,3 U/mg) e para *T. reesei* QM 9414 (1,0 U/mg) valores abaixo do encontrado no presente trabalho para *T. reesei* QM 9414. O perfil de atividade específica de endoglicanases de *T. reesei* QM 9414, também apresentou semelhança com o perfil de atividade específica de FPASE, onde se observou aumento da atividade em 72h e diminuição da mesma em 96h, porém, em 120h a atividade específica diminuiu mais ainda, ao contrario de FPASE em que havia aumentado no mesmo período de tempo. No tempo de 48h a atividade endoglicanásica específica de *T. reesei* QM 9414 foi mais elevada do que a de *P. citrinum* ($T=7,255$; $gl=3$; $p=0,005$). Mas em 144h de FS, *P. citrinum* exibiu atividade mais alta que *T. reesei* QM 9414 ($T=11,8279$; $gl=1$; $p=0,05$). Nos demais tempos *P. citrinum* apresentou valores de atividade específica próximos ao obtidos

por *T. reesei* QM 9414 não sendo constatada diferença estatística significativa no teste T de student ($p > 0,05$).

Martins e colaboradores (2008), obtiveram valores de atividade específica de endoglicanase de 10,20 U/mg para *Penicillium echinulatum*, mais baixa do que *T. reesei* QM9414 (12,76 U/mg), apesar de *T. reesei* QM9414 ter apresentado uma alta concentração de proteínas, a atividade específica mais elevada se justifica portanto, pela alta atividade enzimática volumétrica de *T. reesei* QM9414 que foi bem maior do observado para *P. echinulatum*, enquanto que Sun e cooperadores (2008) relataram atividade de 15,00 U/mg para *P. decumbens*. Castro e demais autores (2010) afirmaram valores de atividades bem mais elevados para a espécie *Penicillium funiculosum* (43,14 U/mg), utilizando material lignocelulósico pré-tratado em condições otimizadas de cultivo.

FIGURA 15 - Atividade específica de endoglicanases.



* Diferença estatística significativa

Médias e desvios-padrão (N=6)

6.7.3 Atividade específica de exoglicanases

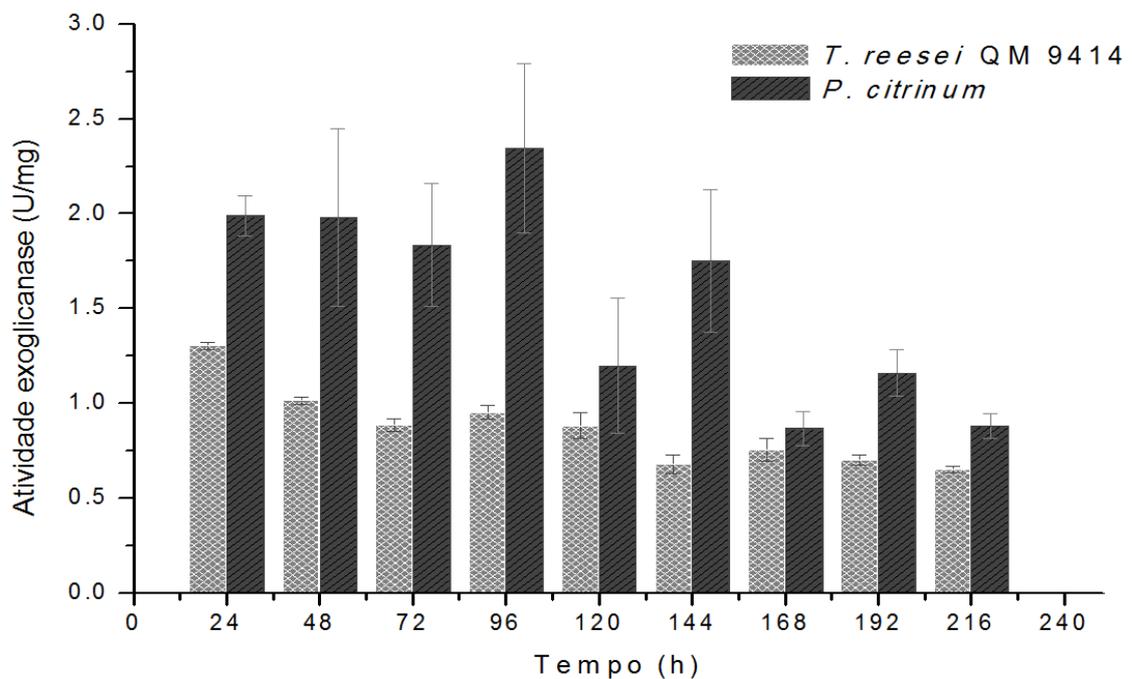
A atividade de exoglicanase em U/mg produzidas por *P. citrinum* apresentou valor mais elevado no tempo 96h (2,345 U/mg) em relação aos outros períodos (FIG. 16), (ANOVA; $p < 0,01$). O fato de a atividade específica ter sido alta em 96h, tendo em vista que neste tempo se verificou valores de proteínas totais mais elevados do que em 72h (FIG. 13), pode estar indicando que em 96h de FS uma quantidade significativa das proteínas secretadas por *P. citrinum* é correspondente a exoglicanases. No tempo de 72h ocorreu um decréscimo na atividade específica que não foi observado no perfil de atividade volumétrica. Este resultado demonstra que em 72h houve uma baixa produção de exoglicanases.

T. reesei QM 9414 apresentou perfil atividade específica com valores bastante próximos entre um período e outro (FIG.16). Em 96h a atividade foi de 0,954 U/mg, e diferente do que foi observado nos valores de atividade volumétrica, não foi constatado diferença estatística significativa entre esse período e o tempo de 72h (ANOVA, $P > 0,05$). O tempo de 96h obteve valores mais altos somente em relação aos tempos finais de 144h a 216h (ANOVA, $P < 0,01$). De acordo com Ahamed e Vermette (2008) as exoglicanases de *Trichoderma reesei* correspondem a aproximadamente 60% a 80 % de suas proteínas totais secretadas. No presente trabalho os valores mais altos de atividade específica de exoglicanases foram observados nas primeiras horas de FS nos tempos 24h e 48h, nestes períodos a concentração de proteínas no extrato bruto (mg/mL) foram as mais baixas sugerindo que as proteínas secretadas corresponderam, em sua maioria, por enzimas exoglicanases. No entanto, nos períodos seguintes os valores de atividade específica foram bem mais baixos em relação à atividade específica de endoglicanases e isso pode estar relacionado à fonte de carbono utilizada na fermentação submersa.

Analisando a atividade do extrato enzimático de *P. echinulatum* e *T. reesei* em relação ao teor de proteínas totais, Martins e colaboradores (2008) obtiveram valores de 0,067 U/mg para os dois fungos, utilizando Sigmacell type 50 (celulose microcristalina) como substrato nos ensaios enzimáticos. Os valores de atividade específica de *P. echinulatum* foram iguais aos da estirpe *T. reesei* que é considerado modelo na produção de celulasas destacando-se as exoglicanases, esses valores

altos em U/mg também ocorreram devido concentração elevada de proteínas no extrato de *T. reesei* avaliado pelos autores, semelhante com o que ocorreu no presente trabalho. Hiden e coautores (2011) encontraram atividades específicas de exoglicanases de 0,33 U/mg no extrato enzimático de *Aspergillus cellulolyticus*, cultivado em FS tendo CMC como fonte de carbono, valores abaixo dos obtidos por *T. reesei* QM9414 e *P. citrinum* aqui demonstrados.

FIGURA 16 - Atividade específica de exoglicanase (Avicelase)



6.7.4 Atividade específica de beta-glicosidase

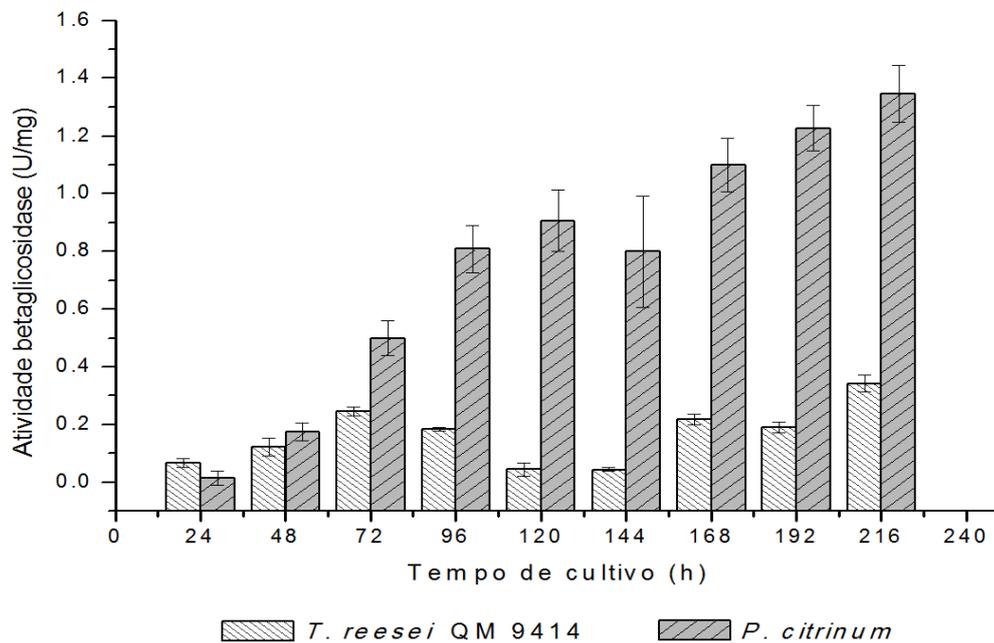
Após calcular os valores de atividades enzimáticas de beta-glicosidases produzidas por *P. citrinum* em relação à quantidade de proteínas totais, foi observado que apesar de os valores serem maiores em U/mg os picos de atividade e declínios permaneceram nos mesmos tempos de cultivo quando analisados em U/mL. A atividade específica aumentou a partir de 72h (0,500 U/mg) e continuou crescente até 120h (0,919 U/mg), depois, em 144h os valores caíram para 0,800 U/mg e

voltam a subir novamente em 168h até 216h chegando a 1,349 U/mg valor mais alto observado para *P. citrinum* neste estudo (FIG. 17).

