



Universidade Estadual de Maringá

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

**FABIANE CRISTINA DOS SANTOS**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
ENDOGLICANASE DE *Penicillium digitatum***

**Maringá  
2014**

**FABIANE CRISTINA DOS SANTOS**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
ENDOGLICANASE DE *Penicillium digitatum***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Ione Parra Barbosa-Tessmann**

**Maringá  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)**

S237p Santos, Fabiane Cristina dos  
Produção, purificação e caracterização de uma endoglicanase de *Penicillium digitatum* / Fabiane Cristina dos Santos. -- Maringá, 2014.  
58 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ione Parra Barbosa-Tessmann.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, 2014.

1. Celulase. 2. *Penicillium digitatum*. 3. Endoglicanase. 4. Hidrolase. I. Barbosa-Tessmann, Ione Parra, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular. III. Título.

CDD 21.ed. 572.7

AMMA-001851

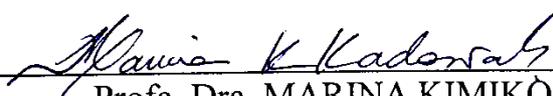
FABIANE CRISTINA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
ENDOGLINANASE DE *Penicillium digitatum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular.

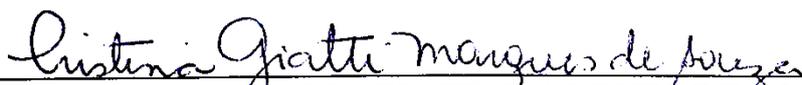
Aprovado em 24 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA



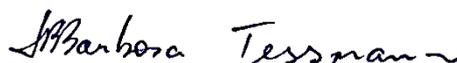
---

Profª. Dra. MARINA KIMIKÒ KADOWADI  
Universidade do Oeste do Paraná – UNIOESTE - Cascavel



---

Profª. Dra. CRISTINA GIATTI MARQUES DE SOUZA  
Universidade Estadual de Maringá - UEM - Sede



---

Profª. Dra. IONE PARRA BARBOSA TESSMANN  
Universidade Estadual de Maringá - UEM - Sede

## **BIOGRAFIA**

Fabiane Cristina dos Santos nasceu em Campo Mourão, Paraná, em 19 de Setembro de 1989. Possui bacharelado em Biomedicina pela Universidade Paranaense (UNIPAR) – Cascavel, Paraná (2008-2011). Após a conclusão do mestrado, ela irá ingressar no programa de doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná.

## **DEDICATÓRIAS**

Aos meus pais, Adélio Ricardo dos Santos e Célia Yoshiko dos Santos, pela paciência, pelo amor e incentivo e, principalmente, pela educação que me deram.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por sempre iluminar o meu caminho.

À minha família, pelo apoio e amor incondicional durante essa caminhada.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade.

À Professora Doutora Ione Parra Barbosa Tessmann, pela incrível orientação, confiança, dedicação e principalmente pelos conhecimentos adquiridos nesta etapa.

Aos professores, que brilhantemente souberam conduzir e ensinar a complexidade de parte da ciência.

Aos colegas que estão e aos que passaram pelo laboratório: Carla, Fausto, Munira, Alex, Ana Beatriz, Carol e Luciana, obrigada pela amizade e companhia.

A todos os amigos e colegas do mestrado, em especial a Ana Camila, Cidnei, Gislaine, Jean e Sayuri. Amizade para toda a vida. Obrigada pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos de Cascavel, que mesmo longe me incentivaram e acreditaram no meu potencial.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração Biologia Celular e Molecular e a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, fizeram parte deste processo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido ao projeto de pesquisa.

“... nunca deixem que lhe digam que não  
vale a pena acreditar no sonho que se  
tem ou que seus planos nunca vão dar  
certo ou que você nunca vai ser  
alguém...  
...Quem acredita, sempre alcança!”

Mais uma vez  
Renato Russo e Flávio Venturini.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um artigo científico que descreve a produção em cultura líquida estacionária, a purificação e a caracterização de uma endoglicanase de *Penicillium digitatum*. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, esta dissertação foi redigida como um artigo científico que será enviado para análise quanto à publicação para a revista Protein Expression and Purification.

SANTOS, F. C.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. Production, purification and characterization of an endoglucanase from *Penicillium digitatum*. **Protein Expression and Purification**, 2014, a ser submetido.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIACÕES

RESUMO GERAL

GENERAL ABSTRACT

<b>PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENDOGLICANASE</b>	
	<b>DE <i>Penicillium digitatum</i> ..... 15</b>
	<b>RESUMO..... 15</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO ..... 16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS ..... 21</b>
<b>2.1</b>	<b>Isolado de <i>P. digitatum</i> ..... 21</b>
<b>2.2</b>	<b>Condições de cultivo para a produção da enzima ..... 21</b>
<b>2.3</b>	<b>Optimização das condições de cultivo..... 22</b>
<b>2.4</b>	<b>Ensaio enzimático..... 23</b>
<b>2.5</b>	<b>Avaliação do crescimento do fungo..... 25</b>
<b>2.6</b>	<b>Purificação da enzima ..... 25</b>
<b>2.7</b>	<b>Quantificação de proteínas ..... 26</b>
<b>2.8</b>	<b>Análises eletroforéticas..... 26</b>
<b>2.9</b>	<b>Parâmetros cinéticos..... 27</b>
<b>2.10</b>	<b>pH e temperatura ótimos e estabilidade térmica ..... 27</b>
<b>2.11</b>	<b>Análises estatísticas ..... 28</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS ..... 29</b>
<b>3.1</b>	<b>Avaliação da produção de celulasas por <i>P. digitatum</i>..... 29</b>
<b>3.2</b>	<b>Optimização das condições de cultivo para a produção da endoglicanase de <i>P. digitatum</i> ..... 29</b>
<b>3.3</b>	<b>Purificação da enzima ..... 30</b>
<b>3.4</b>	<b>Análises eletroforéticas..... 31</b>
<b>3.5</b>	<b>Parâmetros cinéticos..... 31</b>
<b>3.6</b>	<b>Estabilidade térmica, temperatura pH e ótimos..... 31</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO ..... 33</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES..... 40</b>
<b>6</b>	<b>AGRADECIMENTOS ..... 41</b>
	<b>REFERÊNCIAS ..... 42</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Resumo das principais enzimas hidrolíticas e seus usos em vários ramos da indústria .....	47
<b>TABELA 2</b> - Purificação da endoglicanase de <i>P. digitatum</i> .....	48

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Representação esquemática da hidrólise da celulose pelo complexo enzimático da celulase .....	49
<b>FIGURA 2</b> - Isolado de <i>P. digitatum</i> .....	50
<b>FIGURA 3</b> - Efeito do pH do meio de cultivo sobre a produção da endoglicanase por <i>P. digitatum</i> .....	51
<b>FIGURA 4</b> - Curva de crescimento do <i>P. digitatum</i> e produção da endoglicanase .....	52
<b>FIGURA 5</b> - Influência da fonte de carbono do meio de cultivo na produção da endoglicanase por <i>P. digitatum</i> .....	53
<b>FIGURA 6</b> - Influência da fonte de nitrogênio do meio de cultivo na produção da endoglicanase por <i>P. digitatum</i> .....	54
<b>FIGURA 7</b> - Eluição da coluna de Sephacryl S-200 HR .....	55
<b>FIGURA 8</b> - Análises eletroforéticas da enzima purificada.....	56
<b>FIGURA 9</b> - Gráfico de Lineweaver-Burk da velocidade inicial para a endoglicanase de <i>P. digitatum</i> .....	57
<b>FIGURA 10</b> - Estabilidade térmica, temperatura e pH ótimos da endoglicanase de <i>P. digitatum</i> .....	58

## LISTA DE ABREVIACÕES

BDA – Ágar Batata Dextrose.

BGL –  $\beta$ -glicosidase(s).

C. V. – Coeficiente de variação.

CBH – Celobiohidrolase(s) ou exoglicanase(s).

cm<sup>3</sup> – Centímetro(s) cúbico(s).

CMC – Carboximetilcelulose.

CMCase – Carboximetilcelulase.

CYA – Ágar Czapeck e extrato de levedura.

DNA – Ácido desoxirribonucléico.

DNS – Ácido dinitrosalicílico.

EG – Endoglicanase(s).

g – Grama(s).

g% - Grama(s) por cento.

g/L – Grama(s) por litro.

h – Hora(s)

ITS – “Internal transcribed sequence” sequência interna transcrita do gene do rRNA.

kDa – KiloDalton(s).

$K_M$  – Constante de Michaelis-Menten.

L – Litro(s).

m/v – Massa por volume.

mg – Miligrama(s).

mg/L – Miligrama(s) por litro.

min – Minuto(s)

mL – Mililitro(s).

mm – Milímetro(s).

mmol/L – Milimol(s) por litro.

mol/L – Mol(s) por litro.

nm – Nanômetro(s).

°C – Grau Celsius.

PCR – Reação em cadeia da polimerase.

pH – Potencial de hidrogênio.

rpm – Rotações por minuto.

rRNA – RNA ribossomal.

SDS – Dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE – Dodecil sulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida.

Tween 80 - Polioxietileno (80) sorbitan monooleate

UV – Ultravioleta.

v/v – Volume/volume.

w/v – Weight per volume.

μL – Microlitro(s).

μmol – Micromol(s).

## RESUMO GERAL

**Introdução:** O uso da tecnologia de hidrólise enzimática vem apresentando grande destaque nos processos industriais, devido às suas características positivas para o meio ambiente e economia mundial. As enzimas que promovem a catálise são específicas e versáteis, além de atuarem em condições brandas de reações. Atualmente, as hidrolases utilizadas em bioprocessos são derivadas de microrganismos, na sua maioria fungos. Devido à sua aplicabilidade biotecnológica, essas enzimas são amplamente estudadas. Dentre elas destacam-se as celulases, as quais são capazes de degradar a celulose em seus monômeros. Os principais e mais estudados produtores de celulases são representados por fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. O complexo enzimático da celulase é constituído por um grupo de três enzimas (endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidases) que juntas atuam em sinergismo para a hidrólise completa da celulose, a qual é composta por unidades repetidas de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. O fungo *Penicillium digitatum* foi previamente isolado em nosso laboratório como um produtor de atividade celulolítica, pois foi capaz de degradar a celulose presente no meio de cultivo como única fonte de carbono. Não há relatos na literatura de estudos sobre a celulase de *P. digitatum*.

**Objetivos:** Otimizar a produção da celulase do isolado de *P. digitatum*, assim como purificar e caracterizar a enzima. **Métodos:** Inicialmente, um meio de cultivo líquido descrito para a produção de celulases por fungos foi utilizado. A atividade enzimática foi avaliada pela liberação de açúcares redutores do substrato utilizado. A cepa de *P. digitatum* foi cultivada em diferentes condições de temperatura, pH, agitação e com diferentes fontes de carbono para determinar a melhor condição de produção. Como o meio utilizado era rico em fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, este meio foi subtraído destas fontes para avaliar o efeito na produção da enzima. A purificação da enzima foi realizada pela precipitação com 90% de saturação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia com Sephacryl S-200 HR. Uma análise de SDS-PAGE foi conduzida para confirmar a homogeneidade da amostra e para determinar a massa molecular. Uma análise de zimograma foi executada para confirmar a atividade de endoglicanase da enzima. O pH e a temperatura ótimos, a estabilidade térmica e dados cinéticos foram obtidos com o ensaio enzimático realizado em diferentes condições com a enzima purificada. **Resultados e discussão:** Os resultados obtidos mostraram que a cepa utilizada de *P. digitatum* produz uma atividade endoglicanásica pela degradação da carboximetilcelulose (CMC). Lactose a 1% (m/v) no meio de cultura foi considerada a melhor fonte de carbono para a produção da endoglicanase por *P. digitatum*. O cultivo submerso estacionário, a 25 °C, com o pH inicial do meio de cultivo de 5,0, foi a melhor condição de produção da enzima. O pico de atividade enzimática foi obtido após cinco ou seis dias de cultivo com uma produção máxima de aproximadamente 180 U/mL de meio de cultura. A purificação da enzima foi confirmada com SDS-PAGE. A enzima purificada tem uma massa molecular de aproximadamente 74 kDa e mostrou atividade sobre a CMC na análise de zimograma. A enzima foi inativada após incubação por duas horas em temperaturas acima de 60 °C e apresentou uma  $T_{50}$  de 63,69 °C nestas condições. A enzima apresentou temperatura ótima de 60 °C e pH ótimo de 5,2. A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) da enzima para a CMC foi estimada ser de 8,12 mg/mL (0,812%, m/v) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de 1.250  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de açúcares redutores liberados. **Conclusões:** Uma endoglicanase com atividade específica de 2.742 U/mg foi purificada de *P. digitatum*. A atuação em pH 5,2 e a estabilidade térmica até 60 °C torna a enzima estudada aplicável para a sacarificação da celulose nestas condições de pH e temperatura.

