

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FS
CURSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FAR

LAÍSSA VERÔNICA BERNARDES PEREIRA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO FILAMENTOSO
Penicillium funiculosum E POSSÍVEIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

BRASÍLIA - DF

2016

LAÍSSA VERÔNICA BERNARDES PEREIRA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO FILAMENTOSO
Penicillium funiculosum E POSSÍVEIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Farmácia, da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Janice Lisboa de Marco.

BRASÍLIA - DF

2016

RESUMO

PEREIRA, Laíssa Verônica Bernardes. Avaliação da produção de celulases pelo fungo filamentoso *Penicillium Funiculosum* e possíveis aplicações biotecnológicas. 2016. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Graduação em Farmácia. Universidade de Brasília, Brasília.

As celulases são enzimas capazes de degradar a celulose que possuem aplicações em diversas áreas, como indústria alimentícia, têxtil e de papel. Estas celulases são produzidas por diversos organismos, entre eles os fungos filamentosos. Até o presente momento, são conhecidos três componentes enzimáticos produzidos por esta classe de fungos: as endoglucanases, as exoglucanases (celobiohidrolases) e as β -glucosidases. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de celulases pelo fungo filamentoso *Penicillium funiculosum*, no meio de cultivo batata, dextrose e ágar (BDA). O fungo foi cultivado nesse meio de cultura durante 15 dias à temperatura de 28°C. Os esporos foram coletados e inoculados posteriormente em meio líquido contendo como fonte de carbono, Avicel, para indução das celulases. Os frascos contendo os inóculos foram incubados à temperatura de 28°C durante 192h em agitador orbital a 150 rpm (rotações por minuto). Posteriormente, realizou-se a concentração do sobrenadante contendo as enzimas do sistema celulolítico. Esse material foi concentrado 19 vezes e foram utilizados para determinação da atividade enzimática de endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase. A seguir, iniciamos o processo de purificação enzimática acompanhada de eletroforese das frações obtidas pela cromatografia. O presente estudo demonstrou que a metodologia aplicada é consideravelmente eficiente, tendo sido obtido altas atividades enzimáticas, principalmente da β -glucosidase e o isolamento parcial de β -glucosidases e exoglucanases, mostrando que se trata de uma metodologia de purificação viável de celulases com potencial aplicação biotecnológica.

Palavras-Chave: *Penicillium funiculosum*, β -glucosidase, celulase, exoglucanases, purificação enzimática.

ABSTRACT

PEREIRA, Laíssa Verônica Bernardes. Avaliação da produção de celulases pelo fungo filamentoso *Penicillium Funiculosum* e possíveis aplicações biotecnológicas. 2016. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Graduação em Farmácia. Universidade de Brasília, Brasília.

Cellulases are enzymes capables of cellulose degradation. They have applications in several areas, such as food, textile and paper industries. These cellulases are produced by various organisms, among them is filamentous fungi. Until this date, three enzymatic components produced by this class of fungi are known: endoglucanases, exoglucanases (cellobiohydrolases) and β -glucosidases. The objective of this study was to evaluate the cellulases production by the filamentous fungus *Penicillium funiculosum* inside a potato, dextrose and agar (BDA). The fungus was harvest in this culture way for 15 days at 28 ° C. The spores were collected and later inoculated in a liquid environment containing Avicel as the carbon source for the induction of cellulases. The flasks containing the inoculums were incubated at 28 ° C for 192h on orbital shaker at 150 rpm (rotations per minute). Subsequently, the concentration of the supernatant containing the enzymes of the cellulolytic system was performed. This material was concentrated 19 times and was used to determine the enzymatic activity of endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase. Next, we started the process of enzymatic purification accompanied by electrophoresis of the fractions obtained by the chromatography. This study demonstrated that the applied methodology is considerably efficient, obtaining high enzymatic activities, mainly β -glucosidase and the partial isolation of β -glucosidases and exoglucanases, showing that it is a viable purification methodology of cellulases with potential Biotechnology application.

Key-Words: *Penicillium funiculosum*, β -glucosidase, cellulase, exoglucanases, enzymatic purification.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - graus *Celsius*

CBH I - celobiohidrolase I

CMC - carboximetilcelulose

DNS – ácido dinitrosalicílico

EC – *Enzyme Comissio*

g - grama

h - hora

L – litro

m/v - relação massa/volume

MIC – meio de indução de celulase

MPM – meio de produção de micélio

pNP – pranitrofenol

pNPC – para nitrofenil- β -D- celobiosídeo

pNPG – para-nitrofenil- β -D-glicosídeo

rpm - rotação por minuto

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE - Docedilsulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida

SHF - Fermentação e Hidrólise Separadas

SSF - Fermentação e Hidrólise Simultâneas

TEMED - N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio

Tris - Tris(hidroximetil) aminometano

v/v - relação volume/volume

μ g – microgramas

μ L – microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - a) Gráfico da curva padrão para dosagem de glicose b) Gráfico da curva padrão para dosagem de paranitrofenol.

Figura 2 - Cromatograma do extrato bruto concentrado aplicado em coluna de gel filtração HiLoad 16/600 Superdex de 200 µg.

Figura 3 – Atividades enzimática de: a) endoglucanases b) β-glucosidases c) exoglucanases (celobiohidrolases).

Figura 4 - SDS-PAGE com gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Comassie; Amostras: M – marcador de massa molecular em kiloDaltons (kDa); 1 – Extrato bruto concentrado 19x; 2 a 7: Frações 44 a 49, sequencialmente.

Figura 5 - SDS-PAGE com gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Comassie; Amostras: M – marcador de massa molecular em kiloDaltons (kDa); 1 – Extrato bruto concentrado 19x; 2 a 7: Frações 50 a 56, sequencialmente.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados na preparação no meio de produção de micélio (MPM)

Tabela 2 - Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador 4%

Tabela 3 - Reagentes utilizados na preparação do gel separador 12%

Tabela 4 - Reagentes utilizados na preparação do tampão de amostra

Tabela 5 - Reagentes utilizados na preparação do tampão de corrida 5X.