Para *T. reesei* QM 9414 os índices de atividade específica também mostraram valores mais altos e mais baixos nos mesmos períodos quando calculados em U/mL. As atividades mais altas ocorreram em 72h (0,245 U/mg), 168h (0,228 U/mg) e 216h (0,333 U/mg) e no período de 144h observou-se um decréscimo na atividade (0,044 U/mg). O tempo de 216h foi onde se obteve a maior atividade específica de beta-glicosidase para *T. reesei* QM 9414 (ANOVA; $p < 0,0001$). Assim como ocorreu nos valores de atividade específica das demais enzimas, a concentração de proteínas totais secretadas por *T. reesei* QM 9414 durante o cultivo influenciou para que os valores de atividade específica de beta-glicosidases fossem pequenos em relação os valores obtidos por *P. citrinum*, além também, da atividade beta-glicosidásica volumétrica de *T. reesei* QM 9414 que obteve valores baixos. A espécie *T. reesei* é um fungo modelo devido seu sistema de produção de celulases eficaz (endoglicanases e exoglicanases) cujo é o mais bem estudado, mas ele também é descrito por exibir baixa produção de beta-glicosidase que correspondem a aproximadamente 1% das suas proteínas totais secretadas (TEERI, 1997; AHAMED *et al*, 2008).

Na literatura encontram-se vários relatos indicando que fungos do gênero *Penicillium* são melhores produtores de beta-glicosidases do que espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma*, incluindo *T. reesei*. Martins e colaboradores (2008) avaliaram atividade beta-glicosidase de *P. echinulatum* (1,28 U/mg) superior em relação a *T. reesei* (0,29 U/mg). Son e demais autores (2010) verificaram um alto nível de produção de beta-glicosidase por fermentação em estado sólido pela espécie *P. citrinum* YS40-5, isolado de palha de arroz em Taiwan. Estes dados somados ao resultado obtido nesse trabalho demonstram que *P. citrinum* representa um potencial para produção de beta-glicosidases visto que ele possui capacidade de secretar esta enzima em níveis equivalentes aos reportados para fungos celulolíticos mais eficientes conhecidos.

FIGURA 17 - Atividade específica de beta-glicosidase.



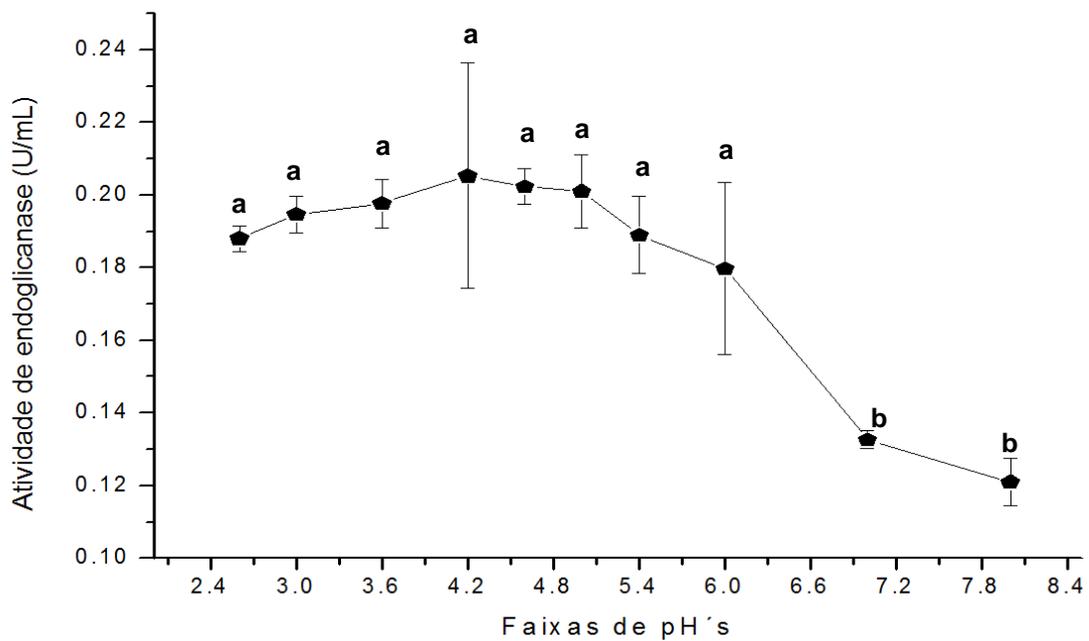
6.8 pH ótimo para as atividades das enzimas endoglicanases e beta-glicosidases produzidas por *P.citrinum*.

Das dez faixas de pH's testadas para a atividade endoglicanásica o valor mais alto de atividade enzimática foi verificado na faixa de pH 4,2 (0,205 U/mL). No entanto, diferença significativa não foi encontrada entre pH 4,2 e as faixas de pH's de 3,6 a 6,0 testadas (FIG. 18). Analisando o perfil da atividade enzimática de endoglicanases nas variações de pH's, observou-se que o desempenho das endoglicanases de *P.citrinum* foi prejudicado quando reagiram em pH's menos ácidos, os mais baixos valores de atividade enzimática ocorreram em pH 7,0 e pH 8,0.

As enzimas celulolíticas produzidas por fungos filamentosos de uma forma geral apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida de 3,6 a 5,0 (CASTRO; PEREIRA, 2010). Ghorri e colaboradores (2012) verificaram que a atividade ótima de endoglicanases produzidas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* ocorreu em pH 3,5. Enquanto que Castro e demais autores (2010) determinaram atividade ótima

para endoglicanases de *P. funiculosum* na faixa de pH 4,82. Em um estudo de caracterização das enzimas celulolíticas produzidas por um *P. citrinum* MTCC 6489 isolado na Índia, Dutta e cooperadores (2008) descreveram que as endoglicanases deste fungo mostraram atividade ótima em pH 5,5.

FIGURA 18 - Influência do pH na atividade enzimática de endoglicanase



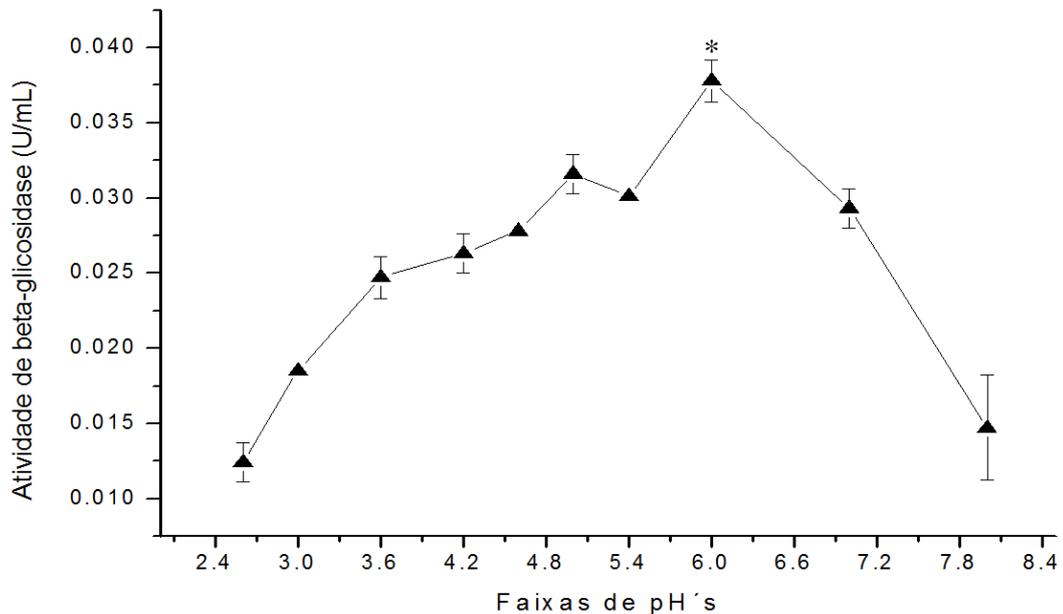
Letras iguais: sem diferença estatística significativa (ANOVA; $p > 0,05$); letras diferentes: diferença estatística significativa (ANOVA; $p < 0,05$). Médias e desvios-padrão (N=3). Amostras do extrato enzimático bruto referentes aos tempos 72h e 168h.

Para a atividade de beta-glicosidase a faixa de pH que possibilitou atividade mais elevada em relação as outras testadas, foi o pH 6,0 (0,038 U/mL). Nas faixas de pH 5,0 (0,032 U/mL), pH 5,4 (0,030 U/mL) e pH 7,0 (0,029 U/mL) os valores de atividades enzimáticas foram próximas aos obtidos em pH 6,0 mas eles foram estatisticamente diferentes (ANOVA; $p < 0,0001$). Níveis de atividade enzimática mais baixos foram verificados em pH's nas faixas mais ácidas e em pH 8,0 (FIG 19).