## GENERAL ABSTRACT

**Introduction:** The use of enzymatic hydrolysis technology has been presenting a big appeal in industrial processes due to their positive characteristics to the environment and world economy. Enzymes that promote the catalysis are specific and versatile, besides being able to act in mild reaction conditions. Nowadays, hydrolases used in bioprocesses are derived from microorganisms, in its majority fungus. Due to its biotechnological applicability, these enzymes are thoughtfully studied. Among them are the cellulases, which are able to degrade cellulose in its monomers. The main and more studied cellulases producers are the fungi of the genera *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus*. The cellulase enzymatic complex is composed by a group of three enzymes (endoglucanases, exoglucanases, and  $\beta$ -glucosidases) that act together in synergism to the complete cellulose hydrolysis, which is composed by repetitive units of D-glucose linked by  $\beta$ -1,4 glycosidic bond. The fungi *Penicillium digitatum*, was previously isolated in our laboratory as a producer of a considerable cellulolytic activity, because it was able to degrade the cellulose present in the culture media as the only carbon source. There is no report in the literature about the cellulose of *P. digitatum*. **Objectives:** Optimize the cellulose production from the isolate of *P. digitatum*, as well as to purify and characterize the produced enzyme. **Methods:** Initially, a liquid culture medium described for the production of cellulases was used. The enzymatic activity was evaluated by the release of reducing sugars from the used substrate. The strain of *P. digitatum* was cultivated in different conditions of temperature, pH, agitation, and with different carbon sources to determine the best production conditions. As the used medium was rich in organic and inorganic nitrogen sources, this media was subtracted from these sources to evaluate the effect in the enzyme production. The enzyme purification was performed by the precipitation with ammonium sulphate to 90% of saturation, dialysis, and column chromatography with Sephacryl S-200 HR. A SDS-PAGE analysis was conducted to confirm the purified enzyme homogeneity and to determine the molecular weight. A zymogram analysis was accomplished to confirm the enzyme endoglucanase activity. The thermal stability, the optimum temperature and pH, and the kinetic data were obtained with the enzymatic essay performed in different conditions with the purified enzyme. **Results and discussion:** The obtained results have shown that the used strain of *P. digitatum* produces an endoglucanase activity by the degradation of carboxymethylcellulose (CMC). Lactose 1% (w/v) in the culture medium was considered the best carbon source for the production of endoglucanase by *P. digitatum*. The submerge stationary culture, at 25 °C, with the initial culture medium pH of 5.0, was the best condition for the enzyme production. The activity peak was obtained after five or six days of culture with a maximum production of approximately 180 U/mL of culture medium. The enzyme purification was confirmed by SDS-PAGE. The purified enzyme has a molecular mass of approximately 74 kDa and was active on CMC in the zymogram analysis. The enzyme was inactivated after two hours of incubation in temperatures above 60 °C and presented a  $T_{50}$  of 63.69 °C in these conditions. The enzyme presented an optimum temperature of 60 °C and optimum pH of 5.2. The enzyme Michaelis-Menten constant ( $K_M$ ) for the CMC was estimated as 8.12 mg/mL (0.82%, w/v) and the maximum velocity ( $V_{max}$ ) was of 1,250  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}^{-1}$  of released reducing sugars. **Conclusions:** An endoglucanase with specific activity of 2,742 U/mg was purified from *P. digitatum*. Because the studied enzyme works in pH 5.2 and is thermo stable in temperatures up to 60 °C, it is applicable to the cellulose saccharification in these conditions of pH and temperature.

# PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENDOGLICANASE DE *Penicillium digitatum*

Santos, F. C. dos,<sup>1</sup> Barbosa-Tessmann, I. P.<sup>2</sup>

## RESUMO

A produção extracelular de uma endoglicanase de um isolado de *Penicillium digitatum* foi estudada com uso de fermentação submersa. Lactose (1,0% m/v) foi usada como única fonte de carbono e a fonte combinada de nitrogênio foi peptona (2,5 g/L, m/v), extrato de levedura (2,0 g/L, m/v), sulfato de amônio (1,5 g/L, m/v) e ureia (0,3 g/L, m/v). A produção máxima da endoglicanase (aproximadamente 180,0 U/mL) foi obtida quando o fungo foi cultivado em meio líquido, a 25 °C, sem agitação, com um pH inicial do meio de cultura de 5,0 e por um período de 5 a 6 dias. A enzima foi purificada por precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação, diálise e cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200 HR, com uma recuperação de 9,07% da atividade inicial. A enzima purificada migrou como única banda de 74 kDa em SDS-PAGE. A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) para a carboximetilcelulose (CMC) foi estimada ser de 8,12 mg/mL e a velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) foi de 1.250,0  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de açúcares redutores liberados. A enzima purificada foi inativada em temperaturas acima de 60 °C e apresentou uma  $T_{50}$  de 63,69 °C em pH 4,8. A temperatura e o pH ótimos da enzima foram de 60 °C e 5,2, respectivamente. Como a enzima de *P. digitatum* libera açúcares redutores de CMC e não de papel de filtro ou celobiose ela pode ser considerada como uma endoglicanase.

**Palavras-chave:** Celulase, *Penicillium digitatum*, Endoglicanase, Hidrolase.

---

<sup>1</sup> Aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá.

<sup>2</sup> Professora Associado do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá.

## 1 INTRODUÇÃO

O avanço da biotecnologia permite delinear uma linha promissora para o desenvolvimento de novos métodos que possam melhorar os processos industriais. A tecnologia de hidrólise enzimática movimenta uma soma considerável de recursos e vem apresentando grande destaque no mercado industrial, pois pode substituir os compostos químicos atualmente utilizados, os quais provocam o desgaste de materiais e agridem o meio ambiente. Os processos biocatalisados por enzimas apresentam bom potencial por serem simples, de baixo custo financeiro e energético e com menor impacto ambiental, uma vez que as enzimas são biodegradáveis. Além disso, elas são ativas, seletivas e versáteis, realizando diversas transformações em condições brandas de temperatura e pressão nas reações. A catálise química, ao contrário da enzimática, é de difícil controle e pode alterar o produto final, gerando poluentes. Sendo assim, a tecnologia da hidrólise enzimática apresenta considerável relevância por ser específica, por não produzir produtos secundários, por ser relativamente simples e fácil de controlar, por ser eficiente energeticamente e de baixo custo, preservando os tanques de reações e diminuindo os rejeitos industriais (AEHLE, 2004; SAID & PIETRO, 2004; CGEE, 2006).

Dentre as enzimas que são comercializadas, há dois grupos: as enzimas puras, mais destinadas para kits de diagnóstico e terapêutica, e as industriais, as quais representam 60% do mercado de enzimas (SAID & PIETRO, 2004; CGEE, 2010). As enzimas industriais são representadas pelas hidrolases constituindo a classe de enzimas mais comercializadas pelo mundo todo, correspondendo a 75% do mercado de enzimas industriais (BHAT, 2000). O grupo das hidrolases é representado por enzimas como amilases, xilanases, proteases, celulases, peroxidases, lipases, entre outras. A Tabela 1 resume o uso destas enzimas em diversas áreas da indústria, com destaque para as celulases. Atualmente, a celulase é

amplamente utilizada em diversos ramos da indústria, como por exemplo: na formulação de ração animal, formulação de detergentes, indústria têxtil, extração de óleo vegetal e sucos, papel e celulose, preparação do malte da cerveja, produção de açúcares biofermentáveis para a produção de bioetanol, um biocombustível. No mercado internacional, as celulases, juntamente com as amilases, aparecem como as principais enzimas de uso industrial, representando 22% desta demanda (SAID & PIETRO, 2004; CGEE, 2006; CGEE, 2010).

Com o conhecimento específico das enzimas por meio de pesquisas, os fungos vêm adquirindo destaque na produção de várias enzimas industriais (AEHLE, 2004; SAID & PIETRO, 2004). A atividade de decomposição da matéria orgânica dos fungos ocorre, sobretudo, nas fases micelial e reprodutiva, onde a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, as quais são capazes de degradar componentes dos substratos. Estas enzimas devem ser capazes de degradar polímeros insolúveis, como a celulose, e utilizar os produtos gerados da catálise como fonte de nutrientes para o crescimento fúngico.

Atualmente, as enzimas comercializadas e utilizadas nos bioprocessos são de origem microbiana. Vários microrganismos na natureza são capazes de produzir celulases, porém apenas alguns são considerados como verdadeiros celulolíticos, ou seja, capazes de hidrolisar e utilizar a celulose natural como fonte de carbono e energia. As celulases derivadas de fungos são, hoje, amplamente estudadas devido a sua aplicabilidade biotecnológica. Os principais produtores incluem os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND et al., 2002, PHALIP et al., 2009). O fungo *Trichoderma reesei* possui o complexo celulásico mais bem caracterizado, devido ao seu potencial de aplicação industrial (HENRISSAT, 1991; DILLON, 2004). Este fungo produz pelo menos duas exoglicanases (CBH I e II), cinco endoglicanases (EGI, II, III, IV e V) e duas  $\beta$ -glicosidades (BGLI e II) (KUBICEK & PENTTILA, 1998;

TAKASHIMA et al., 1999; NOGAWA et al., 2001). As celulases dos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* são as mais utilizados e aplicadas industrialmente (MERNITZ et al., 1996; WANG et al., 2005; QIN et al., 2008). As celulases produzidas por *Aspergillus* sp. são mais destinadas para uso alimentício, já as derivadas de *T. reesei* são para aplicações não alimentícias (AGUIAR & MENEZES, 2000).

A celulose é o componente mais abundante da parede celular de plantas. É um homopolímero linear formado por unidades repetidas de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. As regiões mais compactas deste polímero são resistentes à ação enzimática e a produtos químicos. Estas regiões se encontram separadas por regiões menos organizadas, denominadas amorfas, as quais são consideradas os pontos de degradação por apresentarem menor resistência aos ataques químicos e biológicos (RAVEN, 2001; LYND et al., 2002). Com a intenção de degradar a celulose e produzir açúcares monoméricos que possam ser convertidos em vários produtos químicos como, por exemplo, o bioetanol, a hidrólise enzimática da celulose vem sendo amplamente estudada, mostrando novas tecnologias de degradação que despertam o interesse em todo o mundo (BHAT, 2000; SAID & PIETRO, 2004; DASHTBAN et al., 2009; CGEE, 2009).

O complexo enzimático celulolítico é formado por três grandes grupos de enzimas: 1) as endoglicanases, que iniciam a degradação do polímero, atuando randomicamente ao longo da molécula de celulose, clivando as regiões internas e liberando oligossacarídeos menores; 2) as exoglicanases, que atuam na região externa da celulose e são subdivididas em celobiohidrolases I e II, as quais hidrolisam terminais redutores e não redutores respectivamente, e as glicano-hidrolases, que são capazes de liberar glicose diretamente do polímero; e 3) as  $\beta$ -glicosidases, que hidrolisam a celobiose em glicose, reduzindo o efeito inibidor sobre as endo e exoglicanases (Figura 1). Um consenso sobre a hidrólise completa da celulose é que, individualmente, os três grupos de enzimas modificam a estrutura da celulose

de maneiras diferentes, mas por apresentarem propriedades complementares, eles atuam em sinergismo, cooperando uns com os outros (ZHANG et al., 2006).

Além do potencial de espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* em termos de produção de celulases, muitos outros fungos filamentosos estão sendo estudados quanto à capacidade de secretar enzimas celulolíticas. Um exemplo são as celulases produzidas por *Penicillium* sp. Vários autores vêm explorando o complexo celulolítico de várias espécies desse gênero demonstrando algumas de suas propriedades (JØRGENSEN et al., 2003; JØRGENSEN et al., 2005; JEYA et al., 2010; POL et al., 2012; RAMANI et al., 2012).