SUMÁRIO

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. | OBJETIVOS | 11 |
| 2.1. | OBJETIVO GERAL | 11 |
| 2.2. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 3. | REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 3.1. | FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS | 12 |
| 3.1.1. | CELULOSE | 12 |
| 3.1.2. | LIGNINA..... | 13 |
| 3.1.3. | HEMICELULOSE | 13 |
| 3.2. | CELULASES | 14 |
| 3.2.1. | CLASSIFICAÇÃO DAS CELULASES..... | 14 |
| 3.3. | CELULASES- FÚNGICAS..... | 15 |
| 3.4. | APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS CELULASES | 15 |
| 3.4.1. | HIDRÓLISE DE SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL | 16 |
| 3.5. | GÊNERO PENICILLIUM | 16 |
| 3.6. | PENICILLIUM FUNICULOSUM..... | 17 |
| 4. | METODOLOGIA | 18 |
| 4.1. | MICROORGANISMO..... | 18 |
| 4.2. | CULTIVO DE P. FUNICULOSUM | 18 |
| 4.3. | EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA | 19 |
| 4.4. | DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA DOSAGEM DE GLICOSE | 19 |
| 4.5. | DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA DOSAGEM DE PARANITROFENOL (PNP) | 19 |
| 4.6. | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS CELULASES..... | 20 |
| 4.6.1. | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM CARBOXIMETILCELULOSE (CMC)..... | 20 |
| 4.6.2. | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM P-NITROFENIL-B-D- GLICOPIRANOSÍDEO (PNPG) | 20 |
| 4.6.3. | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM P-NITROFENIL-B-D- CELOBIOSÍDEO (PNPC) | 21 |
| 4.7. | PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS..... | 21 |
| 4.8. | ELETROFORESE | 22 |
| 4.8.1. | PREPARO DOS GÉIS | 22 |
| 4.8.2. | PREPARO DAS AMOSTRAS | 23 |
| 4.8.3. | ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)..... | 23 |
| 4.8.4. | COLORAÇÃO | 24 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 25 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 6. CONCLUSÃO | 30 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 31 |

1. INTRODUÇÃO

As celulasas são enzimas que hidrolisam as ligações $\beta(1-4)$ da celulose e atuam de forma sinérgica como um sistema multicomponente na degradação da celulose. Ainda na década de 90, já representavam mais de 20% do mercado de consumo mundial de enzimas (CASTRO, 2010).

Atualmente, as celulasas representam a terceira maior indústria de enzimas em todo o mundo, em volume de dólares negociados, devido à sua utilização em diversas áreas da indústria, como durante o processamento de algodão, na reciclagem de papel, na formulação de detergente, na extração de sucos, em produtos dermatológicos, em pigmentos, na extração de óleo vegetal, na produção de álcool, como adjuvante para malte na fabricação de cerveja, sendo também utilizadas como constituintes de rações animais, seu primeiro uso, e em indutores de silagem (WILSON, 2009)

Além disso, tais enzimas são utilizadas principalmente na produção de etanol de segunda geração que utiliza a biomassa como principal substrato, sendo assim, um combustível alternativo de baixa poluição, rentável e econômico (WILSON, 2009).

Dessa forma, o maior uso dessas enzimas está presente na produção de etanol, sendo um grande limitador dessa produção, devido às altas quantidades necessárias e o fato das celulasas serem responsáveis por até 18% do custo operacional (DELABONA, 2012; CASTRO, 2010).

Devido estes fatores, há diversos estudos e pesquisas dessas celulasas, em busca por células mais eficientes e um aprimoramento dos métodos industriais que reduzam esse custo, melhorem a qualidade e aumentem o seu rendimento (LYND, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho deve como objetivo a avaliação da produção de celulases pelo fungo filamentoso *Penicillium funiculosum*, utilizando-se meio batata, dextrose e ágar como fonte de energia e das suas possíveis aplicações biotecnológicas, através do seu cultivo, extração enzimática e a purificação parcial de alguma das celulases produzidas, determinando-se a sua atividade enzimática, principalmente da β -glucosidase e exoglucanase.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o cultivo de celulases pelo fungo filamentoso *Penicillium funiculosum*, utilizando-se meio batata, dextrose e ágar como fonte de energia;
- Realizar a extração enzimática;
- Avaliar a produção das celulases;
- Purificar algumas das celulases produzidas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Fibras lignocelulósicas

Materiais lignocelulósicos são as fontes renováveis mais abundantes encontradas na natureza, sendo compostas, em sua maioria, por materiais agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras provenientes de angiospermas e gimnospermas (CASTRO, 2010).

Essas biomassas são constituídas principalmente por três frações: celulose, hemicelulose e lignina em diferentes proporções dependendo das espécies consideradas, que através de ligações covalentes, formam uma resistente rede complexa responsável pela maioria das propriedades químicas e físicas das fibras, como a resistência a agentes externos, umidade, degradação, luz ultravioleta, ácidos e bases, além da estabilidade dimensional e termoplasticidade (JEFFRIES, 1990; LEÃO, 2000).

A forma e o tamanho da parede celular variam de espécie para espécie, assim como sua composição (CASTRO, 2010). Além disso, outros fatores influenciam como o vegetal de origem, a região de cultivo, o clima, a estação do ano e outros fatores (HASSUANI, 2005).

3.1.1. Celulose

A celulose é uma macromolécula polar e o principal componente da madeira e das fibras vegetais, sendo conseqüentemente, o polímero natural mais abundante encontrado na natureza. Trata-se de um polissacarídeo formado por unidades repetidas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas pelo carbono 4 e carbono 1 anomérico da posição β e contém aproximadamente 5 μ m de comprimento (D'ALMEIDA, 2007).

Como conseqüência dessas ligações β 1-4, a celulose apresenta uma forma helicoidal através de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares situando-se lado a lado, formando microfibrilas que se agregam umas às outras formando fibras

lignocelulósicas, essa conformação confere maior força e flexibilidade a estas fibras (D'ALMEIDA, 2007; CASTRO, 2006).

Cada camada também utiliza as forças de *Van Der Waals* para formarem fibras mais compactas, capazes de proteger o material da ação de enzimas e outros possíveis degradantes (LYND, 2002).

A celulose pode ser clivada por intermédio de enzimas, denominadas celulasas, que reconhecem as ligações entre as moléculas de glicose (ARISTIDOU, 2000).

3.1.2. Lignina

A lignina é uma molécula rica em substâncias aromáticas e está diretamente envolvida nas ligações entre moléculas de xilana e outros polissacarídeos. A diferença entre a lignina e outros compostos lignocelulósicos é que sua estrutura tridimensional não tem ligações repetidas entre seus constituintes, tendo então uma complexidade estrutural (FERREIRA, 2010).