Valor aproximado de pH ótimo para a atividade de beta-glicosidase foi descrito por Castro e Pereira Jr. (2010) para a beta-glicosidase produzida por *P. funiculosum* onde verificaram atividade mais elevada em pH 4,9. Os valores de pH's que permitiram atividade alta da beta-glicosidase de *P. citrinum* estudadas neste

trabalho, se aproximaram dos descritos por Son e co-autores (2010) que ao caracterizarem uma beta-glicosidase produzida por *P. citrinum* YS40-5 afirmaram que as atividade mais altas para esta enzima, ocorreu nas faixas de pH's de 4,0 a 6,0.

FIGURA 19 - Influência do pH na atividade enzimática de beta-glicosidase



* Diferença estatística significativa

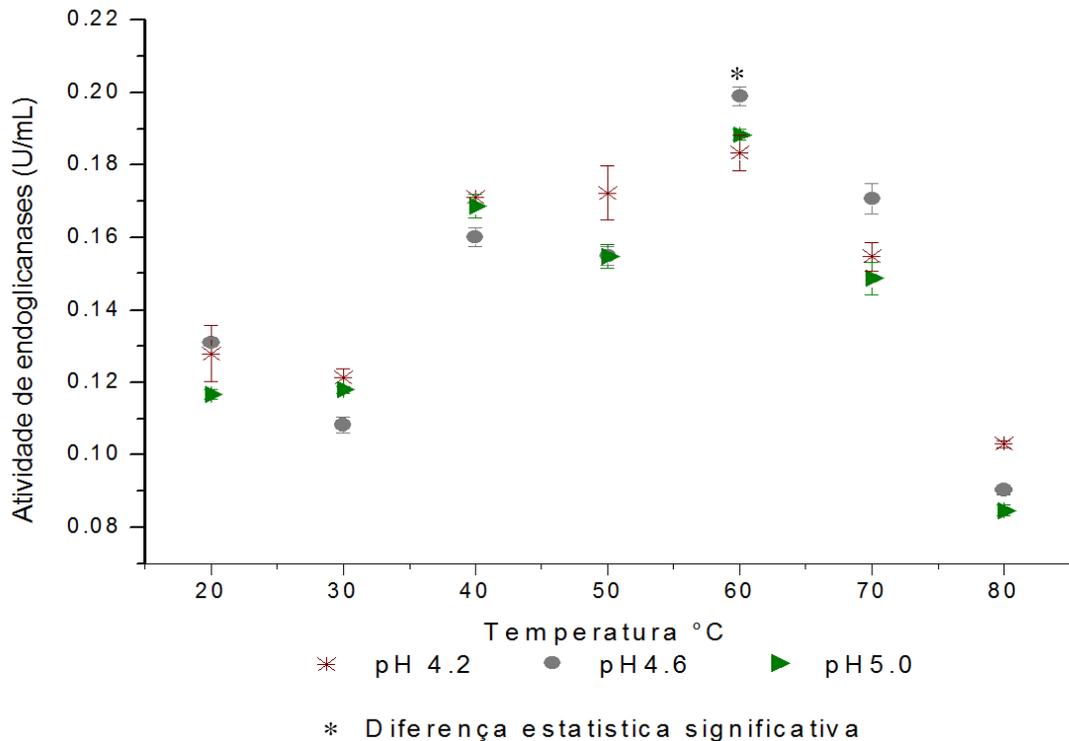
Médias e desvios-padrão (N=3). Amostras do extrato enzimático bruto referente aos tempos 168h, 192h e 216h de FS.

6.9 Temperatura ótima para a atividade de endoglicanases e beta-glicosidases produzidas por *P.citrinum*

Para avaliar a temperatura que favoreceu a obtenção de atividades de endoglicanases mais altas, os testes foram realizados utilizando os pH's 4,2; 4,6 e 5,0 que foram as faixas onde verificou-se as maiores atividades de endoglicanases (item 6.8). A temperatura onde se observou atividades enzimáticas mais elevadas foi em 60°C (ANOVA; $p < 0,0001$). A temperatura de 60°C foi ótima nas três faixas de pH's testadas (FIG. 20), e a atividade com valor mais alto nesta temperatura foi obtida em pH 4,6 (0,199 U/mL). Na temperatura de 50°C o pH 4,2 foi o que permitiu a melhor atividade enzimática, assim como já havia sido observado nos testes de pH

ótimo (item 6.8). Atividades mais baixas foram observadas nas temperaturas de 20°C, 30°C e 80°C.

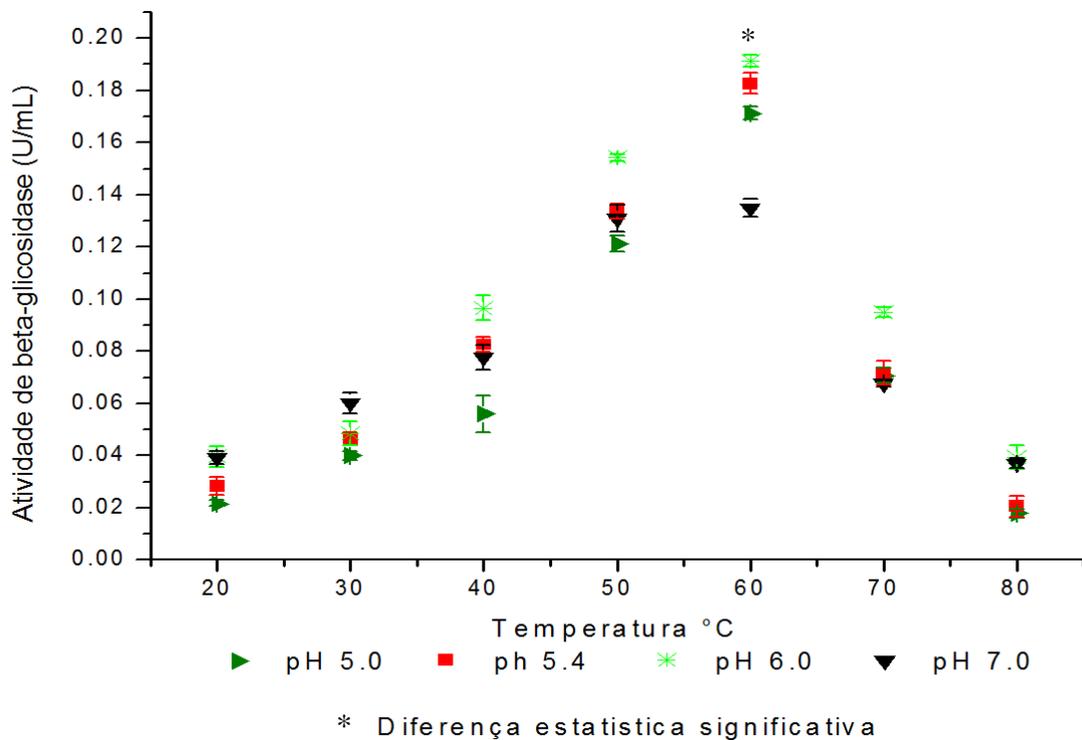
FIGURA 20 - Temperatura ótima para a atividade de endoglicanase.



Médias e desvios-padrão (N=3). Extrato enzimático bruto referente aos tempos 72h e 168h de FS.

Para beta-glicosidase, testou-se as atividades enzimáticas nas temperaturas de 20°C a 80°C em pH 6,0 que foi o pH ótimo para a atividade desta enzima. As temperaturas também foram testadas nos pH's 5,0; 5,4 e 7,0 visto que estes permitiram valores de atividade próximos aos do pH ótimo, conforme descrito no item 6.8. Das sete temperaturas avaliadas (FIG. 21), 60°C foi a temperatura que possibilitou valores mais altos de atividade (ANOVA, < 0,0001) nas faixas de pH's 6,0 (0,191 U/mL); 5,0 (0,171 U/mL) e 5,4 (0,183 U/mL). Apesar de que em pH 6,0 a atividade foi mais elevada, diferença estatística significativa só foi observado entre os pH's 5,0 e 6,0 nesta temperatura (ANOVA; $p < 0,01$). Em pH 7,0 a atividade a 60°C foi a mais baixa observada.

FIGURA 21 - Temperatura ótima para a atividade de beta-glicosidase.



Médias e desvios-padrão (N=3). Extrato enzimático bruto referente aos tempos 168h, 192h e 216h

Analisando o perfil da influência das temperaturas na atividade enzimática observou-se que para as endoglicanases de *P.citrinum* a temperatura ideal está em torno 60°C. O mesmo ocorreu para beta-glicosidase em que 60°C foi a temperatura ótima para sua atuação e tanto para endoglicanases quanto para beta-glicosidases, os valores de atividade foram aumentando à medida que se aumentou as temperaturas e foram decaindo quando em temperaturas mais altas como 70°C e 80°C. Fato esperado uma vez que a elevação da temperatura proporciona um aumento da velocidade de reação, e as temperaturas mais altas ocasionam desnaturação das enzimas.