A grande diversidade de microrganismos presentes na natureza capazes de produzir compostos bioativos intensifica a busca por mais destes visando as potenciais aplicações em bioprocessos. O maior entendimento da atividade destes microrganismos, principalmente dos fungos, que são considerados como maiores produtores de celulases, é muito importante para o desenvolvimento científico e tecnológico da indústria nacional. Como os fungos crescem facilmente nos mais variados ambientes e substratos, o cultivo dos mesmos é menos trabalhoso, o que possibilita uma possível produção em larga escala de enzimas.

Enfatizando a sustentabilidade nas atividades produtivas, o uso de insumos renováveis em substituição a produtos químicos nos processos químicos ou bioquímicos revela maior tendência a um significativo aumento no consumo de enzimas, particularmente no Brasil. Com mais investimento e uso adequado da técnica, vários setores industriais se beneficiariam economicamente, podendo destacar o Brasil no mercado internacional.

Previamente, Faria et al. (2012) obtiveram uma coleção de fungos isolados de grãos de milho apresentando sintomas de podridão. Como estes fungos são os responsáveis pela degradação dos componentes bioquímicos dos grãos como amido, proteínas, celulose e lipídios, era esperado que estes microrganismos fossem produtores das enzimas relacionadas. Assim, Abe (2011) realizou uma análise de produção destas hidrolases pelo cultivo em meio

sólido contendo somente o polímero específico como fonte de carbono e medida do halo de hidrólise. Um isolado de *Penicillium* sp. foi selecionado como bom produtor de celulase.

A identificação morfológica e molecular do isolado de *Penicillium* sp. produtor de celulase foi feita por Faria et al. (2012). A identificação morfológica foi feita com base nas características micro e macroscópicas em cultivo em meios específicos e com uso de chaves taxonômicas específicas (PITT & HOCKING, 2009). A identificação molecular foi realizada por meio da amplificação com a reação da polimerase em cadeia (PCR) de um fragmento de DNA do gene do rRNA com os iniciadores ITS4/5 (WHITE et al., 1990). O fragmento de DNA amplificado foi sequenciado e a sequência obtida foi comparada com sequências do gene ribossomal depositadas em bancos de dados. O fungo foi identificado como *Penicillium digitatum* (FARIA et al., 2012).

O fungo *P. digitatum* é comumente conhecido como o principal causador do bolor verde em frutos cítricos no período pós-colheita e responsável por grande perda na comercialização dos mesmos (FRANCO & BETTIOL, 2002; FEICHTENBERGER et al., 2005; MACARISIN et al., 2007). Esta espécie tem sido alvo de estudos com produtos químicos e/ou alternativos com objetivo da eliminação do patógeno (NICOLI et al., 2009).

No melhor do nosso conhecimento, não há na literatura nenhum relato sobre a produção, purificação e caracterização bioquímica de qualquer celulase de *P. digitatum*. Logo, é relevante o estudo dos processos de produção e das características bioquímicas da enzima produzida. Caso os níveis de produção ou as características bioquímicas desta enzima em questão sejam melhores do que outras celulases descritas na literatura, a mesma poderá servir como uma alternativa em processos biotecnológicos. Portanto, os objetivos do presente trabalho foram os de estudar a produção e estabelecer uma metodologia de purificação da celulase de *P. digitatum*, assim como caracterizar bioquimicamente a enzima purificada.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolado de *P. digitatum*

A cepa de *P. digitatum* isolada por Faria et al. (2012) foi mantida em meio sólido de ágar batata-dextrose (BDA) (LESLIE & SUMMERELL, 2006), com repiques trimestrais, e em meio BDA sob óleo mineral. As Figuras 2A e 2B mostram a morfologia da colônia do isolado de *P. digitatum* cultivado em meio CYA e a Figura 2C mostra os conidióforos deste isolado vistos ao microscópio ótico.

### 2.2 Condições de cultivo para a produção da enzima

O cultivo para avaliar a produção enzimática foi realizado de forma estacionária em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio líquido preparado como descrito por Mandels & Weber (1969), com algumas modificações:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,0 g/L (m/v), extrato de levedura 2,0 g/L (m/v), ureia 0,3 g/L (m/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 g/L (m/v), peptona 2,5 g/L (m/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,3 g/L (m/v),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 mg/L (m/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,3 g/L (m/v),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,4 mg/L (m/v),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,6 mg/L (m/v),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,0 mg/L (m/v), adicionado de 1,0% (m/v) de lactose monohidratada como fonte de carbono. Este meio foi preparado em quatro soluções mais concentradas: uma solução contendo o fosfato, a lactose, o extrato de levedura e as outras fontes de nitrogênio; uma solução contendo o  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; uma solução contendo o  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; e outra contendo os outros íons. As quatro soluções foram autoclavadas individualmente e combinadas asepticamente (23,5 mL da primeira solução e 0,5 mL das soluções de ferro, cálcio e íons) para resultar o volume de 25 mL do meio final, com as concentrações indicadas acima. O inóculo foi preparado pela transferência de um pedaço de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de uma cultura de sete dias do fungo em meio BDA inclinado para um frasco contendo 20 mL de água deionizada estéril. Após picotar e agitar o

fragmento com alça de platina previamente flambada, quinhentos microlitros da suspensão obtida contendo  $1,25 \times 10^6$  esporos foram transferidos para os frascos contendo o meio líquido. Para o cultivo em estado estacionário, os frascos foram incubados em incubadora, com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C por 5 a 6 dias. Após este período, a cultura foi filtrada a vácuo e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade enzimática.

### 2.3 Otimização das condições de cultivo

- *pH do meio de cultivo*

O meio de cultivo utilizado foi o mesmo descrito acima, porém com os valores de pH corrigidos com NaOH, resultando em pH 5,0, 6,0 e 7,0.

- *Condições de temperatura e agitação*

No cultivo líquido estacionário, as temperaturas testadas foram de 25 e 30 °C. Os frascos foram incubados em estufa climatizada, com fotoperíodo de 12 horas, por 5 dias. Após a incubação os cultivos foram filtrados e o teste enzimático foi realizado nos filtrados. Para a condição de agitação, o cultivo foi incubado em uma incubadora com agitação orbital a 100 rpm, a 25 °C, com luz natural, por 5 dias. Após este período o ensaio enzimático foi realizado.

- *Tempo de cultivo*

O melhor tempo de cultivo para a produção da endoglicanase de *P. digitatum* foi avaliado em uma curva de crescimento. A curva de crescimento foi realizada em um período de 7 dias, em cultivo estacionário, a 25 °C, com uso do meio líquido inicialmente descrito com todas as fontes de nitrogênio, pH inicial de 5,0 e com 1,0% (m/v) de lactose como fonte de carbono. A atividade enzimática foi avaliada no filtrado da cultura a cada 24 horas a partir do segundo dia de cultivo.

- *Fontes de carbono*

Para o teste de diferentes fontes de carbono, o meio utilizado foi o mesmo descrito acima, mas a lactose foi substituída por celulose microcristalina, papel de filtro, arabinose, glicose, carboximetilcelulose (CMC), farelo de trigo, sacarose, rafinose e celobiose todos na concentração de 0,5% (m/v). Os frascos foram incubados em estufa climatizada, com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C, por 5 dias. Após a incubação os cultivos foram filtrados e o teste enzimático foi realizado nos filtrados. Posteriormente, diferentes concentrações da fonte de carbono indutora da produção da enzima e a adição de CMC ao meio contendo lactose também foram testadas.

- *Fontes de nitrogênio*

Como o meio de cultivo utilizado era um meio rico em fontes de nitrogênio, a remoção de cada uma das fontes do meio foi realizada de forma individual ou combinada para avaliar a contribuição de cada uma.

- *Adição de surfactante ao meio de cultivo*

O surfactante Tween 80 foi adicionado para uma concentração final de 0,01% ou 0,05% (v/v) ao meio de cultura durante todo o crescimento do fungo ou durante as últimas 24 horas de cultivo.

## **2.4 Ensaio enzimático**

A atividade de endoglicanase foi avaliada com base no método descrito por Ghose (1987), com algumas modificações. Quinhentos microlitros da amostra do filtrado, puro ou diluído, foram incubados com 1,5 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, contendo 1% (m/v) de CMC, a 50 °C, por 30 minutos. O branco total era constituído de 2,0 mL do mesmo tampão do ensaio e o branco da amostra constituído de 0,5 mL da amostra e de 1,5 mL do mesmo tampão acetato sem CMC adicionado. Os açúcares redutores liberados

foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Neste método, logo após a incubação da enzima com o substrato, foram adicionados quinhentos microlitros do reativo de DNS [DNS 1% (m/v); NaOH 0,4 mol/L; tartarato de sódio e potássio 1 mol/L] e a mistura foi fervida por 5 minutos. Após a fervura, foram adicionados 2,5 mL de água destilada e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. As concentrações de açúcar redutor foram estimadas com uma curva de calibração gerada com glicose como solução padrão em concentrações variando de 0,25 mmol/L a 2,5 mmol/L. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima que produziu 1,0  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto e por mL nas condições do ensaio.

A atividade de celulase total (FPase) foi determinada como descrito por GHOSE (1987), com uso do método do papel de filtro. Para isso, quinhentos  $\mu$ L do filtrado puro foi misturado com 1,5 mL do tampão acetato de sódio 50 mmol/mL, pH 4,8, e papel de filtro Whatman No. 1 cortado em fitas de 1  $\times$  6 cm (50 mg). Após agitação em vórtex, foi realizada uma incubação de 1 hora a 50 °C. Após esta incubação, o teste do DNS (MILLER, 1959) foi realizado como descrito acima. Uma unidade de celulase foi considerada a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto nas condições do ensaio.

A atividade de  $\beta$ -glicosidase ou celobiase foi estimada com uso de celobiose como substrato (GHOSE, 1987). O ensaio foi o mesmo descrito para a CMC, onde a CMC foi substituída pela celobiose. O branco total e o branco da amostra foram utilizados. Uma unidade de  $\beta$ -glicosidase foi considerada como a quantidade de enzima que libera 1,0  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto nas condições do ensaio.

## 2.5 Avaliação do crescimento do fungo

O peso seco do micélio seco foi utilizado como uma avaliação do crescimento do microrganismo. Para isso, o micélio retido no papel de filtro foi seco a 50 °C, até a obtenção de peso constante.

## 2.6 Purificação da enzima

O fungo foi cultivado como descrito acima, por 6 dias, em 8-10 frascos de 125 mL com 25 mL do meio descrito. O filtrado das culturas foi reunido e as proteínas foram precipitadas pela adição de sulfato de amônio 90% em banho de gelo e com agitação em agitador magnético. As proteínas precipitadas foram coletadas por centrifugação (21,000g, 5 min), ressuspensas em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, e dialisadas (3 vezes) contra o mesmo tampão a 4 °C, durante 18 horas. O dialisado foi centrifugado (5,000g, 5 minutos) e o sobrenadante aplicado em uma coluna cromatográfica de Sephacryl S-200 High Resolution (100 cm x 1,5 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A eluição também foi feita com o tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, com um fluxo de 0,6 mL/min. Frações de 4,0 mL foram coletadas.

O perfil de eluição de proteínas foi avaliado pela leitura da absorbância a 280 nm das frações e o perfil de eluição da endoglicanase foi avaliado pelo ensaio enzimático, com uma alíquota de cada uma das frações. As frações que continham maior atividade de endoglicanase foram reunidas e congeladas a -20 °C até serem utilizadas nas análises de caracterização da enzima.

Para determinar a purificação da enzima, a atividade enzimática e a quantidade de proteínas foram determinadas no filtrado inicial das culturas, no dialisado e no juntado das frações de maior atividade enzimática eluídas da coluna.

## 2.7 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita através do método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

## 2.8 Análises eletroforéticas

A endoglicanase de *P. digitatum* foi analisada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) para avaliação da purificação, da pureza e da massa molecular. Alíquotas de 1,0 µg das frações eluídas da coluna, da proteína purificada (1 µg) e de proteínas do dialisado (3 µg) foram adicionadas do tampão de amostra de SDS-PAGE [glicerol 20% (m/v), SDS 1% (m/v), azul de bromofenol 0,03 mg/mL (m/v), tris-base 150 mmol/L, pH 6,8, β-mercaptoetanol 0,7 M] e fervidas em banho-Maria por 10 minutos. As alíquotas tratadas desta forma foram colocadas no gel de poliacrilamida 7,5% (m/v) contendo SDS, pH 8,9, com um gel de empilhamento a 4,5% (m/v), pH 6,8, no sistema de tampão Tris-glicina. Marcadores de peso molecular de faixa ampla (Promega, EUA) foram tratados da mesma maneira. O gel foi revelado pela coloração com o Azul de Coomassie R-250.