Essa fração de lignina envolve as fibrilas da fração celulósica, conferindo força e flexibilidade, tendo a função de aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos, protegendo este material da ação das celulasas e hemicelulasas (CASTRO, 2006).

3.1.3. Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo amorfo ramificado que geralmente está ligado à lignina através de ligações covalentes e interagindo com a celulose por meio de ligações de hidrogênio (LIU, 2004).

A sua composição de carboidratos poliméricos é constituída principalmente pela xilana, que é o componente menos estável, e por xiloglicana, galactoglicomanana,

arabinogalactana e glicomanana (SHALLOM, 2003). A hemicelulose atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, concedendo uma maior flexibilidade (CASTRO, 2006).

3.2. Celulases

Celulases são enzimas que formam um complexo capaz de atuar na hidrólise de materiais com composição celulósica e dessa forma produzir açúcares fermentáveis (CASTRO, 2010). Trata-se de enzimas biocatalisadoras altamente específicas que atuam em sinergia para a liberação de açúcar, principalmente glicose que é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (LYND, 2002; DELABONA, 2012).

Essas enzimas podem ser produzidas por um amplo espectro de fungos filamentosos e bactérias, aeróbicas e anaeróbicas (LYND, 2002; PALOMER, 2004). Algumas leveduras também são produtoras de celulases (CASTRO, 2006).

3.2.1. Classificação das celulases

As celulases que compõem o complexo celulolítico são classificadas de acordo com as suas formas de ação em três grupos: as endoglucanases (EG) (EC 3.2.1.4) que clivam internamente as ligações glicosídicas β -1,4 na fibra celulósica; as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), que atuam progressivamente nas extremidades reductoras e não-reductoras de celulose; e as β -glucosidases (EC 3.2.1.21), que degradam a celobiose (dímero de glicose) até formar glicose (LYND, 2002).

É importante salientar que apenas esse complexo completo de enzimas celulases é capaz de hidrolisar completamente a celulose à glicose, todas colaboram sinergicamente para esse resultado, assim, ao atuarem isoladamente, possuem um baixo rendimento (BASSO et al, 2010; BEGUIN & AUBERT, 1994).

3.3. Celulases- fúngicas

Os fungos pertencem ao reino Fungi, maior reino eucariótico, que é dividido em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Apesar das celulases serem produzidas por bactérias e fungos, esses últimos são os organismos mais estudados com esse fim, devido a sua maior capacidade de produzir complexos celulolíticos completos em larga escala (LYND, 2002). Inclusive, na natureza, os fungos são os que desempenham o principal papel na degradação de biomassa de origem vegetal (BRINK, 2011).

Os fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola* e *Fusarium* são os mais utilizados devido a maior capacidade de produzir celulases, sendo o *Trichoderma* relatado como o mais eficiente na degradação da celulose (LYND, 2002).

3.4. Aplicações biotecnológicas das celulases

A produção de celulases em escala industrial iniciou-se na década de 80, com a finalidade de ser usada como aditivo de ração animal, aumentando a sua digestibilidade e rentabilidade, a fim de reduzir custos. Posteriormente, essas enzimas foram utilizadas na indústria de alimentos para clarificação de bebidas provenientes de frutas, como sucos e vinhos, além de participar da estabilidade destes produtos; também foi utilizada para melhorar propriedades sensoriais em massas (COELHO, 2008; CASTRO 2010).

As enzimas celulolíticas foram também empregadas em larga escala em indústrias têxteis para desfibrilação de tecidos como: algodão, lã e linho (biopolimento); amaciamento e desbotamento do brim (bioestonagem); na lavanderia para remoção de resíduos e maciez de tecidos, principalmente por amenizar o desgaste das peças durante esses processos de lavagem; na produção de polpa e papel para controlar e estabilizar

propriedades mecânicas da polpa e liberação da superfície de fibras recicláveis; (CASTRO 2010).

Finalmente, a maior aplicação dessas enzimas está na hidrólise de biomassas para a produção de etanol (DELABONA, 2012).

3.4.1. Hidrólise de substrato para produção de etanol

A hidrólise da celulose e a conversão dos açúcares em moléculas de interesse tal como o etanol pode ser conduzido de forma simultânea (processo SSF) ou sequencial (processo HSF) (CASTRO, 2010).

O processo SSF possui menor custo de investimento à planta, nesse processo as enzimas são menos passíveis de inibição pelos produtos de hidrólise, visto que a glicose liberada sofre o processo de fermentação em seguida, havendo uma manutenção de uma baixa concentração de glicose no meio, um equilíbrio das demais reações que estão ocorrendo, uma maior formação do produto e menor risco de contaminação do sistema (CASTRO, 2010).

Enquanto que no processo HSF possui a possibilidade de ambas as etapas ocorrerem em condições ótimas, além disso, as células podem ser recicladas ao sistema por não ter matéria-prima em suspensão durante a fermentação. No entanto, o acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise pode inibir as enzimas e há uma menor conversão da celulose, devido à adsorção do açúcar nos resíduos da hidrólise (CASTRO, 2010).

3.5. Gênero *Penicillium*

Devido ao bom desempenho na produção de celulases, diversas espécies de fungos do gênero *Penicillium*, esse gênero tem sido foco de inúmeras pesquisas (CASTRO, 2010; SKOMAROVSKY, 2005), principalmente pela alta atividade de β -glucosidase e das celobiohidrolases (CBH I) que são mais resistentes à inibição pela celobiose do que as

CBH I produzidas pelas *Trichoderma*, outro excelente produto, devido a seu sítio ativo ter uma configuração mais aberta (BHIRI, 2010).

3.6. *Penicillium funiculosum*

Devido ao bom desempenho das celulases produzidas por diversas espécies de fungos do gênero *Penicillium*, esse gênero tem sido foco de inúmeras pesquisas (CASTRO, 2010; SKOMAROVSKY, 2005), principalmente pela alta atividade de β -glucosidase e das celobiohidrolases (CBH I) que são mais resistentes à inibição pela celobiose do que as CBH I produzidas pelas *Trichoderma*, devido a seu sítio ativo ter uma configuração mais aberta (BHIRI, 2010).