A temperatura ótima para celulasas de fungos filamentosos de uma forma geral está em torno de 30° a 55 °C (XU *et al*, 2006). Os resultados obtidos aqui foram parecidos com alguns encontrados na literatura como *Trichoderma viride*, que produz endoglicanases que apresentam temperatura ótima de 60°C (MANDELS e

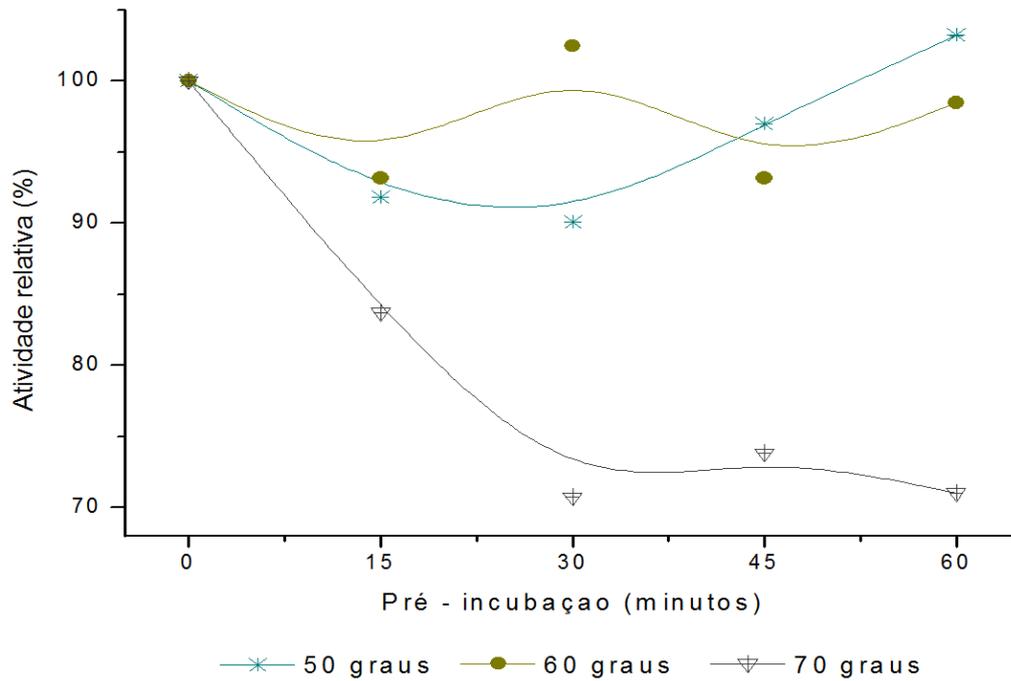
REESE, 1999), e *P. funiculosum* cuja temperatura ótima foi de 58 °C para atividade de endoglicanase e 57 °C para beta-glicosidase (CASTRO *et al* ,2010) a estirpe *P.citrinum* MTCC 6489 apresentou temperaturas ótimas a 60°C para a atividade enzimática de endoglicanases (DUTTA *et al*, 2008), e *P. citrinum* YS40-5 obteve atividade máxima de beta-glicosidases na temperatura de 60°C (SON *et al*, 2010).

No presente estudo o fato da temperatura ótima para as endoglicanases e beta-glicosidases de *P. citrinum* ter sido a mesma (60°C), representa um sinal favorável visando o uso em conjunto dessas enzimas nos bioprocessos que requeram a atuação das mesmas em condições termofílicas.

6.10 Estabilidade térmica de endoglicanases e beta-glicosidases de *P. citrinum*

A estabilidade térmica das atividades de endoglicanases e beta-glicosidases presentes no extrato bruto de *P. citrinum* foram avaliadas nas temperaturas 50°C, 60°C e 70°C por 60 minutos em intervalos de 15 minutos. Verificou-se que após 60 minutos de pré - incubação das amostras em 60°C as endoglicanases mantiveram 98,5% da atividade em relação à atividade das amostras que não foram pré-incubadas (FIG. 22). Em 50°C a pré-incubação por 60 minutos pareceu favorecer o desempenho das endoglicanases que apresentaram valores de atividade relativa maiores do que o observado nas amostras sem pré-incubação, mesmo após demonstrar valores baixos em 30 minutos de pré-incubação. No entanto, diferença estatística significativa não foi constatada entre a atividade das amostras não incubadas e da pré-icubada por 60 minutos a 50°C (ANOVA; $p > 0,05$). Na temperatura de 70°C verificou-se que as endoglicanases apresentaram valores de atividade relativas reduzidos logo após 15 minutos de pré-incubação e os valores continuaram diminuindo à medida que o tempo de pré-incubação nesta temperatura foi aumentando (FIG 22).

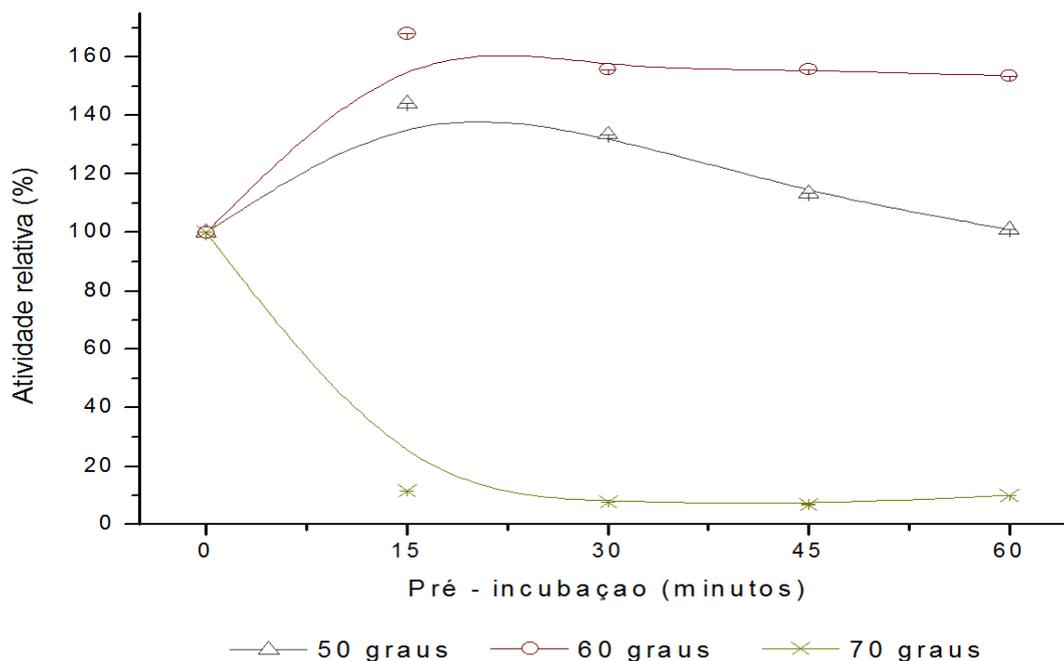
FIGURA 22 - Efeito da temperatura para a atividade endoglicanase.



Médias e desvios-padrão (N=3).

Quanto a termoestabilidade da atividade beta-glicosidase de *P. citrinum* (FIG. 23), observou-se que a incubação das amostras em 50°C e 60°C, teve um efeito positivo na atuação desta enzima, pois a atividade enzimática foi superior em todos os intervalos até 60 minutos em relação as atividades das amostras que não foram incubadas nestas temperaturas. Verificou-se que a temperatura de 70°C teve um efeito significativo para a atividade de beta-glicosidase que após 60 minutos de pré-incubação apresentou menos de 10% da atividade relativa (ANOVA; $p < 0,01$).

FIGURA 23 – Efeito da temperatura para a atividade beta-glicosidase.



Ensaio enzimático realizado em triplicata.

6.11 Purificação parcial de endoglicanase e beta-glicosidase de *P. citrinum*

Para as etapas de purificação parcial de endo e beta-glicosidase foram utilizados os sobrenadantes de cultivo reunidos a partir de 72h até 216h que foram os períodos em que ocorreram uma maior atividade destas enzimas. Para a precipitação das proteínas com sulfato de amônio, primeiramente foram testadas 5 faixas de saturação, para verificar qual melhor faixa de saturação que permitisse concentrar uma quantidade significativa de proteínas com atividade de endoglicanases e beta-glicosidases, para tal testou-se as atividades enzimáticas em cada faixa.

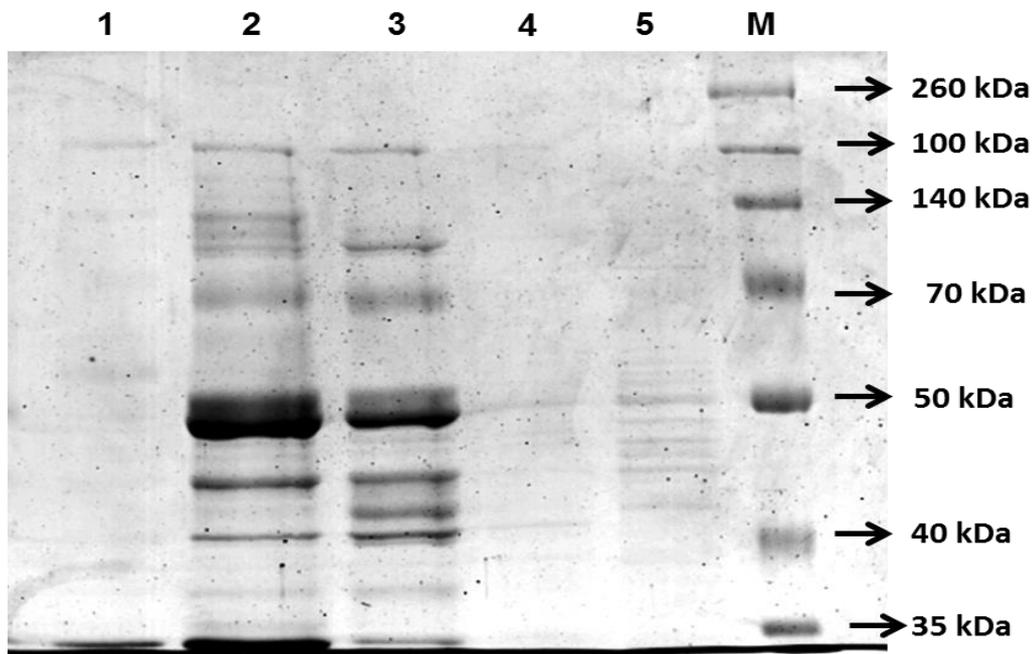
Na FIG. 25 demonstrou-se as atividades enzimáticas e a concentração das proteínas totais presentes nos precipitados ressuspensos em tampão citrato 50mM. Observou-se que nas faixas de 40 a 60% e 60 a 80% de saturação, foi possível obter uma quantidade mais elevada de proteínas totais no precipitado. A faixa de saturação mais eficaz para a atividade de endoglicanases foi de 40 a 60 %,

e para a atividade de beta-glicosidases dois intervalos de saturação precipitaram uma quantidade maior desta enzima, as faixas de 40 a 60% e de 60 a 80%.