Para avaliar se a enzima purificada tinha atividade de endoglicanase, uma análise de zimograma foi realizada, com base no método descrito em Chaabouni et al. (2005). Uma alíquota da proteína purificada (3 µg) foi submetida a um PAGE descontínuo. A análise de PAGE descontínuo foi realizada da mesma forma que o SDS-PAGE, mas o SDS e o β-mercaptoetanol foram omitidos em todas as soluções e as amostras não foram desnaturadas por fervura. O gel foi revelado pela coloração com o Azul de Coomassie R-250. Após a corrida, o gel de PAGE contendo a enzima foi colocado sobre um meio sólido (5 mm e espessura) contendo tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, CMC 1% (m/v) e ágar 2% (m/v). O gel foi incubado sobre este meio sólido por 1 hora a 50 °C. Após este período, o gel de ágar foi corado com Vermelho Congo a 0,1% (m/v) por 30 minutos, sob agitação lenta, e

descolorado com uma solução de NaCl 1,0 mol/L, até o aparecimento de uma banda clara, a qual caracterizou a atividade enzimática.

## 2.9 Parâmetros cinéticos

O efeito da concentração da CMC, variando de 13 a 20 mg/mL sobre a endoglicanase de *P. digitatum* foi avaliado no ensaio enzimático pela adição de uma quantidade fixa da enzima purificada, como descrito acima. A concentração de açúcares redutores liberados, após a ação da enzima foi calculada com uso método do DNS (MILLER, 1959). A velocidade inicial foi dada em termos de quantidade de açúcares redutores liberados pelo volume e pelo tempo. Os parâmetros cinéticos constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima de reação ( $V_{máx}$ ) foram estimados pela regressão linear em um gráfico duplo-recíproco. As velocidades iniciais foram expressas como  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## 2.10 Estabilidade térmica, temperatura e pH ótimos

Para avaliar a estabilidade térmica, a enzima foi incubada no tampão acetato 50 mmol/L, pH 4,8, por 2 horas, em diferentes temperaturas, e depois submetida ao ensaio enzimático, como descrito acima. A temperatura na qual a endoglicanase de *P. digitatum* perde 50% de sua atividade ( $T_{50}$ ), após incubação por 2 horas, foi calculada com a equação da curva de regressão polinomial de segunda ordem obtida. Para avaliar a temperatura ótima, o ensaio enzimático foi realizado como descrito acima com tampão acetato 50 mmol/L, pH 4,8, em diferentes temperaturas. O pH ótimo foi determinado pela alteração do pH do tampão acetato do ensaio enzimático.

### **2.11 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas pelo cálculo da média e do desvio padrão dos resultados. Onde indicado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ), com uso do programa SASM (CANTERI et al., 2001).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Avaliação da produção de celulases por *P. digitatum*

A análise de celulases totais (FPase) pelo método do papel de filtro e de celobiase pelo uso de celobiose não resultou em liberação de açúcares redutores. No entanto, a análise da produção de endoglicanases pelo uso de CMC como substrato resultou na liberação de açúcares redutores detectados pelo método do DNS. Portanto, a enzima produzida por *P. digitatum* pode ser considerada uma endoglicanase.

### 3.2 Otimização das condições de cultivo para a produção da endoglicanase de *P. digitatum*

A quantidade de enzima liberada no meio de cultivo foi maior quando o fungo foi cultivado em um meio cujo pH inicial era de 5,0 (Figura 3). O cultivo estacionário a 25 °C foi melhor do que o cultivo a 30 °C e também melhor do que o cultivo sob agitação a 25 °C para a produção da enzima (dados não mostrados). Um tempo de cultura de 5-6 dias foi o melhor para a produção da enzima (Figura 4). Nos experimentos de produção foi utilizado um tempo de cultura de 5 dias e nos experimentos de purificação da enzima o fungo foi cultivado por 6 dias para a produção da enzima, pois ainda não há a deterioração da cultura, como evidenciado pelo crescimento do fungo.

Vários compostos de carbonos foram adicionados ao meio de cultura do *P. digitatum* para avaliar a produção da endoglicanase. As análises estatísticas dos resultados (Figura 5A e B) mostraram que a lactose foi a melhor fonte de carbono indutora da produção da enzima. Algumas destas fontes de carbono aparentemente aumentaram muito o crescimento do fungo, como a celulose microcristalina, o papel de filtro e o farelo de trigo. No entanto, estes substratos são sólidos e eles acrescentaram massa ao peso do micélio seco, que foi o método

utilizado para avaliar o crescimento do fungo. A celobiose também foi testada como fonte de carbono e não foi melhor do que a lactose (resultados não mostrados). Uma análise da melhor concentração de lactose para a produção da enzima mostrou que com uma concentração de lactose 1,0% (m/v) houve a maior produção da enzima e também o crescimento do fungo (Figura 5B). Conseqüentemente, lactose 1,0% (m/v) foi usada como fonte de carbono nos meios líquidos das culturas de todos os outros experimentos.

O meio de cultura utilizado é um meio rico em nitrogênio. Possui como fontes de nitrogênio orgânico a ureia, a peptona e o extrato de levedura e como fonte de nitrogênio inorgânico o sulfato de amônio. Para avaliar o papel de cada um deles, eles foram removidos individualmente ou combinados do meio de cultivo. Os resultados de sensibilidade estatística mostram que o sulfato de amônio poderia ser removido do meio, com benefício para a produção da enzima (Figura 6). No entanto, para estar de acordo com a literatura com o uso generalizado do meio de cultivo descrito por Mandels & Weber (1969) para a produção de celulases, o sulfato de amônio não foi removido do meio e foi utilizado em todos os experimentos.

A adição de Tween 80 0,01% e 0,05% (v/v) ao meio de cultura durante todo o crescimento do fungo ou durante as últimas 24 horas de cultivo não contribuiu para um aumento na produção da enzima (dados não mostrados).

### **3.3 Purificação da enzima**

O perfil de eluição de proteínas totais e da atividade de endoglicanase na coluna de Sephacryl S-200 HR no tampão de eluição utilizado é mostrado na Figura 7A. A enzima foi eluída em um pico único de atividade. A purificação resultou em uma proteína homogênea, como mostrado pelo gel de SDS-PAGE (Figura 7B e 8A). Os resultados da purificação da

enzima são sumarizados na Tabela 2. Houve uma recuperação de 9,07% e a atividade específica aumentou 3,92 vezes.

### 3.4 Análises eletroforéticas

Para confirmar a purificação da proteína e para determinar a massa molecular da endoglicanase produzida por *P. digitatum*, as proteínas obtidas após a precipitação com sulfato de amônio e diálise e a enzima purificada (frações de maior atividade reunidas) foram aplicadas em um gel descontínuo de SDS-PAGE. A enzima purificada migrou como uma banda única com massa molecular aproximada de 74 kDa (Figura 8A). O gel de PAGE corado com azul de Coomassie e o zimograma revelado com a solução de vermelho do congo são mostrados na Figura 8B.

### 3.5 Parâmetros cinéticos

A razão de dependência da reação enzimática sobre a CMC, a pH 4,8 e 50 °C, seguiu a cinética de Michaelis-Menten. O gráfico duplo-recíproco (Figura 9) mostrou que os valores de  $K_M$  aparente e da  $V_{m\acute{a}x}$  são de 8,12 mg/mL (0,81%, m/v) e 1.250,0  $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente.

### 3.6 Estabilidade térmica, temperatura e pH ótimos

A endoglicanase purificada de *P. digitatum* foi relativamente termoestável por duas horas de incubação em temperaturas de 30-60 °C (Figura 10A), mas perdeu parcialmente a atividade quando incubada por duas horas em temperaturas acima de 60-70 °C, e perdeu totalmente a atividade quando incubada por 2 horas a 70 °C, em pH 4,8. A  $T_{50}$  calculada pela equação da curva de regressão polinomial de segunda ordem gerada a partir dos dados é de 63,69 °C.

Quando o ensaio enzimático foi realizado em diferentes temperaturas, a enzima apresentou uma temperatura ótima de 70 °C (Figura 10B). No entanto, é necessário cautela com a interpretação deste dado, já que foi demonstrado que a enzima sofre inativação quando incubada por duas horas a 70 °C. Portanto, uma temperatura ótima de 70 °C deveria ser considerada para incubações curtas e de 60 °C para incubações mais longas, visto que foi demonstrado que a enzima é relativamente estável a 60 °C. Os dados mostram que a endoglicanase de *P. digitatum* tem um pH ótimo de 5,2 (Figura 10C).

## 4 DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou a produção, a purificação e as características bioquímicas de uma endoglicanase de *P. digitatum*. A produção da maioria das enzimas extracelulares microbianas é afetada pelo pH do meio de cultivo. Nossos resultados mostraram que um pH inicial de 5,0 para o meio de cultivo é o melhor para a produção da endoglicanase de *P. digitatum* (Figura 3). Em pH 6,0 e 7,0, tanto a produção da enzima, retratada pela atividade enzimática, quanto o crescimento, avaliado pelo peso do micélio seco, decresceram. Uma observação similar foi apresentada por Jecu (2000) onde o pico de atividade endoglicanásica de *Aspergillus niger* foi observado em pH inicial de 4,5-5,0, porém utilizando a fermentação em estado sólido. Também de acordo com nossos resultados, Jeya et al. (2010) descreveram o pH inicial do meio de cultivo de 5,0 para a melhor produção da endoglicanase de *Penicillium pinophilum* e Das & Ghosh (2009) relataram a melhor produção de celulases por *Penicillium notatum* com o meio de cultivo com pH inicial de 4,0. No entanto, há também na literatura relatos do uso de um pH inicial não tão ácido para a produção de celulases por *Penicillium* como os estudos conduzidos por Sindhu et al. (2011) com *Penicillium* sp., onde a maior produção de celulase ocorreu em meio de cultivo com pH inicial de 6,0.

A temperatura de incubação é um dos fatores físicos mais importantes para a produção enzimática. Nossos resultados mostraram que a melhor temperatura para o cultivo estacionário para a produção da endoglicanase de *P. digitatum* foi de 25 °C, pois a 30 °C tanto a produção da enzima quanto o crescimento do fungo foram afetados (dados não mostrados). Este dado difere do relatado por Sindhu et al. (2011) para a produção de celulases por *Penicillium* sp., onde a temperatura de 35 °C era a melhor. No entanto, de acordo com nossos resultados, Jeya et al. (2010) observaram que uma temperatura de incubação de 28 °C foi a melhor para a produção da endoglicanase por *P. pinophilum*; Das & Ghosh (2009) obtiveram maior produção de atividade enzimática de celulases cultivando a cepa de *P. notatum*

utilizada a 30 °C; e Jecu (2000) e Narasimha et al. (2006) observaram que a melhor temperatura para a produção de endoglicanase por cepas de *A. niger* foi de a 30 °C e 28 °C, respectivamente.

Embora haja relatos do uso de cultura líquida com agitação para a produção de celulases por fungos (PASTOR et al., 2007; JAVED et al., 2008; POL et al., 2012), a produção da endoglicanases por *P. digitatum* foi muito menor neste cultivo do que no cultivo estacionário, embora a agitação não tenha impedido totalmente o crescimento do fungo (dados não mostrados).

A produção de enzimas geralmente acompanha o crescimento do microrganismo. O isolado de *P. digitatum* utilizado neste estudo demonstrou crescimento de forma logarítmica entre os dias 3 e 4 e após este período cresceu de forma estacionária. A produção da enzima alcançou um pico entre os dias cinco e seis e depois decresceu (Figura 4). Utilizando fermentação em estado sólido, Sindhu et al. (2011) obtiveram um pico de produção de atividade de celulase em *Penicillium* sp. após 72 horas de cultivo. A atividade endoglicanásica de *Penicillium echinulatum* apresentou pico de produção após 3 a 4 dias de incubação, em fermentação em estado sólido com uso de bagaço de cana-de açúcar e farelo de trigo combinados como fonte de carbono (CAMASSOLA & DILON, 2007).