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismo

O fungo filamentoso *Penicillium funiculosum* foi gentilmente cedido pelo prof. Dr. Nei Pereira Júnior da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Escola de Química. O isolado faz parte da micoteca do Laboratório deste professor.

4.2. Cultivo de *P. funiculosum*

Esporos do fungo *P. funiculosum*, foram obtidos de seis placas de Petri contendo meio batata, dextrose e ágar (BDA), incubados por 15 dias a 28°C. Utilizando-se uma espátula, estes esporos foram raspados com o auxílio de uma solução salina (0,9% NaCl), formando-se uma suspensão, que foi quantificada em câmara de *Neubauer*, e verificou-se a concentração de $1,79 \times 10^7$ conídios por mL. Um volume de 12mL desta suspensão foram adicionados em oito diferentes erlenmeyers, cada um contendo 200 mL de meio de produção de micélio (MPM), que foi produzido como consta na tabela 1, obtendo-se assim, a concentração final desejada de 1×10^6 esporos/mL.

Tabela 1 - Reagentes utilizados na preparação no meio de produção de micélio (MPM)

| Reagente | Quantidade |
|---|---|
| KH ₂ PO ₄ | 20 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ .7 H ₂ O | 13 g |
| CO(NH ₂) ₂ | 3 g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 3 g |
| CaCl ₂ | 3 g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,05 g |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0,0156 g |
| ZnSO ₄ .H ₂ O | 0,014 g |
| CoCl ₂ | 0,014 g |
| Água destilada | Quantidade suficiente para 1 L de solução |

Os meios com os esporos foram incubados por 72 h, a 28°C sob agitação de 150 rpm. Posteriormente, 10 mL do meio contendo os esporos germinados foram coletados e transferidos para o meio de indução de celulasas (MIC), constituído por meios de sais de Mandel 10% (v/v); peptona 0,2% (p/v); e Avicel 0,75% (p/v) como única fonte de carbono, e foram incubados por 192 h a 28°C com agitação de 150 rpm, visando à produção de enzimas do complexo lignocelulolítico.

4.3. Extração enzimática

Após o tempo de crescimento, o meio de cultivo contendo o fungo crescido foi submetido à centrifugação a 5000 rpm durante 25 minutos e seu sobrenadante obtido foi filtrado à vácuo em papel filtro. O micélio foi descartado e o sobrenadante obtido, aproximadamente 1900 mL, que continha as enzimas foi submetido a um processo de concentração utilizando a ultrafiltração pelo sistema Amicon em membranas resistentes a ação de celulasas, e com peso molecular de corte (*cut off*) igual a 10 kDa, realizado à temperatura de 4°C.

4.4. Determinação da curva padrão para dosagem de glicose

A curva padrão foi construída com solução de glicose 2 mg/mL (2 µg/µL) nas concentrações 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80 e 100 µg/mL. Realizou-se a detecção em espectrofotômetro Spectramax M3 a 540 nm.

4.5. Determinação da curva padrão para dosagem de paranitrofenol (pNP)

A curva padrão foi construída com solução de paranitrofenol (10 µg/µL) nas concentrações 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL. Realizou-se a detecção em espectrofotômetro Spectramax M3 a 405 nm.

4.6. Determinação da atividade enzimática das celulases

Os testes das atividades enzimáticas seguiram as diretrizes do teste de Ghose (1987) com adaptações.

Em todos os casos foram realizados controles sem enzima e sem substratos (branco de enzima e de substrato respectivamente), nos quais os volumes de amostra e substratos foram substituídos por tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8.

As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades Internacionais (UI), dessa forma, uma unidade de atividade corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa um μmol de substrato (no caso dos substratos sintéticos PNPC e PNPG que liberam PNP) ou que libera um μmol de açúcar redutor por minuto (substrato de CMC).

4.6.1. Determinação da atividade enzimática com carboximetilcelulose (CMC)

A atividade de endo-1,4- β -glucanase foi determinada utilizando-se o substrato carboximetilcelulose (CMC) solubilizado em tampão citrato 50 mM, pH 4,8, atingindo-se uma concentração final de 4%. Os ensaios serão realizados em triplicata, utilizando-se 50 μL do sobrenadante da amostra com 50 μL do substrato 4%. Esta mistura de reação foi incubada em banho termostaticado a 60°C, durante 30 minutos. Passado este tempo, adicionou-se 300 μL de DNS e as amostras foram fervidas por 10 minutos. Por último, adicionou-se 1 mL de água destilada à mistura de reação. A detecção foi realizada em espectrofotômetro SPECTRAMAX M3 a 540 nm.

4.6.2. Determinação da atividade enzimática em *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNPG)

A determinação da atividade de β -glucosidase foi realizada utilizando-se a seguinte mistura de reação: 50 μ L do sobrenadante da amostra; 12,5 μ L do substrato a uma concentração 10 mM; 40 μ L de tampão citrato 50 mM, pH 4,8, que foram incubados em banho termostatizado a 60 °C durante 10 minutos. Passado este tempo, adicionou-se 1mL da solução de Na₂CO₃, 250 mM para parar a reação. Por último, realizou-se a detecção em espectrofotômetro Spretamax M3 a 405 nm para quantificação pela liberação de paranitrofenol.

4.6.3. Determinação da atividade enzimática em *p*-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (PNPC)

A determinação da atividade da exocelulase ou celobiohidrolase (CBH) foi realizada utilizando-se a seguinte reação: 50 μ L do sobrenadante da amostra e 50 μ L do substrato a uma concentração 20 mM; em tampão citrato 50 mM, pH 4,8, que foram incubados em banho termostatizado a 60 °C durante 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1mL da solução de Na₂CO₃, 250 mM para parar a reação. Por último, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro Spretamax M3 a 405 nm para quantificação pela liberação de paranitrofenol.

4.7. Purificação das enzimas

A purificação das celulases de *P. funiculosum* obtidas foram realizadas por cromatografia em coluna no sistema *Fast Protein Liquid Chromatography Äkta Pure* (*General Electric Healthcare*) onde foi utilizado uma coluna de gel filtração HiLoad 16/600 Superdex de 200 μ m, equilibrada com tampão citrato de sódio 0,5 mM (pH 4,8), acrescido de 150 mM de NaCl. O volume de extrato bruto concentrado aplicado na coluna foi de 1 mL e as frações coletadas de 2 mL. O fluxo utilizado na coluna foi de 1 mL/min.