Na FIG. 24 está sendo mostrado o perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12%, das proteínas do sobrenadante de cultivo precipitadas nas faixas de saturação de 0 a 20% até 80 a 100% de sulfato de amônio. A visualização do gel permitiu confirmar que as faixas de 40 a 60% e 60 a 80% foram as que concentraram mais proteínas e que durante o período de 72h a 216h de FS, *P. citrinum* secretou proteínas com massas moleculares de tamanho variados, sendo que as de \cong 50kDa foram as mais abundantes concentradas nestas duas faixas de saturação.

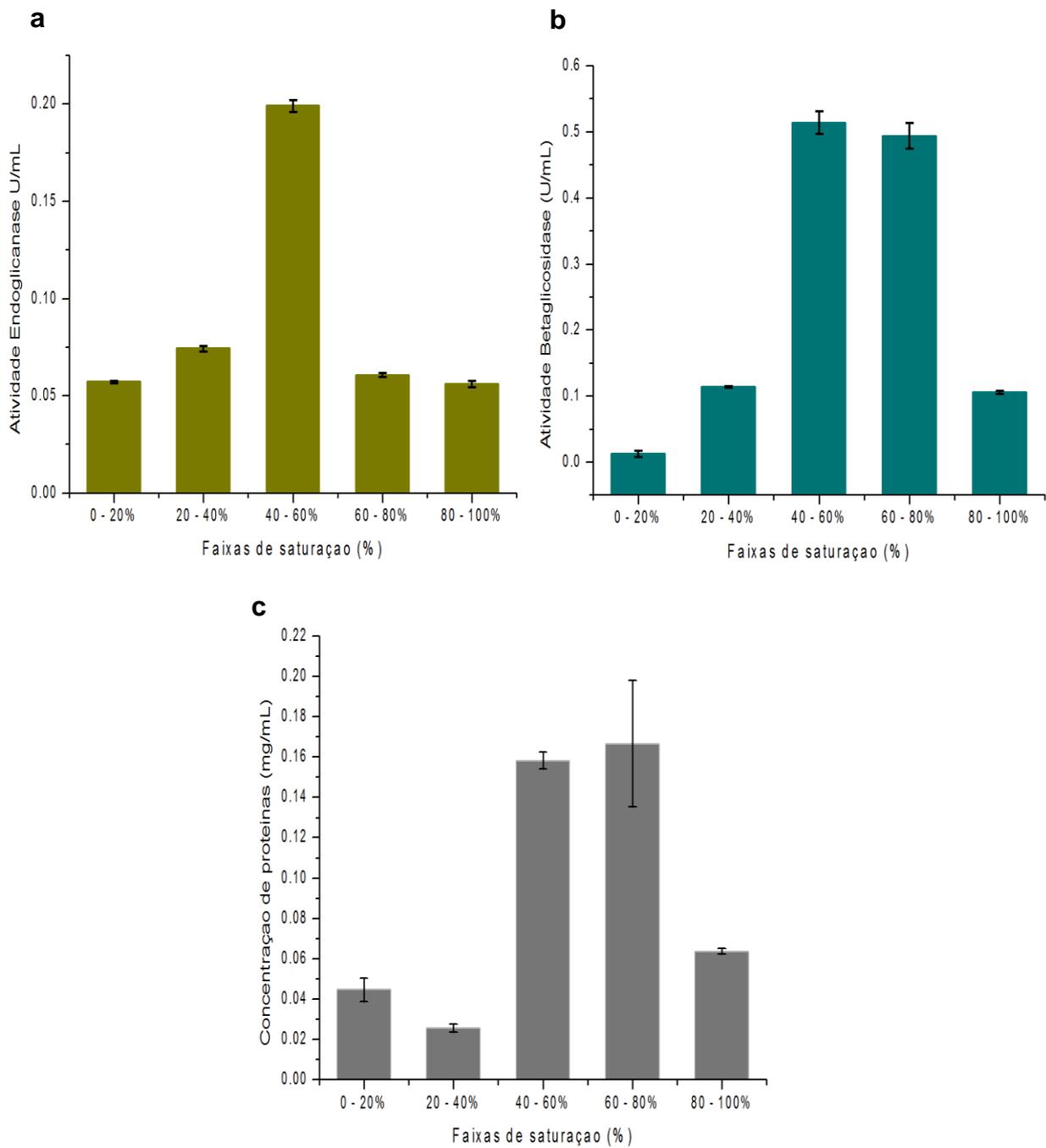
Desta forma optou-se por realizar uma precipitação direta no intervalo 0 a 75%, visto que compreenderia as faixas onde se obteve maior atividade observada para ambas as enzimas testadas, a fim de precipitar em uma única faixa, uma maior quantidade de proteínas com atividades de endoglicanases e beta-glicosidases e então, prosseguir para a etapa seguinte de cromatografia por gel filtração.

FIGURA 24 - Gel de poliacrilamida 12% das proteínas precipitadas com sulfato de amônio.



Faixas de saturação com sulfato de amônio: Linhas: 1= 80 a 100%, 2= 60 a 80%, 3=40 a 60%, 4= 20 a 40%, 5 = 0 a 20 %. M= marcador molecular.

FIGURA 25 - Atividades enzimáticas e concentração de proteínas do precipitado nas faixas de saturação (%) de sulfato de amônio.



(a) Atividade endoglicanase, (b) Atividade beta-glicosidase, (c) Concentração de proteínas totais (mg/mL). Medias e desvios-padrão (N=3)

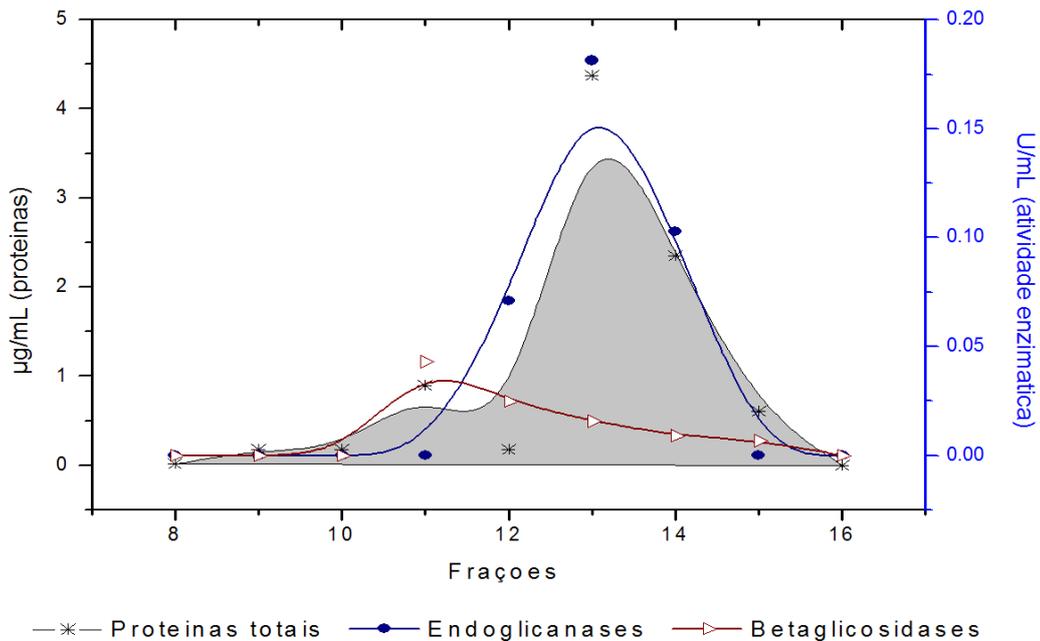
Para a precipitação direta nas faixas de saturação de 0 a 75% de sulfato de amônio, utilizou-se 10 mL de extrato bruto dos períodos de 72 a 216h de FS, o precipitado foi ressuspendido em tampão citrato 50mM, pH 4,8. Um volume de 0,5 mL do precipitado (0-75%) ressuspendido foi aplicado na coluna Superdex 75 10/300 GL, a eluição das proteínas foi monitorada através da leitura a 280nm, as frações que obtiveram picos no cromatograma gerado foram coletadas e dosadas quanto ao teor de proteínas e nas frações onde se detectou presença de proteínas foram realizados os ensaios de atividade enzimática. Na FIG. 26 observa-se o perfil de atividade enzimática de endoglicanases e beta-glicosidases nas frações com presença de proteínas. A concentração de proteínas foi detectada em maior quantidade a partir da fração 11 até a 15, e foram nestas faixas que se encontraram também as atividades enzimáticas (FIG. 26).