O efeito de diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultivo para a produção da endoglicanase de *P. digitatum* foi investigada. A melhor fonte de carbono para a produção da enzima foi a lactose (Figura 5A). Determinada a melhor fonte, várias concentrações de lactose foram testadas, utilizando um limite de 1% (m/v), pois foi a concentração utilizada para a produção de celulases por *Penicillium* sp. por Sindhu et al. (2011). A concentração de 1,0% (m/v) foi considerada a melhor, tanto para a produção enzimática quanto para o crescimento (Figura 5B). Menores concentrações de lactose no meio de cultivo resultaram em menores produções da enzima (Figura 5B). De acordo com nossos

resultados, a lactose também foi considerada a melhor fonte de carbono para a produção de celulases pelo fungo filamentoso *Acremonium cellulolyticus* (FANG et al., 2008). Portanto, a lactose 1,0% (m/v) foi usada como a fonte de carbono em todos os outros experimentos.

A CMC e o farelo de trigo são comumente utilizados como fontes de carbono solúvel e insolúvel, respectivamente, em meios de cultura para a produção de celulases. De acordo com Archana & Sathyanarayana (1997), o farelo de trigo é visto como um substrato universal para a produção de celulases por fungos. Além de apresentar muitos nutrientes, sua composição bioquímica, após a hidrólise, é rica em açúcares solúveis como glicose, arabinose e galactose, que são requeridos para o crescimento e a replicação inicial do microrganismo. A CMC já foi utilizada como suplemento ao meio de cultivo básico, descrito por Mandels & Weber (1969), para aumentar a produção de celulases fúngicas (RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2011). Nossos resultados mostram que essas duas fontes, a CMC e o farelo de trigo, e também a celulose microcristalina, não induziram a produção da endoglicanase de *P. digitatum* na mesma proporção que a lactose a 1,0% (m/v).

Grande parte dos experimentos de avaliação de produção de celulases por fungos relatados na literatura utilizam resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Por exemplo, no trabalho realizado por Jeya et al. (2010), a palha de arroz foi considerada a melhor fonte de carbono para a produção de endoglicanase por uma cepa de *P. pinophilum*. O bagaço da cana de açúcar, combinado com farelo de trigo, também foi utilizado como fonte de carbono para a produção de celulases por *P. echinulatum* em fermentação em estado sólido, com o objetivo de reduzir os custos com biodegradação de materiais lignocelulósicos (CAMASSOLA & DILON, 2007). Mesmo com as boas intenções do uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono, principalmente para a produção de biocombustíveis, o uso da lactose neste caso é viável, devido ao dissacarídeo ser de baixo custo e de fácil manipulação.

Acredita-se que o mecanismo de indução pela lactose seja devido aos altos níveis de galactose 1-fosfato intracelular, o qual pode controlar a sinalização (SEIBOTH et al., 2004). Na tentativa de elucidar o mecanismo da indução de celulasas pela lactose, Seiboth et al. (2006) utilizaram uma cepa de *Hypocrea jecorina* (anamorfo ao *Trichoderma reesei*) para a produção de celobiohidrolases com lactose e D-galactose como fontes indutoras. Somente a presença da D-galactose não induziu a expressão de altos níveis da enzima em comparação aos resultados obtidos com a lactose. A hipótese é que a lactose deve transmitir um sinal adicional ou superior ao fungo produtor da enzima para resultar em maior secreção enzimática. É possível pensar na provável existência de um receptor de lactose ligado a uma cascata de eventos que induzem a produção da celulase.

Surfactantes são utilizados para aumentar a produção de enzimas extracelulares. Com o objetivo de aumentar produção da endoglicanase de *P. digitatum*, o meio de cultivo foi suplementado com o surfactante Tween 80 no início do cultivo e 24 horas antes do final do cultivo. A adição de Tween 80 ao meio de cultivo de *P. digitatum* não aumentou a produção da endoglicanase (dados não mostrados).

A purificação da endoglicanase produzida por *P. digitatum* foi efetiva e eficiente. A maioria dos processos de purificação de endoglicanases de espécies de *Penicillium* utiliza precipitação ou ultrafiltração para a concentração das proteínas do filtrado, diálise e cromatografia de exclusão molecular com ou sem prévia cromatografia de troca iônica (CHAABOUNI et al., 2005; JEYA et al., 2010; DAS et al. 2012; POL et al., 2012; BAI et al., 2013). Para a endoglicanase de *P. digitatum*, somente um passo cromatográfico de exclusão molecular, após precipitação e diálise, foi requerido para obter uma fração homogênea, o qual recuperou 9,07% da atividade inicial (Tabela 2, Figura 7A e 7B). O perfil de eluição da coluna é apresentado na Figura 7A, a qual mostra a eluição de quatro picos proteicos e um único pico de atividade enzimática, o que indica que há somente uma celulase produzida pelo

fungo. As proteínas eluídas puderam ser visualizadas no gel de SDS-PAGE (Figura 7B). O segundo pico proteico representa a eluição da endoglicanase. Bai et al. (2013) também usaram um único passo cromatográfico em Sephadex G-100 para purificar uma endoglicanase de *Penicillium simplicissimum*. O uso de coluna cromatográfica de Sephacryl S-200HR para purificação de celulasas foi descrito também para *Thermomonospora* (GEORGE et al., 2001) e *Trichoderma* sp. (SUL et al., 2004).

A massa molecular da endoglicanase de *P. digitatum* foi estimada ser de 74 kDa (Figura 8A) e é relativamente maior do que de outras endoglicanases de *Penicillium* como, por exemplo, a de *Penicillium simplicissimum* e de *P. notatum*, que apresentam massa molecular de 33,2 e 55 kDa, respectivamente (DAS et al., 2012; BAI et al., 2013) e ainda de *P. pinophilum*, onde há relatos de massa molecular de 37 kDa e 42 kDa (JEYA et al., 2010; POL et al., 2012). A detecção de atividade de endoglicanase por zimograma é amplamente utilizada. O zimograma realizado demonstrou uma atividade enzimática de endoglicanase pela banda de hidrólise da CMC na posição da banda da proteína purificada, o que indica que a enzima purificada é a endoglicanase de *P. digitatum* e corresponde a uma única proteína (Figura 8B).

A endoglicanase de *P. digitatum* exibiu um  $K_M$  de 8,12 mg/mL (0,82%, m/v) de CMC, observado pelo ensaio da liberação de açúcares redutores pelo método do DNS (Figura 9). Este dado está de acordo com os valores de  $K_M$  para a CMC relatados de endoglicanases de outras espécies de *Penicillium*. Por exemplo, o  $K_M$  para a CMC da endoglicanase de cepa de *P. pinophilum* foi encontrado por Jeya et al. (2010) e Pol et al. (2012) como de 1,08 mg/mL e 4,8 mg/mL, respectivamente. Outros exemplos são os valores de  $K_M$  para a CMC encontrados para as endoglicanases de *P. simplicissimum* de 14,881 mg/mL (BAI et al., 2013) e de *P. notatum* de 5,2 mg/mL (DAS et al., 2012). A  $V_{m\acute{a}x}$  da endoglicanase de *P. digitatum*, calculada pela regressão linear do gráfico duplo recíproco, foi de 1.250  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de açúcares

reduzidos liberados (Figura 9). Dados na literatura para a  $V_{m\acute{a}x}$  de endoglicanases de *Penicillium* são controversos, devido às diferenças nas unidades utilizadas. Por exemplo, a  $V_{m\acute{a}x}$  para a endoglicanase de *P. simplicissimum* foi relatada ser de 0,364 mg/mL/min (BAI et al., 2013). Já para endoglicanases de diferentes cepas de *P. pinophilum*, os valores encontrados para a  $V_{m\acute{a}x}$  foram de 226 U/mg e 72,5 U/mg (JEYA et al., 2010; POL et al., 2012).

É desejável que as endoglicanases sejam ativas a altas temperaturas de sacarificação para a economia do processo. A curva de estabilidade térmica da endoglicanase de *P. digitatum* mostra que ela é estável por 2 horas em temperaturas de até 60 °C, em pH 4,8. Com incubações em temperaturas superiores a 60 °C a enzima perde gradualmente sua atividade e possui uma  $T_{50}$  de 63,69 °C (Figura 10A). A maioria das endoglicanases de espécies do gênero *Penicillium* apresenta estabilidade térmica semelhante. As endoglicanases de *P. pinophilum* e *P. simplicissimum* apresentaram estabilidade térmica em torno de 50 °C por 2 e 4 horas, respectivamente (POL et al., 2012; BAI et al., 2013). Já a endoglicanase de *Penicillium occitanis* perdeu apenas 30% de sua atividade a 70 °C e permaneceu ativa a 80 °C, após ser incubada por 1 hora em diferentes temperaturas antes do ensaio enzimático (CHAABOUNI et al., 2005).

Os resultados de temperatura ótima de 60 °C para a endoglicanase de *P. digitatum* mostram que ela é uma enzima termotolerante (Figura 10B). Similarmente, a temperatura ótima da endoglicanase de *P. simplicissimum* foi também relatada como 60 °C (BAI et al., 2013). No entanto, há relatos de endoglicanases não termotolerantes como a de *P. pinophilum*, cuja temperatura ótima foi descrita como de 28 °C (JEYA et al., 2010).

O pH ótimo da endoglicanase produzida por isolados do gênero *Penicillium*, em geral, ficam em uma faixa ácida. Por exemplo, a enzima produzida por diferentes cepas de *P. pinophilum* demonstrou maior atividade em pH 5,0 (JEYA et al., 2010; POL et al., 2012).

Resultados similares foram encontrados para a endoglicanase de *P. simplicissimum*, com pH ótimo de 3,2 (BAI et al., 2013); para a endoglicanase recombinante produzida por *Penicillium canescens*, com pH ótimo de 3,4 (CHULKIN et al., 2009); e para duas endoglicanases de *P. occitanis*, ambas com pH ótimo de 3,5 (CHAABOUNI et al., 2005). O valor de pH ótimo de 5,2 (Figura 10C) para atividade da endoglicanase de *P. digitatum* corrobora com os relatos de pHs ótimos mais ácidos das endoglicanases produzidas por isolados do gênero *Penicillium*.

A alta estabilidade térmica e alta temperatura ótima e o pH ótimo de 5,2 apresentados pela endoglicanase de *P. digitatum* faz dela uma enzima promissora para aplicações em diversas áreas da indústria, como para a produção de biocombustível e no ramo de papel e celulose, nestas condições de pH e de temperatura. Estudos sobre as condições de atuação da endoglicanase de *P. digitatum* em relação à degradação de materiais lignocelulósicos deverão ser posteriormente conduzidos.

## 5 CONCLUSÕES

Em conclusão, este trabalho relatou as condições ótimas de crescimento para a produção elevada da endoglicanase de *P. digitatum*, utilizando lactose como fonte de carbono, descreveu um método de purificação da enzima e apresentou algumas características bioquímicas da enzima purificada. A enzima de *P. digitatum* causa a hidrólise da CMC, sendo uma endoglicanase ou CMCase. As altas estabilidade térmica e temperatura ótima e o pH ótimo na faixa ácida de pH fazem com que esta enzima seja aplicável para a sacarificação da celulose nestas condições de pH e temperatura.

## **6 AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, pela bolsa de mestrado concedida à F. C. dos Santos e pelo auxílio financeiro ao projeto, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

ABE, C.A.L. **Análise da presença de atividades enzimáticas em fungos isolados de semente de milho (*Zea mays*, L.)**. Monografia de conclusão de curso. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

AEHLE, W. **Enzymes in industry: production and applications**. Second edition, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2004.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar. **B. CEPPA.**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 21, p. 12–17, 1997.

BAI, H.; WANG, H.; SUN, J.; IRFAN, M.; HAN, M.; HUANG, Y.; HAN, X.; YANG, Q. Purification and characterization of beta 1,4-glucanases from *Penicillium simplicissimum* H-11. **BioResources**. v. 8, n. 3, p. 3657-3671, 2013.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, v. 18, p. 355–383, 2000.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **J. App. Microbiology.**, v. 3, p. 2196–2204, 2007.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **RBAC – Rev. Bras. Agrocomput.**, v.1, n.2, p. 18-24, 2001.

CGEE. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), 2009. Disponível em [http://www.cogen.com.br/paper/2010/Livro\\_Bioetanol\\_Cana\\_Acucar\\_2009.pdf](http://www.cogen.com.br/paper/2010/Livro_Bioetanol_Cana_Acucar_2009.pdf) Acesso em 17/03/2014.

CGEE. Enzimas industriais e especiais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), 2006. Disponível em <http://www.cgee.org.br/arquivos/relatorio2006.pdf>. Acesso em 17/03/2014.

CGEE. Química Verde no Brasil 2010-2030. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), 2010. Disponível em [www.cgEE.org.br/atividades/redirect/6528](http://www.cgEE.org.br/atividades/redirect/6528). Acesso em 17/03/2014.