As frações eluídas passaram pelos ensaios de determinação enzimática e as que apresentaram atividade foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

4.8. Eletroforese

A eletroforese foi realizada em placa fina de poliacrilamida na presença de SDS utilizando-se o sistema de tampões descritos por Laemmli (1970).

4.8.1. Preparo dos géis

Os géis de poliacrilamida foram obtidos por copolimerização de acrilamida e bis-crilamida na presença de persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina (TEMED). Foram preparados em duas fases, um gel concentrador e um gel separador, preparados com os seguintes componentes, ilustrados nas tabelas 1 e 2:

Tabela 2 - Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador 4%

| Solução | Quantidade |
|---------------------------------|------------|
| Acrilamida: biscrilamida (29:1) | 0,625 mL |
| Tris-HCl 3M pH 8,8 | 1,25 mL |
| SDS 10% | 50 µL |
| Água destilada | 2,75 mL |
| TEMED | 4 µL |
| Persulfato de amônio 10% | 37,5 µL |

Tabela 3 - Reagentes utilizados na preparação do gel separador 12%

| Solução | Quantidade |
|---------------------------------|------------|
| Acrilamida: biscrilamida (29:1) | 2,5 mL |
| Tris-HCl 3M pH 8,8 | 0,94 mL |
| SDS 10% | 75 µL |
| Água destilada | 3,63 mL |
| TEMED | 8 µL |
| Persulfato de amônio 10% | 56,25 µL |

4.8.2. Preparo das amostras

As amostras para a eletroforese foram preparadas em tubos de eppendorfs de 1 mL, neles foram adicionados 16 μ L de amostra obtida na cromatografia e 4 μ L de tampão de amostra. O marcador molecular utilizado foi da Thermo Scientific (8 μ L) com as seguintes massas moleculares: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18 kDa e 14 kDa. Os frascos foram aquecidos por 5 minutos a 100°C. O tampão de amostra foi preparado de acordo com a tabela 3:

Tabela 4 - Reagentes utilizados na preparação do tampão de amostra

| Reagentes | Quantidade |
|-----------------------------------|------------|
| Tris-HCl 1M pH 6,8 | 2,0 mL |
| SDS 2,5 % (p/v) | 4,0 mL |
| 2- β -mercaptoetanol 0,36 M | 2,0 mL |
| Glicerol 10 % (v/v) | 5,0 mL |
| Azul de bromofenol 0,005 % (p/v) | 10 mg |

4.8.3. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A concentração de poliacrilamida no gel de separador foi de 12% e no gel concentrador de 4%. As amostras foram divididas em dois géis e a eletroforese foi realizada em voltagem de 120V e a temperatura ambiente, utilizando-se o tampão de corrida 1x (preparado a partir do tampão de corrida 5x descrito na tabela 4, após seu ajuste de pH para 8,3), até que o azul de bromofenol utilizado como marcador estivesse na borda inferior da placa.

Tabela 5 - Reagentes utilizados na preparação do tampão de corrida 5X.

| Reagentes | Quantidade |
|-------------|------------|
| Trizma Base | 125mM |
| Glicina | 96mM |
| SDS | 0,5% |

4.8.4. Coloração

Foi feita uma solução corante *Comassie blue* coloidal, primeiramente solubilizou-se 0,1% de *comassie brilliant blue* G-250; 2% ácido fosfórico 85%; 10% sulfato de amônio; posteriormente retirou-se 80 mL dessa solução e adicionou-se 20 mL de metanol 100% (NEUHOFF *et al*, 1988).

Assim, o gel de poliacrilamida foi corado com corante *Comassie blue* coloidal por 12 h à temperatura ambiente sob agitação, após esse processo, as bandas proteicas puderam ser observadas. Depois da coloração, lavou-se o gel com água destilada para retirada do excesso de corante e, então, o gel foi lavado com a solução fixadora (composta por metanol 50%, ácido acético glacial 12% e água destilada 32%) para retirada do excesso de corante restante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, para que houvesse um parâmetro para a determinação dos valores das atividades enzimáticas, realizou-se a curva padrão para glicose e paranitrofenol (pNP), com os valores de leitura obtidos, construiu-se os gráficos a e b (Figura 1) e obteve-se os dados da curva analítica.

A curva analítica da glicose ($y = 0.0053x - 0.0037$; $R^2 = 0.9964$), foi utilizada nos cálculos da atividade enzimática de endo-1,4- β -glucanase e a curva analítica do pNP ($y = 0.0928x$; $R^2 = 0.999$) foi utilizada nos cálculos da atividade enzimática.