A atividade de endoglicanases foi verificada nas frações 12 (0,071 U/mL), 13 (0,181 U/mL) e 14 (0,103 U/mL), mas os valores obtidos na fração 13 mostraram diferença estatística significativa (ANOVA; $p < 0,01$), sendo considerada com a atividade a mais alta. Atividade de beta-glicosidases ocorreu nas frações 11, 12, 13, 14 e 15, no entanto, as frações 11 (0,043 U/mL) e 12 (0,025 U/mL) apresentaram atividade mais elevada do que nas outras frações (ANOVA, $p < 0,01$). A atividade beta-glicosidásica das frações 13, 14, 15 foram muito baixas com valores de 0,016; 0,009 e 0,007 U/mL. Na FIG. 21 está sendo representado o perfil eletroforético em gel SDS-Page 12% de poliacrilamida, das frações com proteínas de 8 até a fração 15, observou-se que nas frações 13 e 14 foram mais expressas bandas de proteínas com massas moleculares de ~ 35 kDa, bandas de proteínas que apresentaram o mesmo padrões de massa molecular também apareceram na amostra do precipitado de 0 a 75% de saturação, na amostra do extrato bruto e com menos concentração na fração 15. As bandas de ~ 35 kDa não apareceram nos poços correspondentes as frações 8, 11 e 12.

Na fração 8, devido a concentração de proteínas ter sido muito baixa não foi possível a visualização das mesmas no gel, nas frações 11 e 12 a concentração proteica também foi baixa (FIG. 26), mas foi possível visualizar bandas de massa molecular de ~ 100 kDa (FIG. 27) sendo mais evidentes na fração 11. Bandas de ~ 100 kDa também foram observadas nas amostras do precipitado. Outros processos de purificação poderiam ainda ter sido utilizados, como a cromatografia

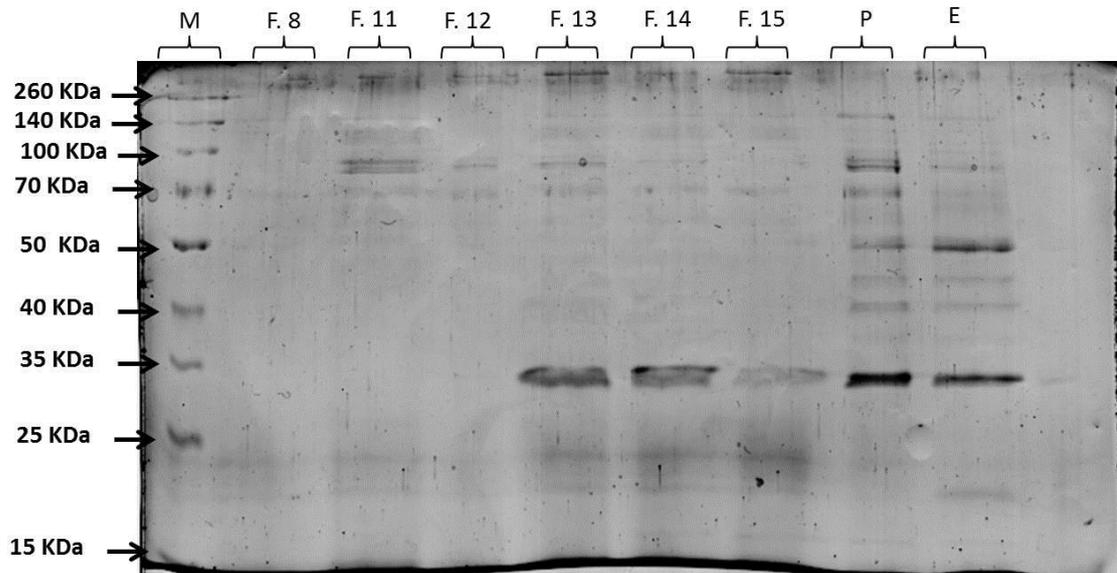
de troca iônica, mas como o grau de pureza de uma proteína depende da finalidade do seu uso, e nesse caso o objetivo foi apenas inferir a massa molecular aproximada das endoglicanases e beta-glicosidases produzidas por *P. citrinum*, utilizou-se a cromatografia de gel filtração que separa as moléculas pelo seu tamanho, neste processo as moléculas maiores eluem mais rápido e saem nas frações iniciais eluidas pela coluna, enquanto que as partículas menores apresentam uma velocidade de eluição menor saindo nas frações posteriores, e nas ultimas frações saem os sais oriundos da etapa anterior, de precipitação.

FIGURA 26 - Perfil de atividade enzimática (U/mL) e teor de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) das frações eluidas em coluna de gel filtração Superdex 75 10/300 GL.



Área colorida: refere-se à concentração de proteínas totais. Ensaios enzimáticos em triplicata.

FIGURA 27 - Gel de poliacrilamida 12% das frações com proteínas e atividade enzimática, coletadas da gel-filtração na coluna Superdex 75.



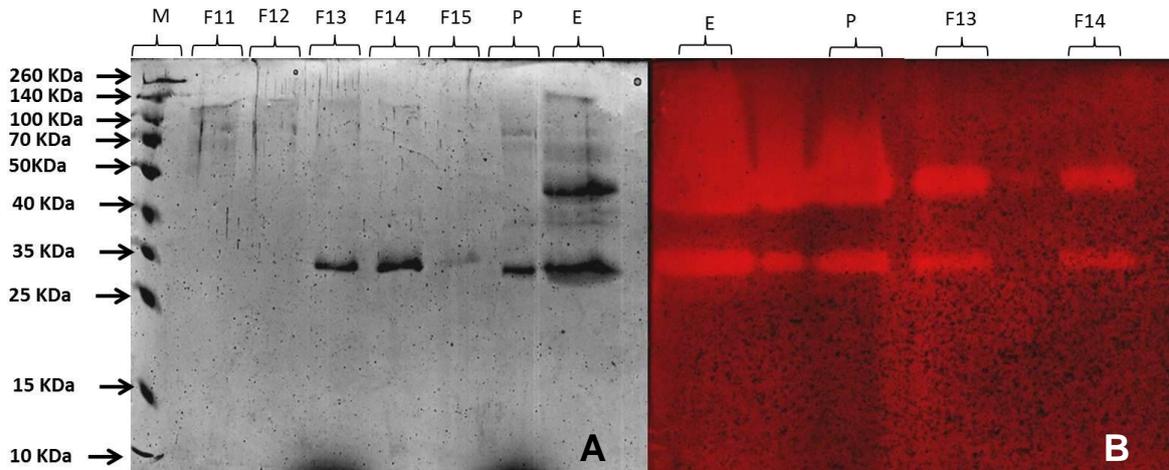
M: Marcador, F8: fração 08, F11: fração 11, F12: fração 12, F13: fração 13, F14: fração 14, F15: fração 15, P: amostra da precipitação (0 a 75% de saturação com sulfato de amônio), E: extrato bruto.

6.12 Zimografia para endoglicanases

As amostras das frações 13 e 14 correspondentes às atividades mais elevadas de endoglicanases foram aplicadas em gel de SDS-PAGE contendo 1,5% do substrato da enzima (CMC) no gel separador. As amostras do extrato bruto e do precipitado (0 a 75% de saturação) também foram aplicadas no gel de zimograma.

Foi possível visualizar bandas com formação de halo indicando a degradação do CMC presente no gel (FIG. 28 B). Nas frações 13 e 14 foram verificadas a presença de duas bandas com halo de degradação, sendo uma correspondente a massa molecular de ~ 50kDa e outra a ~ 35kDa, porém no gel corado com Commasie *blue* (FIG 28 A) não foram visualizadas bandas de 50kDa nas frações 13 e 14.

FIGURA 28 – Zimograma em Gel SDS-PAGE para endoglicanases



A: Gel de SDS-Page 12% corado com Comassie blue B: Atividade de endoglicanase em gel SDS-PAGE (1,5% de CMC), corado com Congo red e descorado com NaCl 1M. M: marcador, F11: fração 11, F12: fração 12, F13: fração 13, F14: fração 14, F15: fração 15, P: amostra da precipitação (0 a 75% de saturação com sulfato de amônio), E: extrato bruto.

6.13 Determinação da massa molecular aproximada de endoglicanase e beta-glicosidase de *P.citrinum*

A massa molecular de beta-glicosidases produzidas por micro-organismos variam de 45 a 250 kDa (MAHESHWARI *et al*, 2000). No presente trabalho, conforme foi visualizado em gel de SDS-PAGE (FIG. 27), nas frações 11 e 12 as bandas mais evidentes observadas foram as com massa molecular de ~ 100kDa. Ressalta-se que nos ensaios de atividade enzimática, a fração 11 destacou-se por apresentar apenas atividade de beta-glicosidases, não sendo encontrada atividade de endoglicanase nesta fração. Dessa forma pode-se inferir que as beta-glicosidases produzidas por *P.citrinum* neste estudo, possuem peso molecular de aproximadamente 100kDa. Resultados próximos foram encontrados por Ramani e colaboradores (2012) onde, após purificar enzimas celulolíticas produzidas por *Penicillium funisicolum* encontraram uma beta-glicosidase de peso molecular 120kDa. Outros fungos do gênero *penicillium* também foram descritos por secretarem beta-glicosidases com massas moleculares de tamanhos relativamente grandes como *P. funiculosum* NCL1 que produz beta-glicosidases de ~ 120kDa, *P.*

citrinum YS40-5 com beta-glicosidades de ~ 130 kDa (SON *et al.* 2010; RAMANI, 2012).

Muitos fungos filamentos possuem sistemas celulolíticos que produzem múltiplas endoglicanases de tamanhos moleculares diferentes. Maheshwari cooperadores (2000) relatam que as endoglicanases possuem massa molecular de 32 a 100kDa. Em um estudo realizado por Sun e co-autores (2008) foram encontradas duas endoglicanases com massas moleculares de 34kDa e 45 kDa produzidas por *Penicillium decumbens*.