CHAABOUNI, S. E.; MECHICHI, T.; LIMAM, F.; MARZOUKI, N. Purification and characterization of two low molecular weight endoglucanases produced by *Penicillium occitanis* mutant Pol 6. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 125, p. 99-112, 2005.

CHULKIN, A. M.; LOGINOV, D. S.; VAVILOVA, E. A.; ABYANOVA, A. R.; ZOROV, I. N.; KURZEEV, S. A.; KOROLEVA, O. V.; BENEVOLENSKII, S. V. Enzymological properties of endo-(1-4)- $\beta$ -Glucanase Eg12p of *Penicillium canescens* and characteristics of structural gene *egl2*. **Biochemistry–Moscow**, v. 74, p. 655-662, 2009.

DAS, A.; GHOSH, U. Solid-state fermentation of waste cabbage of *Penicillium notatum* NCIM NO-923 for production and characterization of cellulases. **J. Sci. Ind. Res. India.**, v. 68, p. 714-718, 2009.

DAS, A.; GHOSH, U.; MOHAPATRA, P. K. D.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Study on thermodynamics and adsorption kinetics of purified endoglucanase (CMCase) from *Penicillium notatum* Ncim No-923 produced under mixed solid-state fermentation of waste cabbage and bagasse. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, p. 1103-1111, 2012.

DASHTBAN, J.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 5, p. 578-595, 2009.

DILLON, A.J.P. Cellulases. In SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, Ltda, 2004.

FANG, X.; YANO, S.; INOUE, H.; SAWAYAMA, S. Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 106, n. 2, p. 115-120, 2008.

FARIA, C. B.; ABE, C. A. L.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 115-132, 2012.

FEICHTENBERGER, E; BASSANEZI, R.B; SPOSITO, M.B; BELASQUE, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H., AMORIN, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., v.2, p.239-271, 2005.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Efeito de produtos alternativos para o controle do bolor verde (*Penicillium digitatum*) em pós-colheita de citros. **Rev. Bras. Frutic.**, v.24, n.2, p.569-572, 2002.

GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on Carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technol.**, v. 77, p. 171-175, 2001.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.**, v. 59, p. 257–268, 1987.

HENRISSAT, B. A Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.**, v. 280, p.309-316, 1991.

JAVED, M. R.; RASHID, M. H.; NADEEM, H.; RIAZ, M.; PERVEEN, R. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 157, p. 483–497, 2009.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Ind. Crop. Prod.**, v.11, p. 1–5, 2000.

JEYA, M.; JOO, A.-R.; LEE, K.-M.; SIM, W.-I.; OH, D.-K.; KIM, Y.-S.; KIM, I.-W. ; LEE, J.-K. Characterization of endo- $\beta$ -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium pinophilum* KMJ601. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 85, p. 1005–1014, 2010.

JØRGENSEN, H.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 32, p. 851–861, 2003.

JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 36, p. 42–48, 2005.

KUBICEK, C. P.; M. E. PENTTILA. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In *Trichoderma and Gliocladium*, G. E. Harman and C. P. Kubicek (ed.), Second ed. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom, p. 49–72, 1998

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-5, 1970.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MACARISIN, D.; COHEN, L.; EICK, A.; RAFAEL, G.; BELAUSOV, E.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. **Phytopathology**, v. 97, p. 1491-1500, 2007.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases - cellulases and their applications. **Adv. Chem.**, v. 95, cap. 23, p. 391–414, 1969.

MERNITZ, G.; KOCH, A.; HENRISSAT, B.; SCHULZ, G. Endoglucanase II (EGII) of *Penicillium janthinellum*: cDNA sequence, heterologous expression and promoter analysis. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 490–495, 1996.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of deducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; BUDDOLLA, V.; SUBHOSH, C. M.; RAJASEKHAR, R. B. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 5, n. 5, p. 472-476, 2006.

NICOLI, A.; ZAMBOLIM, L.; MARO, L. A.C.; ROMA, R. C. C.; DUARTE, H. S. S. Comparação da eficiência entre produtos alternativos e fungicidas no controle de bolor verde em laranja. **R. Trop. Ci. Agr. Biol.**, v. 3, n. 2, p. 12, 2009.

NOGAWA, M.; GOTO, M.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **Curr. Genet.**, v. 38, p. 329–334, 2001.

PASTOR, F.I.J.; PICART, P.; DIAZ, P. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 45, p. 108–113, 2007.

PHALIP, V.; GOUBET, F.; CARAPITO, R.; JELTSCH, J. M. Plant cell wall degradation with a powerful *Fusarium graminearum* enzymatic arsenal. **J. Microbiol. Biotechn.**, v. 19, p. 573-581, 2009.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. Third edition. New York: Springer, 2009.

POL, D.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 49, p. 189-194, 2012.

QIN, Y.; WEI, X.; SONG, X.; QU, Y. Engineering endoglucanase II from *Trichoderma reesei* to improve the catalytic efficiency at a higher pH optimum. **J. Biotechnol.**, v. 135, p. 190–195, 2008.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

SAID, S.; PIETRO, R. C. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, Ltda, 2004.

SEIBOTH, B.; HARTL, L.; PAIL, M.; FEKETE, E.; KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P. The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 1015–1025, 2004.

SEIBOTH, B.; KARAFFA, L.; FEKETE, E.; GAMAUF, C.; SZENTIRMAI, A.; KUBICEK, C. P. D-Galactose induces cellulose gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. **Microbiology**, v. 152, p. 1507–1514, 2006.

SINDHU, R.; SUPRABHA, N. G.; SHASHIDHAR, S. Media engineering for the production of cellulase from *Penicillium* species (SBSS 30) under solid state fermentation. **Biotechnol. Bioinf. Bioeng.**, v. 1, n. 3, p. 343-349, 2011.

SUL, O.-J.; KIM, J.-H.; PARK, S.-J.; SON, Y.-J.; PARK, B.-R.; JEONG, C.-S.; HAN, I.-S. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.66, p. 63–70, 2004.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. **J. Biochem.**, v. 125, p. 728–736, 1999.

WANG, T.; LIU, X.; YU, Q.; ZHANG, X.; QU, Y.; GAO, P.; WANG, T. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. **Biomol. Eng.**, v. 22, p. 89–94, 2005.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M.A.; GELFAND, H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (eds). PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press Inc, 1990. p. 315-322.

ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, p. 452-481, 2006.

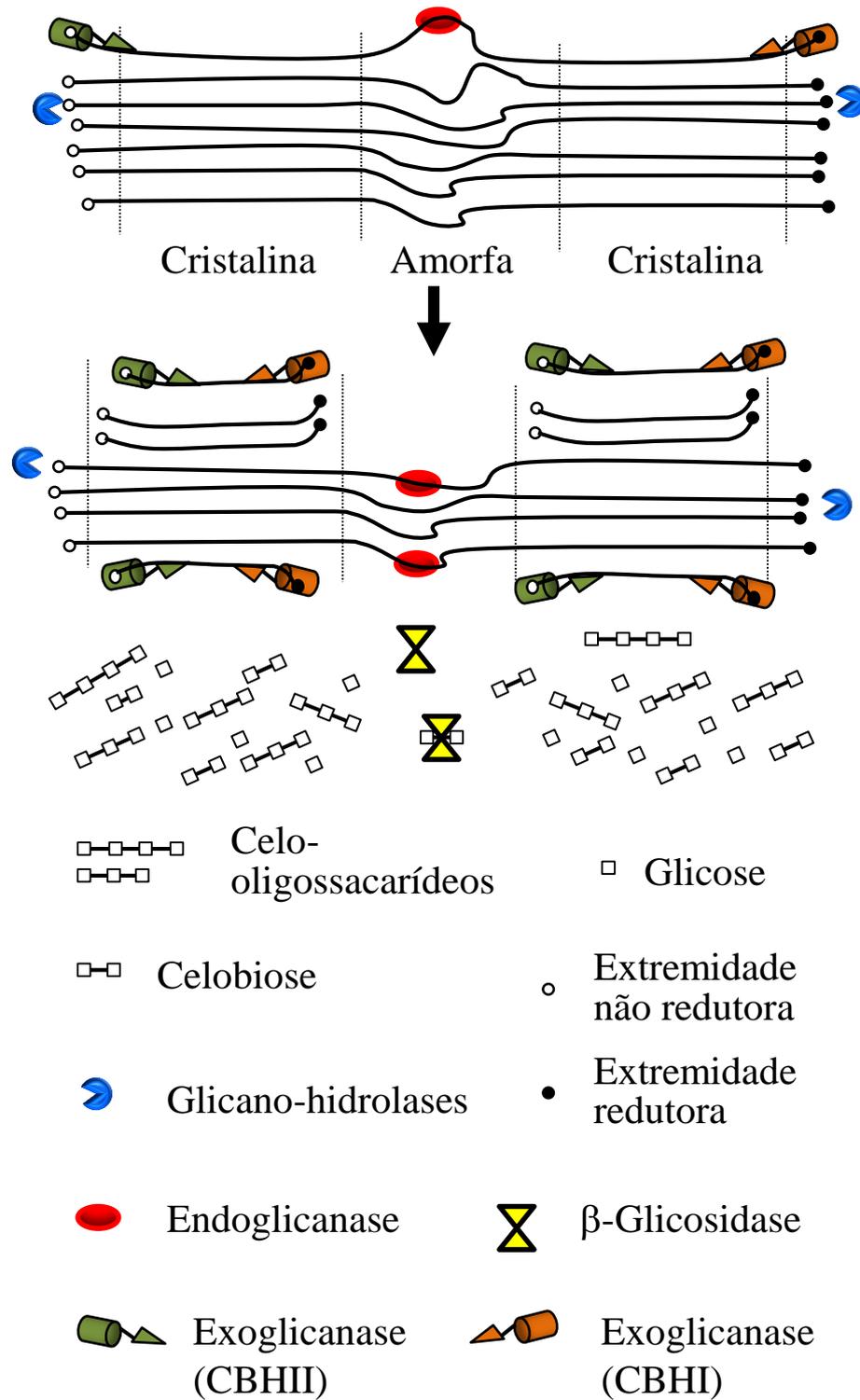
**Tabela 1.** Resumo das principais enzimas hidrolíticas e seus usos em vários ramos da indústria.

<b>ENZIMA</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Papel &amp; Celulose</b>	<b>Têxtil</b>	<b>Limpeza</b>	<b>Cosmética &amp; Farmacêutica</b>
Amilase	Panificação: melhoramento de massas e produção de xaropes.		Desengomagem.	Remoção de manchas, resíduos orgânicos, higienização de instrumentos cirúrgicos, contaminantes de roupas hospitalares.	Deficiência de secreção do suco pancreático, inflamação crônica do pâncreas, etc.
Celulase	Clarificação de sucos, extração de óleo, aumento da qualidade e digestibilidade da ração animal.	Papel reciclado: despigmentação da matriz celulósica. Melhorar drenagem e operabilidade das fábricas de papel.	Lavagem do jeans; bioestonagem, biopolimento do algodão.		Auxilia digestão/carboidrase.
Lipase	Laticínio: decompõe gorduras, sabor ao queijo.	Remoção de impurezas.	Remoção de lubrificantes.		Limpeza de pele, tratamento de acne. Deficiência de enzimas pancreáticas e indigestão.
Proteases	Laticínio, Cerveja, amaciamento carne.		Biopolimento; Melhoria do brilho e qualidade.		Auxílio da digestão.
Xilanase	Panificação.	Branqueamento da polpa.			<i>Peeling</i> , estrias, controle da oleosidade.

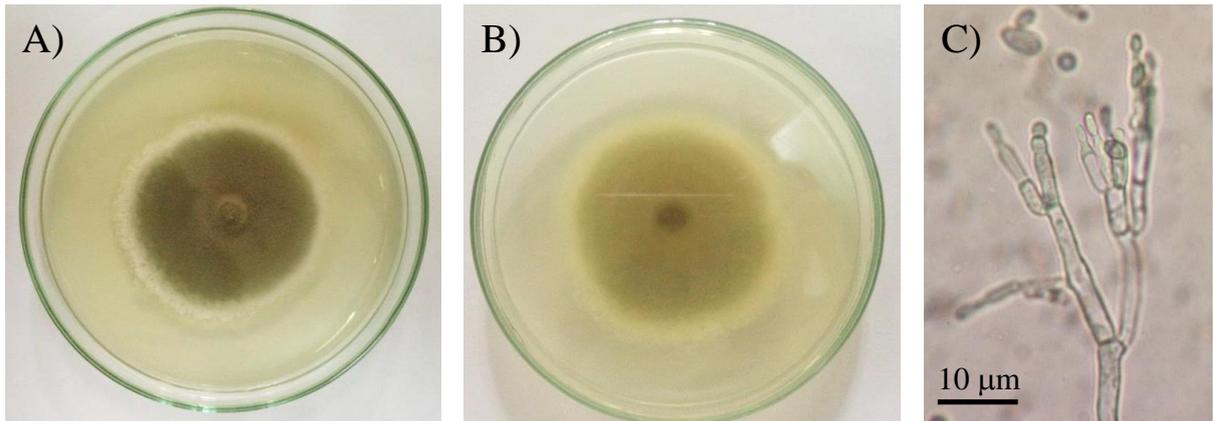
Fonte: Bhat (2000); Said & Pietro (2004).