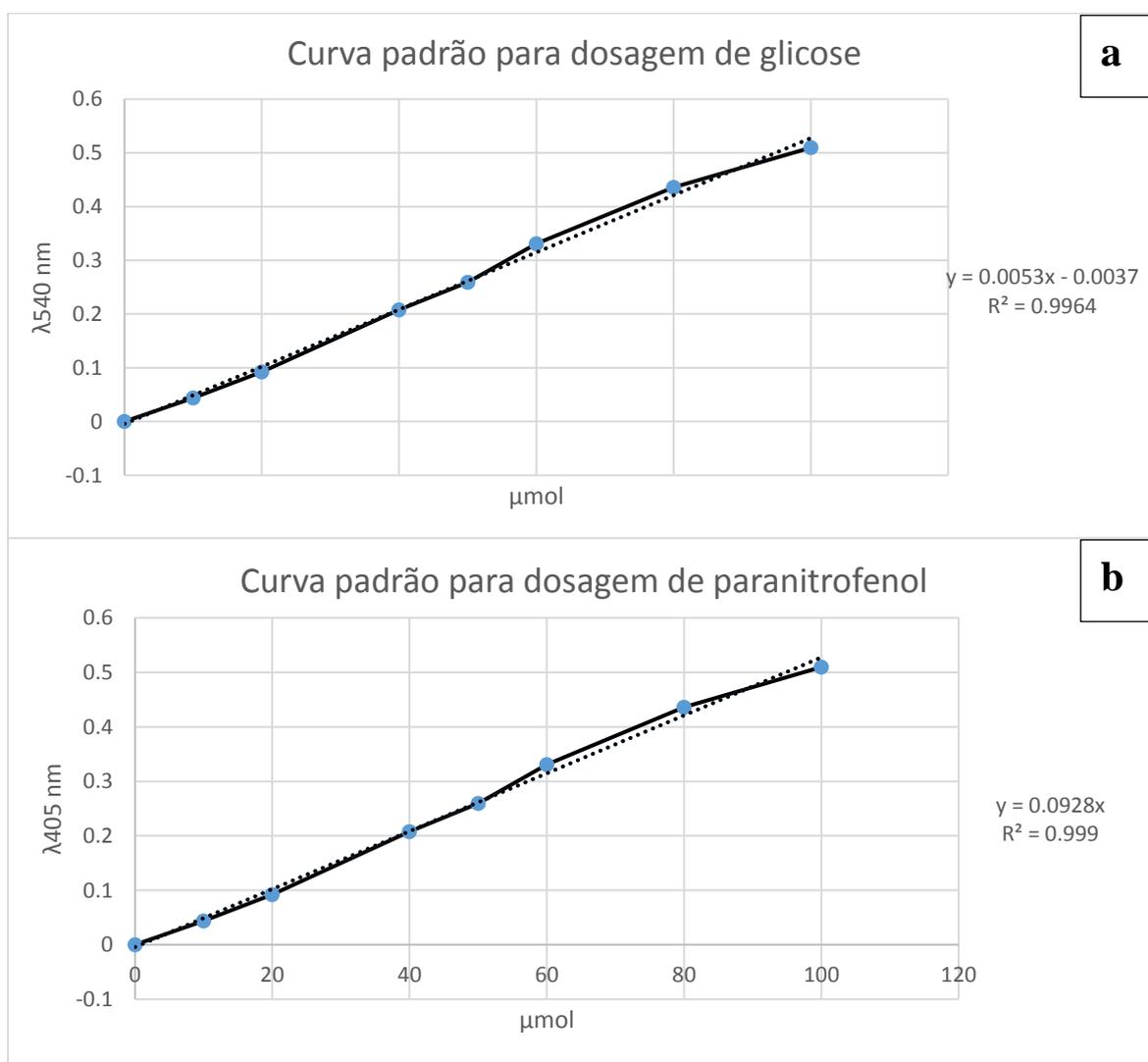


Figura 1 - a) Gráfico da curva padrão para dosagem de glicose b) Gráfico da curva padrão para dosagem de paranitrofenol.

Posteriormente, obteve-se um volume final de 100mL da extração enzimática dos dois litros de meio de cultivo com o fungo crescido, portanto, sendo assim, tivemos uma solução concentrada em 19 vezes.

Os valores de atividade enzimática obtidos nos ensaios enzimáticos, realizados com o extrato bruto, foram de: 3,30 UI/mL para endoglucanase; 3746,8 UI/mL para β -glucosidase; e 161,5 UI/mL para celobiohidrolase.

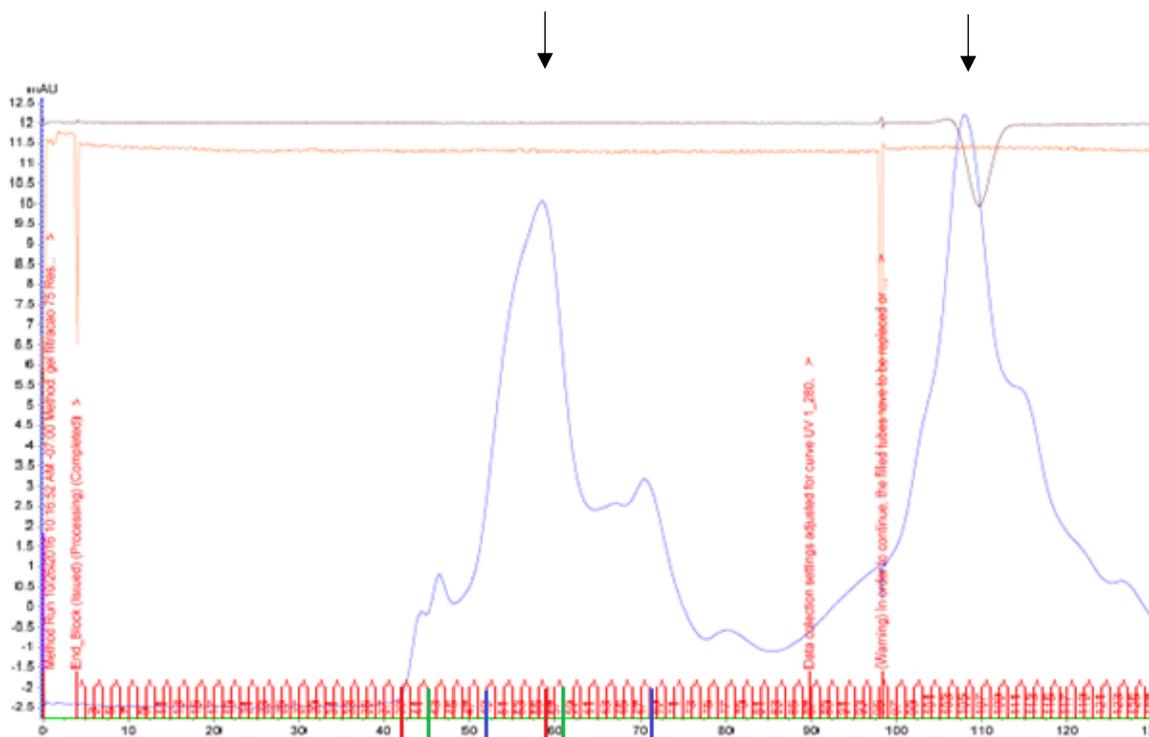


Figura 2 - Cromatograma do extrato bruto concentrado aplicado em coluna de gel filtração HiLoad 16/600 Superdex de 200 μ g.

A partir da análise do cromatograma, é possível identificar dois grandes picos, identificados pelas setas acima, muito próximos contendo celulases. Ambos os picos de atividades se sobrepõem aos picos de proteína, um indicativo de que esta etapa da purificação não se mostrou totalmente eficiente. De acordo com o estudo realizado, propõe-se que os picos no intervalo indicado na imagem correspondem a: o intervalo entre os traços verdes seriam da exocelulase; o azul da endoglucanase; e o vermelho da β -glucosidase.