No presente trabalho, o perfil eletroforético e a atividade em gel de poliacrilamida das frações 13 e 14 (FIG. 27 e 28), revelou a presença de bandas correspondentes a ~ 35kDa e a formação de halo de atividade de endoglicanases na mesma altura de massa molecular. No gel de atividade verificou-se também halos de degradação enzimática na altura de massa de ~ 50kDa que aparentemente não foram vistas em gel SDS-PAGE, mas ainda que a enzima de ~ 50kDa não tenha sido detectada no gel de SDS-PAGE, ela foi confirmada no gel de atividade corado com Congo *red*. Esse resultado demonstra que *P. citrinum* produziu diferentes enzimas com atividade de endoglicanase,

O fato de a banda correspondente a 50kDa não ter sido visualizada no gel corado com Commassie *blue* pode estar relacionado com a quantidade de proteína. Possivelmente nas frações 13 e 14 houve uma maior concentração de proteínas correspondentes, em termos de quantidade à enzimas endoglicanásicas de massa molecular 35kDa. Esse resultado demonstra que a enzima de ~ 50kDa possui uma atividade elevada, visto que em pouca concentração, não visualizadas no gel, ainda foi capaz de degradar o substrato, formando os halos visualizados no zimograma.

7.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos nesta dissertação, pode-se concluir que:

- ✓ O alinhamento das sequencias obtidas na amplificação do gene rDNA 28S com as depositadas no banco de dados NCBI confirmou a estirpe estudada como *Penicillium citrinum*, com 99% de identidade;
- ✓ A alta produção de endoglicanases por *T. reesei QM9414* e *P. citrinum* em relação às outras enzimas do complexo celulolítico, parece demonstrar que a fonte de carbono utilizada (carboximetilcelulose) foi mais eficaz na indução da secreção de endoglicanases;
- ✓ *T. reesei QM9414* possui níveis mais elevados de proteínas totais do que *P. citrinum*. Concentração média de proteínas no extrato enzimático bruto de todos os períodos de FS: *T. reesei QM9414* (0,049 mg/mL), *P. citrinum* (0,032 mg/mL);
- ✓ A atividade média de celulases totais (FPASE) é mais elevada em termos de atividade volumétrica para *T. reesei QM9414* (0,079 U/mL) do que para *P. citrinum* (0,062 U/mL).
- ✓ Em relação à atividade específica de FPASE média, *P. citrinum* possui valor mais alto (2,06 U/mg) comparado a *T. reesei QM9414* (1,66 U/mg);
- ✓ *QM9414* possui atividade de endoglicanases volumétrica média (0,64 U/mL) superior a *P. citrinum* (0,48 U/mL);
- ✓ A atividade específica de endoglicanases possuem valores mais altos em *P. citrinum* (14,75 U/mg) do que *T. reesei QM9414* (12,54 U/mg);
- ✓ As proteínas extracelulares do sobrenadante de cultivo de *P. citrinum* são altamente representadas por enzimas do complexo celulolítico;

- ✓ *T. reesei* QM9414 apresenta valores de atividade específica menores do que *P. citrinum*, devido a sua elevada produção de proteínas totais;
- ✓ Os picos de atividade enzimática de *P. citrinum* durante a FS ocorrem em: FPASE: 72 e 168h para atividade volumétrica (U/mL) e 72h e 144h para atividade específica (U/mg); Endoglicanases: 72h e 168h para atividade volumétrica e 72h e 144h para atividade específica; Exoglicanases: 96h e 144h para atividade volumétrica e somente em 96h para atividade específica; Beta-glicosidases: 120h para atividade volumétrica e específica;
- ✓ *T. reesei* QM 9414 apresenta picos de atividade enzimática em: FPASE: 72h e 120h (em U/mL) e 48h e 120h (em U/mg). Endoglicanases: 72h e 168h (em U/mL) e 72h e 144h (em U/mg); Exoglicanases: 96h e 168h para atividade volumétrica e específica; Beta-glicosidase: 72h e 216h para atividade volumétrica e específica;
- ✓ A atividade Avicelase, correspondente à ação de exoglicanases, possui perfil parecido nas duas espécies *P. citrinum* e *T. reesei* QM 9414, com níveis elevados no tempo de 96h de FS, tanto em U/mL quanto em U/mg;
- ✓ Na produção de beta-blicosidases, *P. citrinum* possui desempenho superior a *T. reesei* QM 9414. Atividade volumétrica média: *T. reesei* QM 9414 (0,008 U/mL); *P. citrinum* (0,028 U/mL). Atividade específica média: *T. reesei* QM 9414 (0,162 U/mg); *P. citrinum* (0,772 U/mg);
- ✓ As endoglicanases produzidas por *P. citrinum* apresentam atividade mais elevada em pH's na faixa ácida. A atividade mais alta é em pH 4,2 (0,205 U/mL);
- ✓ As beta-glicosidases de *P. citrinum* possuem melhor desempenho em pH's menos ácidos. Sendo que em pH 6,0 a atividade é mais elevada (0,038 U/mL);

- ✓ A temperatura ótima para atuação das endoglicanases de *P. citrinum* é 60°C em pH 4,2; pH 4,6 e pH 5,0;
- ✓ A temperatura ótima para a atividade das beta-glicosidases de *P. citrinum* é 60°C, em pH 5,0; 5,4 e 6,0;
- ✓ As endoglicanases e beta-glicosidases de *P. citrinum* são estáveis nas temperaturas 60°C e 50°C, mantendo a atividade relativa elevada. E instáveis em 70°C, apresentando decréscimos significativos na atividade.
- ✓ *P. citrinum* produz duas endoglicanases de massa molecular ~ 50kDa e ~ 35kDa.
- ✓ A beta-glicosidase de *P. citrinum* parece ter massa molecular de aproximadamente 100kDa.

A partir das conclusões deste trabalho tem-se como perspectivas:

- ✓ Estudar o efeito de variadas fontes de carbono na produção das três classes de enzimas celulolíticas.
- ✓ Otimizar o processo de fermentação afim de aumentar a produção, modificando pH's, fontes de nitrogênio e concentração de inóculo.
- ✓ Buscar novas fontes de nutrientes de baixo custo econômico que permitam a uma produção elevada de enzimas celulolíticas;
- ✓ Separar as enzimas celulolíticas do complexo enzimático, analisá-las separadamente quanto aos seus parâmetros termodinâmicos, efeitos inibitórios e graus de sinergismo.
- ✓ Estudar a interação das enzimas celulolíticas de *P. citrinum* com celulasas de outros micro-organismos visando à máxima produção de glicose em coquetéis enzimáticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. **Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMS as fed batch in a stirred tank bioreactor.** Biochem. Eng. J. v. 42, p.41-46, 2008.

ALCARDE, A.R. **Pós-produção, Processamento da cana-de-açúcar, Tratamento do caldo, Fermentação.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Embrapa, 2007. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeacucar/arvore/CONTAG01_10_5_22122006154841.html. Acesso : 04/08/2012.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia.** 382 p. Editora UFV, Viçosa, 2007.

AMOREA, A., FARACO, V. **Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 16, p.3286 - 3301, 2012.

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica (Brasil). **Atlas de energia elétrica do Brasil /Agência Nacional de Energia Elétrica. Parte II. Fontes Renováveis.** 3.ed. Brasília, 2008.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. **Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates.** Biotechnology for Biofuels. 4:3, 2011

BALSAN, G. *et al.* **Characterization of a commercial cellulase for hydrolysis of agroindustrial substrates.** Bioprocess Biosyst. Eng. 35(7):1229–37, 2012.

BASSO, T.P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei*.** 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BASSO, T.P.; ROSA, C.; BASSO, C. L. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição**. *Pesq. agropec. bras.* Brasília. v.45, n.11, p.1282-1289, 2010.

BECKHAM GT, *et al*: **Molecular-level origins of biomass recalcitrance: decrystallization free energies for four common cellulose polymorphs**. *J Phys Chem B*, v. 115 , p. 4118-4127, 2011.

BRADFORD, M. M.; **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Anal. Biochem.* v. 72, p.248, 1976.

BURGESS, R.R.; DEUTSCHER, M.P. **Methods in Enzimology**. V. 463, Elsevier, p. 373 – 384. 2009.

CANILHA, L. *et al*. **Sacarificação Da Biomassa Lignocelulósica Através de Pré-Hidrólise Ácida Seguida por Hidrólise Enzimática: Uma Estratégia de “Desconstrução” da Fibra Vegetal**. *Revista Analytica*, n. 44, 2009.

CARVALHO, S.M.S. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de etanol em meio melaço-vinhoto empregando leveduras imobilizadas**. 187p. Tese (Doutorado em biotecnologia) – Programa multi-Institucional de Pós-graduação em biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 2006.

CASTELLANI, A. **The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water**. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 225-226, 1939.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Jr. **Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais**. *Química Nova*, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

CAVACO-PAULO, A. **Mechanism of cellulase action in textile processes**. *Carbohydr Polym.* v. 37, p. 273–277, 1998.

DESVaux, M.; **The cellulosome of Clostridium cellulolyticum**. *Enzyme and Microbial Technology*. v.37, p. 373–385, 2005.

DUTTA, T. *et al.* **Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 35(4):275–82, 2008.

GOTTSCHALK, L. M. F. *et al.* **Microrganismos na produção de etanol.** Agroenergia em Revista (Embrapa Agroenergia). 5 ed. p. 10. 2013.

EICHHORN, J. Stephen; **Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications.** Soft Matter,7, 303-315, 2011.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. **Precipitation Techniques.** Methods Enzymol., v. 182, p. 285-300, 1990.