**Tabela 2.** Purificação da endoglicanase de *P. digitatum*

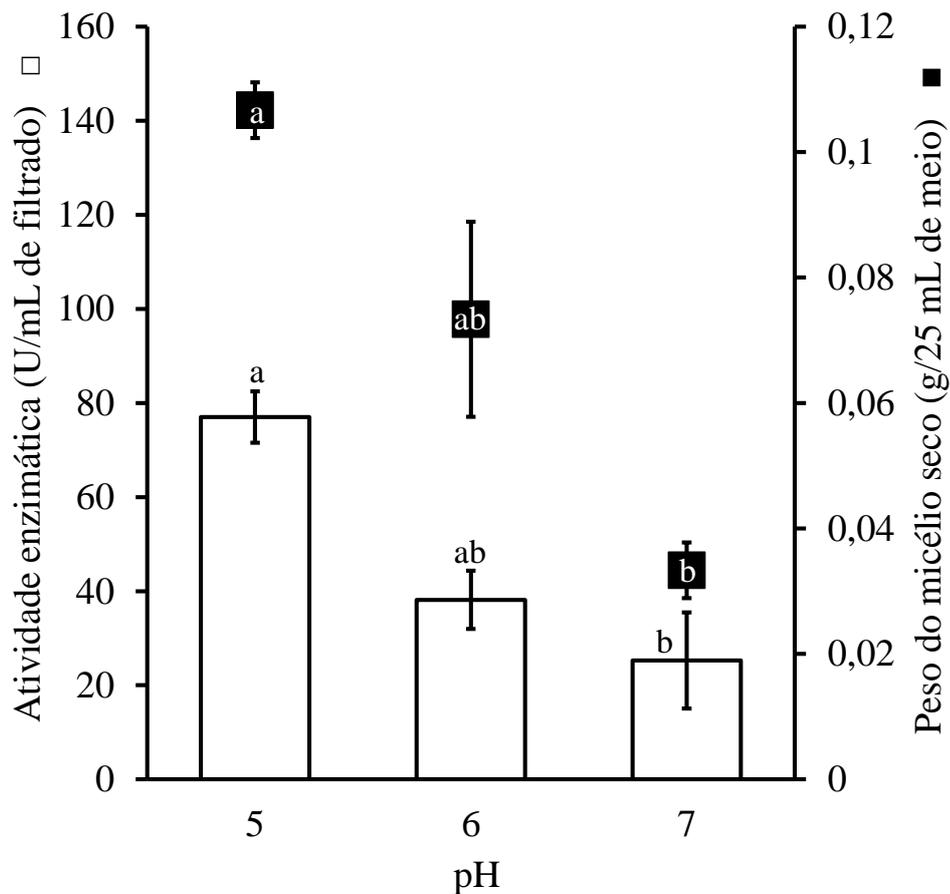
	Volume (mL)	Atividade enzimática total (U)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg de proteína)	Recuperação (%)
Filtrado	200,0	34.000,00	48,28	704,29	
Após precipitação e diálise	4,5	60.666,70	29,17	2.079,59	100
Sephacryl S-200 HR	8,0	5.893,35	2,15	2.742,41	9,07



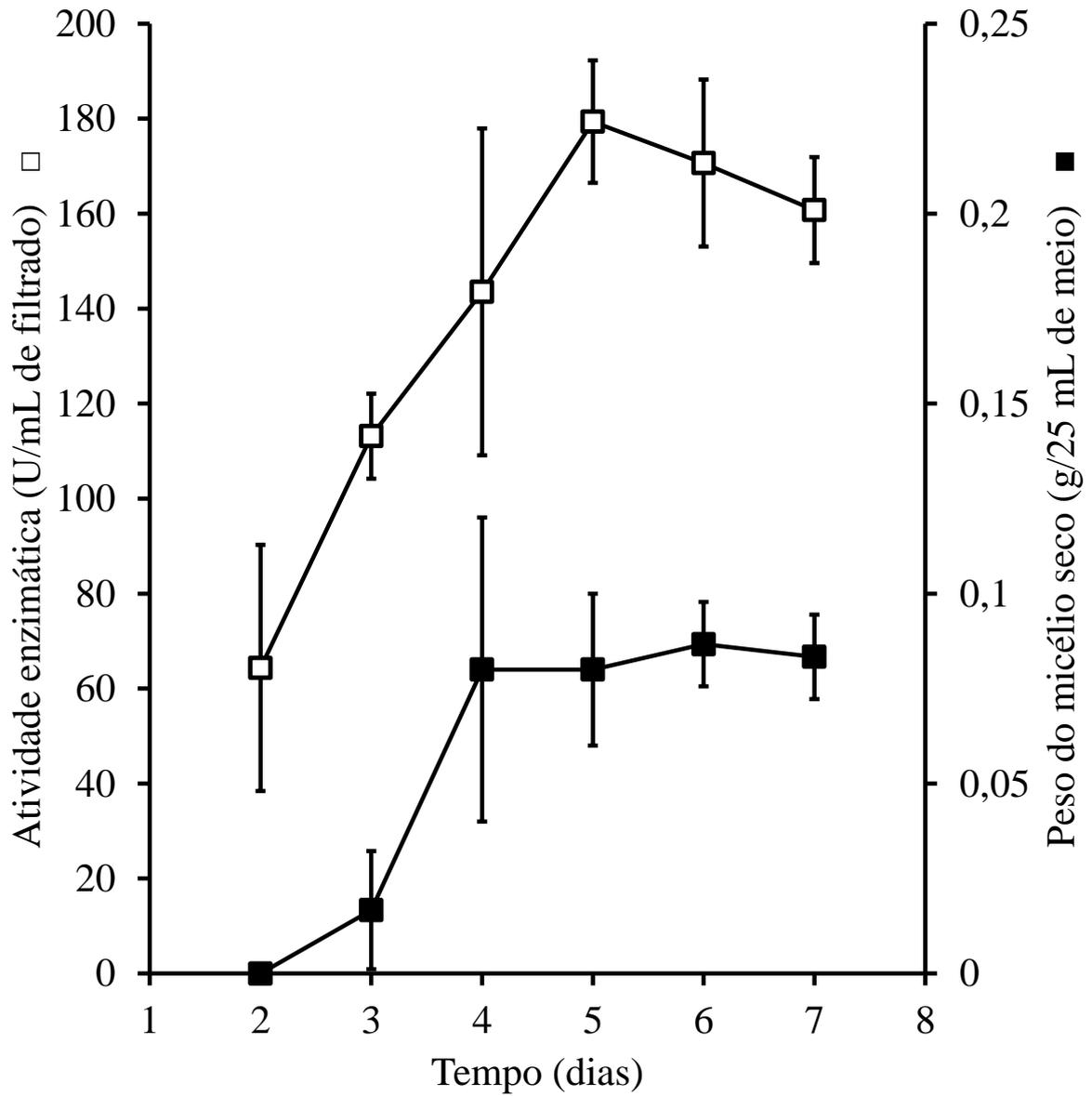
**Figura 1.** Representação esquemática da hidrólise da celulose pelo complexo enzimático da celulase. Baseado em Lynd et al. (2002).



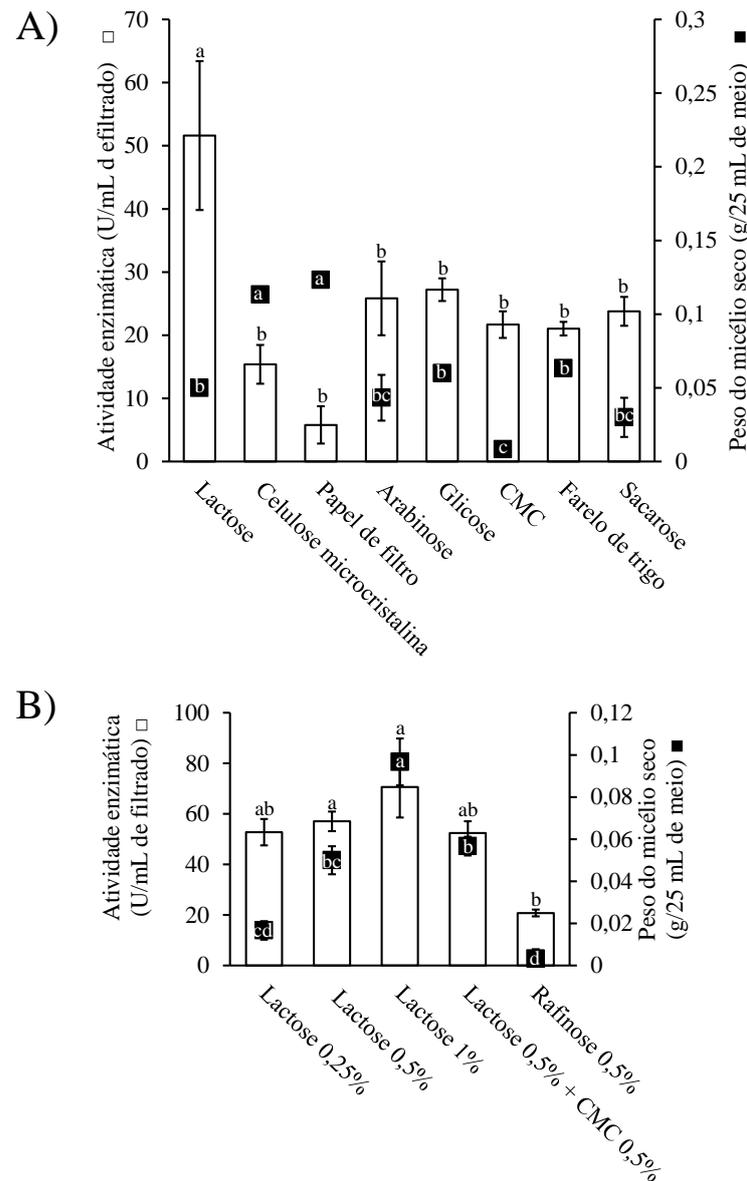
**Figura 2.** Isolado de *P. digitatum*. Placa com meio CYA contendo colônias de *P. digitatum* Cultura de sete dias de *P. digitatum* no meio CYA Frente (A) e verso (B). (C) Conidióforos observados ao microscópio ótico.