Então, com base nisso, realizou-se os três ensaios enzimáticos propostos (CMC, PNPC E PNPG) das frações dos números pares dentro do intervalo de fração 40 a 84, 91, 93 e 95. Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.

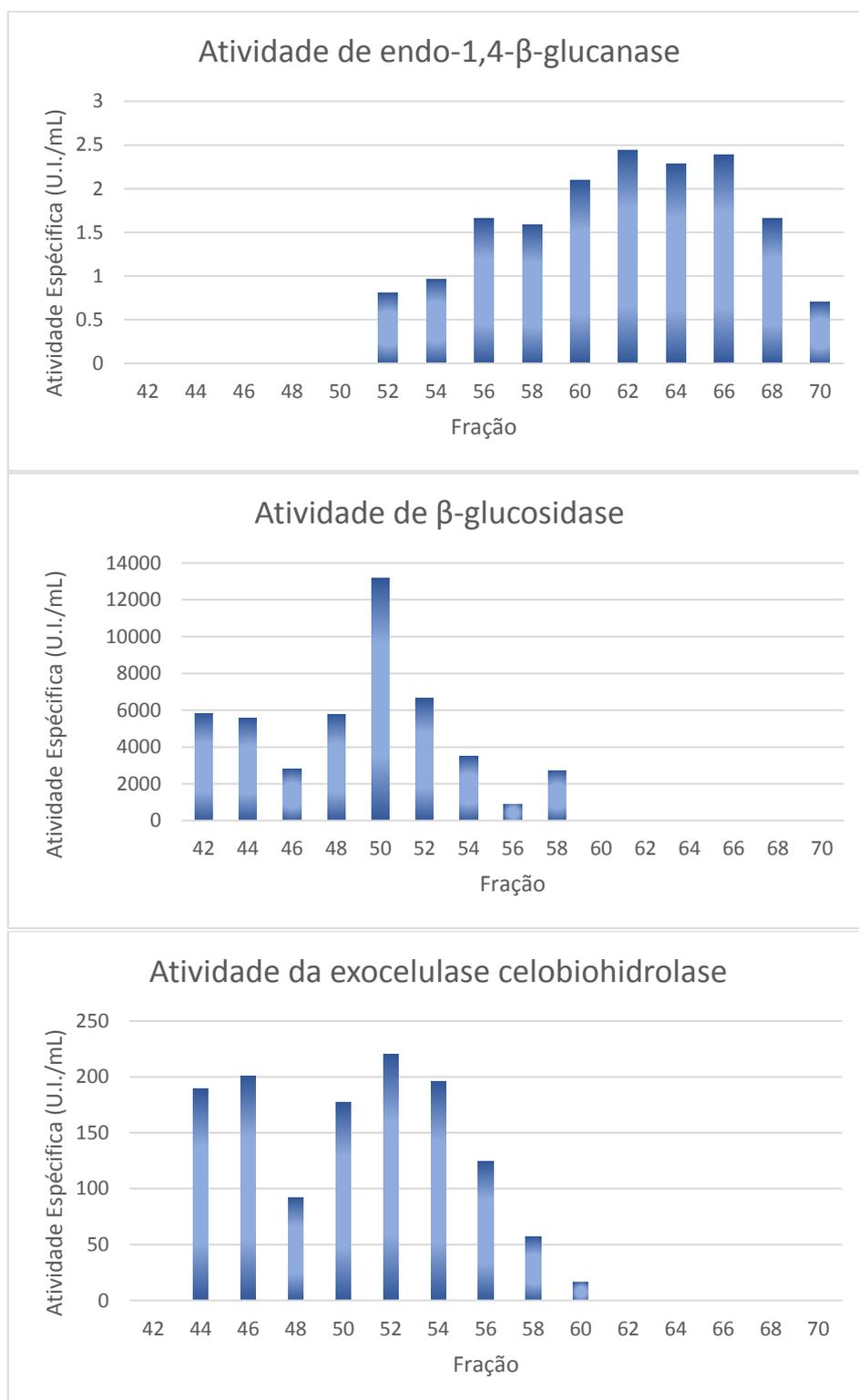


Figura 3 – Atividades enzimática de: a) endoglucanases b) β-glucosidases c) exoglucanases (celobiohidrolases).

O grau de pureza das frações contendo atividade foi avaliado por SDS-PAGE e os resultados são apresentados nas figuras 4 e 5. Nota-se, pela observação dessas figuras, que houve a presença de duas bandas proteicas nas amostras, primeiramente uma com massa molecular de aproximadamente 110 kDa e posteriormente uma de massa molecular de aproximadamente 62 kDa. É importante notar as diferenças nas intensidades das bandas observadas que variaram de acordo com a atividade enzimática apresentada, inclusive, nas ultimas frações, houve a presença apenas da banda com massa molecular de aproximadamente 62 kDa. Além disso, comparado com o extrato bruto concentrado, nota-se uma grande redução de bandas proteicas, o que demonstra a eficiência do processo.



Figura 4 - SDS-PAGE com gel de policrilamida 12% corado com azul de Coomassie; Amostras: M – marcador de massa molecular em kiloDaltons (kDa); 1 – Extrato bruto concentrado 19x; 2 a 7: Frações 44 a 49, sequencialmente.

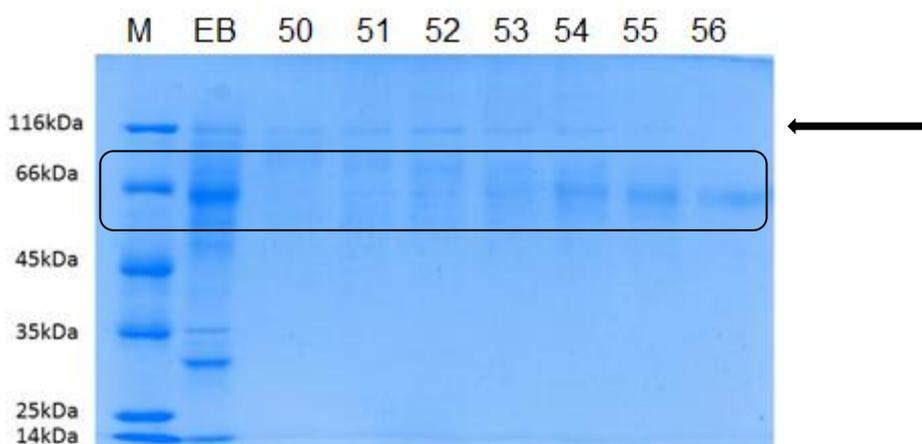


Figura 5 - SDS-PAGE com gel de policrilamida 12% corado com azul de Coomassie; Amostras: M – marcador de massa molecular em kiloDaltons (kDa); 1 – Extrato bruto concentrado 19x; 2 a 7: Frações 50 a 56, sequencialmente.