FUJII, T. *et al.* **Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials.** Biotechnol Biofuels. v. 2, p.24, 2009.

GAN, Q.; ALLEN, S.J.; TAYLOR, G. **Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling.** Process Biochemistry. v. 38, p. 1003/1018, 2003.

GHORI, M. I. *et al.* **Kinetics of exoglucanase and endoglucanase produced by *Aspergillus niger* NRRL 567.** African Journal of Biotechnology Vol. 11, p. 7227-7231, 2012.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities.** Pure & App. Chem., Vol. 59, N. 2, p. 257—268, 1987.

HENRISSAT, B. **Cellulases and their interaction with cellulose.** Cellulose review Joseph Fourier University of Grenoble. p. 169-196, 1994.

HEUSSEN C.; DOWDLE, E. B. **Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates.** Analytical Biochemistry, 102,196-202, 1980.

HIDENO A, INOUE H, TSUKAHARA K, I. **Enzyme and Microbial Technology Production and characterization of cellulases and hemicellulases by**

***Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source.** Enzyme Microb. Technol. 48(2):162–168. 2011.

HOLTZAPPLE, M.T.; HUMPHREY, A.E. **The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar.** Biotechnology and Bioengineering. 26, 670–676, 1984.

HORN, S. J. *et al.* **Novel enzymes for the degradation of cellulose.** Biotechnology for Biofuels. v. 5, p. 45, 2012.

HOUBRAKEN, J.A.M.P.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species.** Fungal Divers. v.44, p.117–133, 2010.

HOUBRAKEN, J. P. *et al.* **Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*.** Studies in Mycology. v. 70, p.53–138. 2011.

SON, N. I. *et al.* **High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran.** Bioresour. Technol. v. 101, p.7, 2010.

JALAK, J. *et al.* **Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited.** J. Biol. Chem. v. 34, p. 28802–15, 2012.

JEFFRIES, T. W. **Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes.** Biodegradation, 1: 163, 1990.

KOLSTAD, V. G. *et al.* **An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides.** Science. v. 330 p. 219–222, 2010.

KROGH, K.B.R. *et al.* **Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes.** Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 16, p. 389-401, 2004.

KUHAD, R.C.; GUPTA, R.; SINGH, A. **Microbial cellulases and their industrial applications.** Enzyme Res. 10 p., 2011.

KUPAI, K. *et al.* **Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. v. 61, p.205–209, 2010.

LAEMMLI U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227(5259): 680-5, 1970.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** 3a Ed. São Paulo: Sarvier, 975p., 2002.

LOMBARD V. *et al.* **The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013.** Nucleic Acids Res 42:D490–D495. PMID: 24270786. Carbohydrate Active Enzymes database (<http://www.cazy.org/>) Acessado em 10/03/2014.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIUS, I.S.; **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 66, p.506, 2002.

MAEDA R. N., BARCELOS C. A., SANTA ANNA L. M. M., PEREIRA JR. N. **Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation.** Journal of Biotechnology 163, 38– 44, 2013.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. **The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass.** International Journal of Biological Sciences. v.5, p.500-516, 2009.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. v. 64, p.461-488, 2000.

MARJAMAA K, TOTH K, ANDREW P, SZAKACS G. **Enzyme and Microbial Technology Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics.** Enzyme Microb. Technol. v. 52, p. 358–369, 2013.

MARJAMAAA K. *et al.* **Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics.** Enzyme and Microbial Technology. v.52, p.358– 369, 2013.

MARTINS L. F. *et al.* **Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates.** *Bioresource Technology*. v. 99, p.1417–1424, 2008.

MCILVAINE, T. C. **A buffer solution for colorimetric comparison.** *J. Biol. Chem.*, v. 49, p. 83-186, 1921.

MIETTINEN-OINONEN, A. **Cellulases in the textile industry.** *Industrial Enzymes*, Springer. v. 51, p.63, 2007.

MILLER GL. **Use of DNS reagent for the measurement of reducing sugar.** *Anal Chem*. v.31, p.426-428, 1959.

MOHANRAM, S. *et al.* **Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries.** *Sustainable Chemical Processes*, v.1, p.15, 2013.

MOSER F, IRWIN D, CHEN SL, WILSON DB: **Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8.** *Biotechnol Bioeng*. v.100, p.1066–1077, 2008.

MOSS M O. **Morphology and Physiology of *Penicillium* and *Acremonium*.** *Biotechnology Handbooks*. p 37-71, Springer US, 1987.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. **Hidrólise Enzimática da Biomassa.** *Química Nova*, Vol.33 No. 7, São Paulo, 2010.

OLUTIOLA, P.O; AKINTUNDE, O.A. **Pectin lyase and pectin methylesterase production by *Penicillium citrinum*.** *Trans. Br. Mycol. Soc.* v.72, p.49–55, 1979.

POSADA, F.M. *et al.* **Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales).** *mycological research*. v.111, p.748–757, 2007.

PLAZA, G. A. *et al.* **Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification.** *Polish Journal of Environmental Studies*. v. 13, p. 315-318, 2004.

RATHNAN, R.K.; NAIR, P. **Isolation, Identification and Characterization of Efficient Cellulolytic Fungi from Natural Resources**.:379–387, 2012.

ROBERT, V.; STEGEHUIS, G.; STALPERS, J. MycoBank- International Mycological Association. **Fungal Databases Nomenclature and Species Banks**. Disponível em: <http://www.mycobank.org>. Acesso em 15 de Mar. 2013.

ROYERA, J. C. *et al.* **Penicillium Genomics**. Applied Mycology and Biotechnology. Volume 4, Pages 285–293, 2004.

SCHUSTER A, SCHMOLL M. **Biology and biotechnology of Trichoderma**. Appl Microbiol Biotechnol. v.87, p. 787–99, 2010.

SAMSON, R.A., PITT, J.I. **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Harwood Academic, Amsterdam, pp 9–49, 2000.

SCHWARZ, W.H. *et al.* **Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage β -glucans**. Analytical Biochemistry. v. 164, p. 72–77, 1987.

SHOHAM, Y.; LAMED, R.; BAYER, E. A.; **The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides**. Trends in Microbiology. v.7, p. 275–281, 1999.

SILVA, L. A. O. *et al.* **Fungos filamentosos da microbiota amazônica produtores de celulases**. In: VI Simpósio Internacional de qualidade Ambiental, 2008, Porto Alegre. VI Simpósio Internacional de qualidade Ambiental, 2008.

SINGH, A. *et al.* **Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation**. International Journal of Civil and Environmental Engineering 1:1 2009.

SINGHANIA, R.R. *et al.* **Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production**. Bioresource. Technol. v.127, p.500–7, 2013.

SUN, Y., CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review**. *Bioresource Technology*. v. 83, 2002.

SUN, X.; LIU, Z; ZHENG, K.; SONG, X.; QU, Y.; **The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions**. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 42, p. 560–567, 2008.

SZIJÁRTO, N. *et al.* **Dynamics of cellulose production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.113-116. p.115-124.2004.

TANAKAA H. *et al.* **Purification and properties of an extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* and characterization of the encoding gene**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.100, Pages 623–630, 2005.

THOM ,C.; RAPER, K.B. **Manual of the *Penicillia***. Williams & Wilkins, Baltimore, 1949.

TOLAN, J.S. **logen's process for producing ethanol from cellulosic biomass**. *Clean Techn Environ Policy*. v.3, p.339–45, 2002.

U.S. Department of Energy Genomic Science program. Disponível em <<http://genomicscience.energy.gov> > Acesso em: 23 fevereiro 2014.

VANHOLME B. *et al.* **Towards a carbon-negative sustainable bio based economy**. *Frontiers in Plant Science*. Volume 4, Article 174, 2013.

VIAN, C.E.F. **Pós-produção, Álcool**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento /Embrapa, 2007. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeacucar/arvore/CONTAG01_110_22122006154841.html. Acesso em: 04/08/2012.

WILSON, D.B. **Cellulases and biofuels**. *Curr. Opin. Biotechnol.* v.20, p. 295–9, 2009.

WANG, J.; WANG, F.; SHANG, J.; CHEN, B. **An Efficient Method for Extraction of Secreted Proteins of a Filamentous Fungus, *Cryphonectria parasitica***. J Proteomics Bioinform 4: 125-128, 2011

WOOD, T.M.; BHAT, K.M. **Methods for measuring cellulase activities**. Methods Enzymol; 160:87–117, 1988.

WYMAN, C. E. *et al.* **Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose**. Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility, 2 ed., 2004.

XU, Q.; ADNEY, W.S.; DING, S.Y.; HIMMEL, M. E.. **Cellulases For Biomass Conversion**. In: POLAINA J.; MacCabe A.P. (Eds.). Industrial Enzymes, 35–50, 2007.

ZAMPIERI, D.; GUERRA, L.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. **Secretion of endoglucanases and glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources**. Ind. Crop. v. 50, p. 882–886, 2013.

ZHANG, Y.H. P., HONG, J., YE, X. **Cellulase Assays**. Methods in Molecular Biology. 581:213–231, 2009.

ZHENG ZHANG, SCOTT SCHWARTZ, LUKAS WAGNER, and WEBB MILLER (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

ZHOU, C.; WU, Q. **Recent Development in Applications of Cellulose Nanocrystals for Advanced Polymer-Based Nanocomposites by Novel Fabrication Strategies**. Nanocrystals - Synthesis, Characterization and Applications, 2012. Retirado de < <http://www.intechopen.com/books/nanocrystals-synthesis-characterization-and-applications/recent-development-in-applications-of-cellulose-nanocrystals-for-advanced-polymer-based-nanocomposit> > acessado em 24 janeiro 2014.