Vale salientar que, posteriormente, um aluno de doutorado do laboratório onde esse trabalho foi realizado, realizou a eletroforese das amostras obtidas, porém utilizou a coloração com nitrato de prata, que confirmou os resultados obtidos, onde foram observadas as mesmas bandas proteicas nas mesmas amostras com as mesmas massas moleculares.

A massa molecular das celulasas produzidas pelos fungos pode variar muito. Na literatura, encontram-se trabalhos realizados com o fungo *Penicillium funiculosum*, como do Maeda (2010) que descreveu a massa molecular de β -glucosidase como sendo de 77,3 kDa e de endoglucanase de 58,5kDa. Ramani *et al.* (2012), utilizando a mesma técnica de SDS-PAGE, descreveu a massa molecular da β -glucosidase de aproximadamente 120 kDa, sendo que este dado foi confirmado por coloração periódica com ácido Schiff.

Em outros trabalhos, a massa molecular da β -glucosidase foi de aproximadamente 116 e 66 kDa com SDS-PAGE, porém produzidas pelo fungo *Monascus sanguineu* (DIKSHIT, 2015). Segundo Hongzhi (2013) a massa molecular da β -glucosidase foi descrita como algo próximo de 126 kDa.

Através da comparação dos dados obtidos na literatura e neste trabalho, pode-se inferir que a banda obtida em gel de poliacrilamida com massa molecular de aproximadamente 110 kDa tratar-se de uma β -glucosidase e que a com massa molecular de aproximadamente 62 kDa, tratar-se de uma endoglucanase.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi proposta uma estratégia de purificação de celulases, produzidas pelo fungo filamentoso *Penicillium funiculosum*, a partir do seu extrato bruto, com o resultado final obtido, pôde-se demonstrar um isolamento parcial de celulases, que provavelmente correspondem a uma β -glucosidase e uma endoglucanase, além de que, essas enzimas apresentaram considerável atividade enzimática.

Com isso, podemos sugerir para os seguintes trabalhos futuros com os resultados e as amostras obtidas:

- Determinação de parâmetros físico-químicos (pH e temperatura, termoestabilidade) das enzimas purificadas e das suas massas moleculares exatas;
- Realização de ensaios de glicosilação das enzimas;
- Caracterização das celulases produzidas quanto aos parâmetros cinéticos (k_m e $V_{m\acute{a}x}$);
- Identificação e sequenciamento dos genes estruturais das enzimas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Microbiology**. v. 11, p. 187-198. 2000
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 2010.
- BÉGUIN, P. E; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 25-58., 1994
- BHIRI, F.; GARGOURI, A.; BEN ALI, M.; BELGHITH, H.; BLIBECH, M.; CHAABOUNI, S. E. Molecular cloning, gene expression analysis and structural modeling of the cellobiohydrolase I from *Penicillium occitanis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 2, p. 74–81, 2010.
- BRINK, J. V. D.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 6, p. 1477-1492, 2011.
- CASTRO, A. M. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos obtidas a partir de celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. 2010, vol.33, n.1.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**, 1ª ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008.
- D'ALMEIDA, ANA LUCIA F.S. Influência de Tratamentos Superficiais no Comportamento Mecânico de Compósitos Poliméricos Reforçados por Fibras Lignocelulósicas; Tese de Doutorado. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**. 2007.
- DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZON, S. F.; PRADELLA, J. G. C. **Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with Bioresource Technology** 107. 2012. p. 517–521.
- DIKSHIT, R.; TALLAPRAGADA, P. Partial Purification and Characterization of β -glucosidase from *Monascus sanguineus*. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 58, n. 2, p. 185-191, Apr. 2015.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, Editora: EDUCS, 2004.
- FERREIRA, A. C. B. et al. Produção de biomassa por cultivos de cobertura do solo e produtividade do algodoeiro em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 6, p. 546-553, 2010 .
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. v. 59, p 257-268, 1987.
- HASSUANI, S. J. **Resíduos agrícolas – palha**. In: Curso Internacional: “Energia na Indústria de Açúcar e Álcool”, Piracicaba. São Paulo: CTC – Copersucar. Brasil. 2005.

HONGZHI B.; HUI W.; JUNDE S.; MUHAMMAD I.; MEI H.; YUQIAN H.; et al. Production, Purification and Characterization of Novel β -Glucosidase from Newly Isolated *Penicillium simplicissimum*-11 In Submerged Fermentation. **EXCLI Journal**. 2013; 12:528-540

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**. v. 1, p. 163-176. 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, 1970.

LEÃO, A.L.; CARASCHI, J.C.; TAN, I.H., **Curaua Fiber- A Tropical Natural Fiber from Amazom: Potential and Applications Composites, Natural Polymers and Agrofibers Based Composites**. p.257-272, 2000.

LIU, S. C. Analysis and Measurement in Papermaking Industry, **Chemical Industry Press**, Beijing. 2004.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 506–577, 2002

MAEDA, ROBERTO NOBUYUKI. **Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração** / Roberto Nobuyuki Maeda, 2010. xxiv, 197 f.: il. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D. & EHRAHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using comassie brilliant blue G-250 & R-250. 1988.

PALOMER, X. et al. Study of the strawberry Cel1 endo- β -(1,4)glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Plant Science**. v. 167, p. 509-518. 2004.

RAMANI G.; MEERA B.; VANITHA C.; RAO M.; GUNASEKARAN P. Production, purification, and characterization of a β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. **Appl Biochem Biotechnol**. 2012; 167: 959-972.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y.; Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**. v.6, p. 219-228, 2003.

SKOMAROVSKY, A. A.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SOLOV'EVA, I. V.; BUBNOVA, T. V.; KONDRAT'EVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 41, n. 2, p. 182-184, 2005.

WILSON, D.B. Cellulases and biofuels. **Curr. Opin. Biotechnol**. 2009. 20: 295-299.