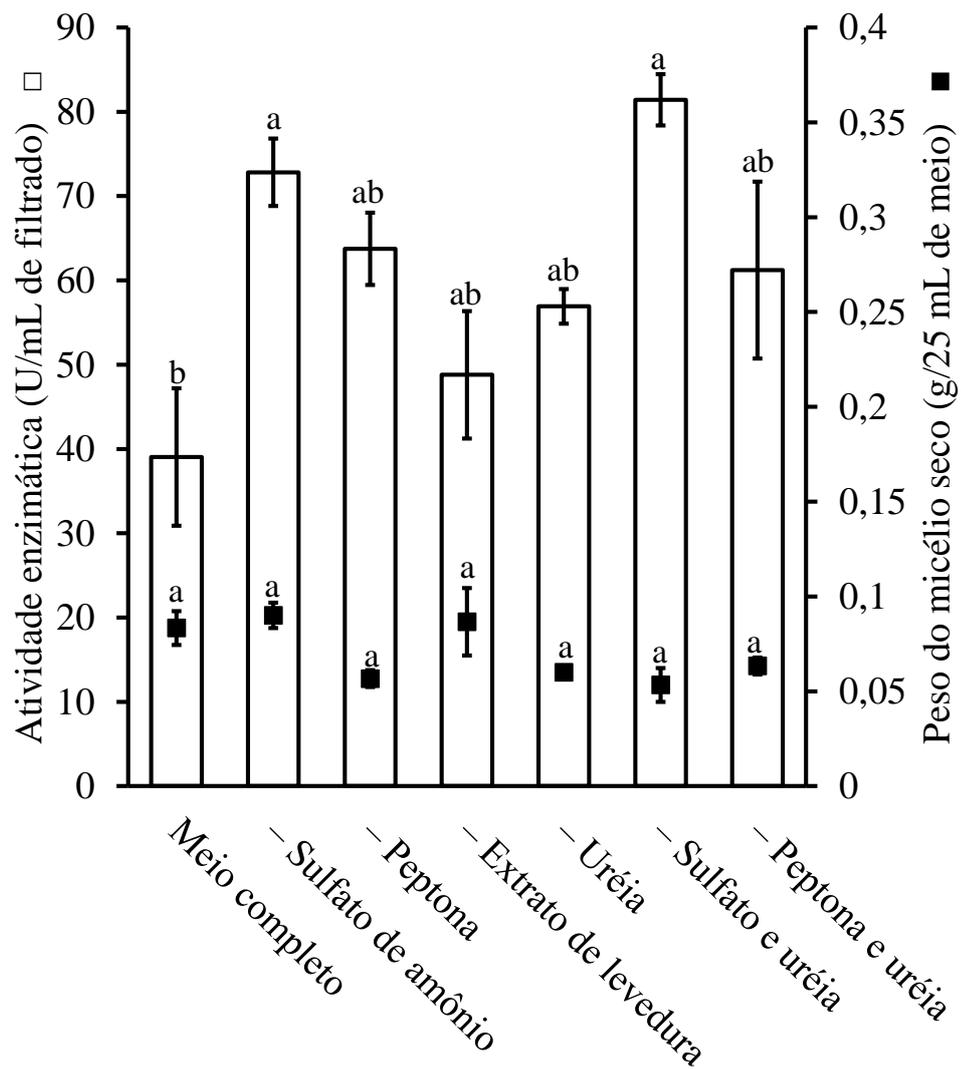
**Figura 3.** Efeito do pH do meio de cultivo sobre a produção da endoglicanase por *P. digitatum*. O microrganismo foi cultivado por 5 dias no meio descrito por Mandels & Weber (1969) com 1,0% (m/v) de lactose como fonte de carbono. Os valores de pH foram corrigidos para 5,0, 6,0, e 7,0 com a adição de NaOH ao meio de cultivo. Os dados representam a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos três frascos de cultivo. Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,01$ ). C. V. da atividade enzimática = 20,1%. C. V. do peso do micélio seco = 18,75%.



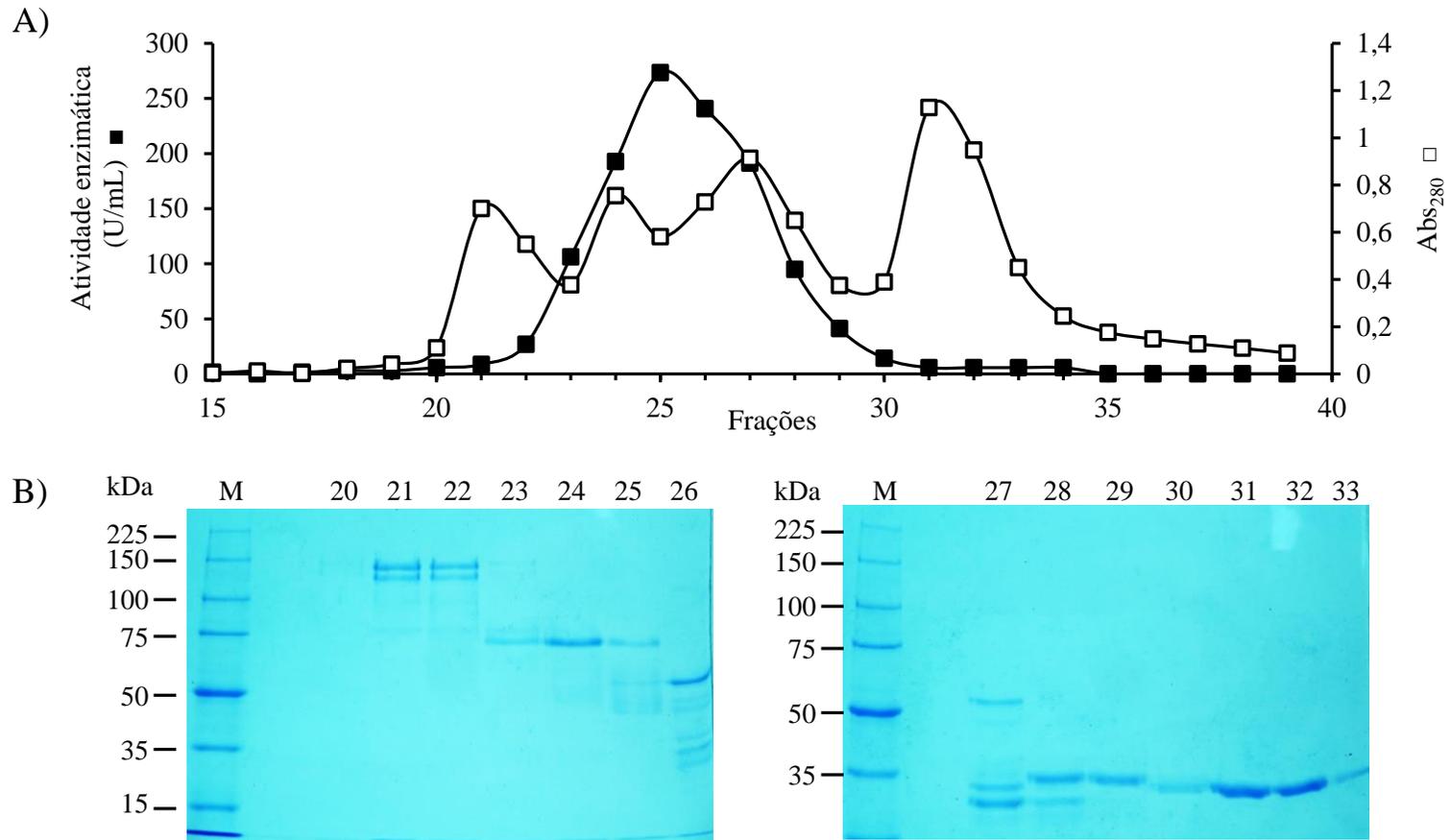
**Figura 4.** Curva de crescimento do *P. digitatum* e produção da endoglicanase. Efeito do tempo de cultivo sobre a produção da endoglicanase e do crescimento de *P. digitatum*. Os dados representam a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos três frascos de cultivo.



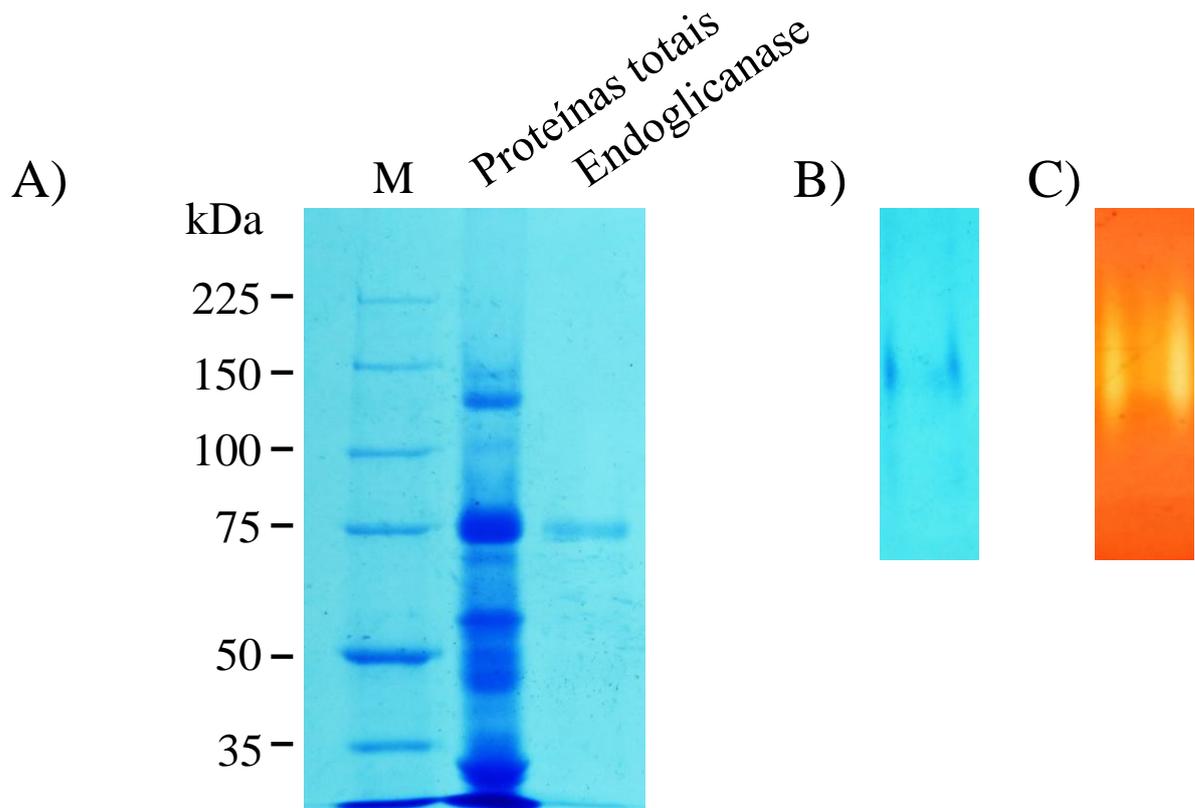
**Figura 5.** Influência da fonte de carbono do meio de cultivo completo na produção da endoglicanase por *P. digitatum*. A) Efeito de diferentes fontes de carbono. B) Efeito da concentração de lactose, da combinação de lactose e CMC e da presença de rafinose no meio de cultivo. Os dados representam a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos três frascos de cultivo. Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,01$ ). C. V. da atividade enzimática em A) = 27,24% e em B) = 18,55%. C. V. do peso do micélio seco em A) = 17,83% e em B) = 23,12%.



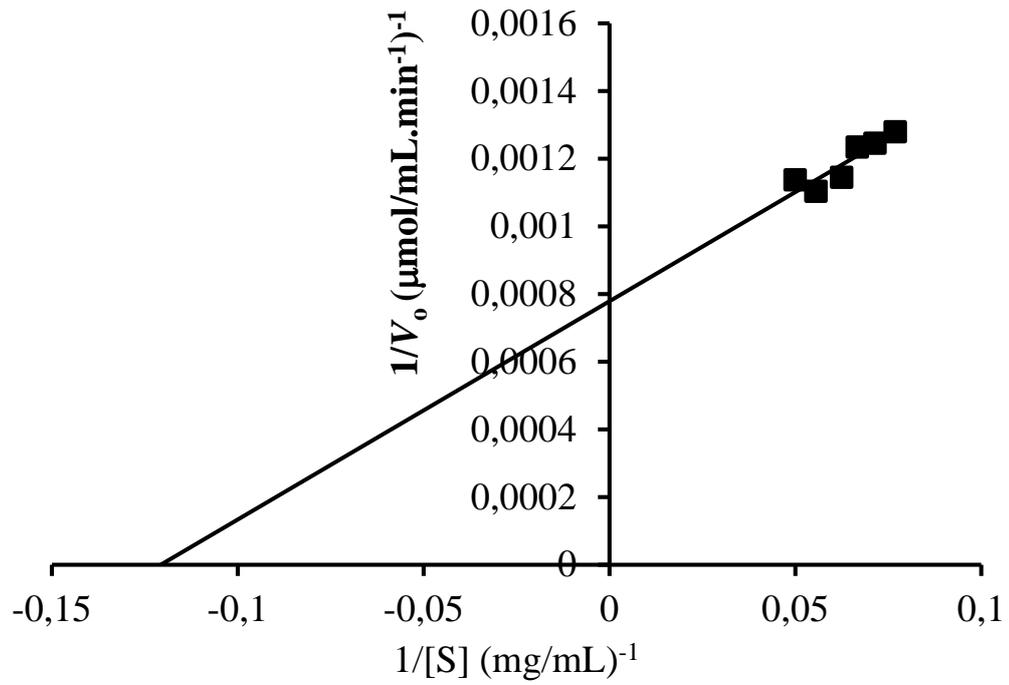
**Figura 6.** Influência da fonte de nitrogênio do meio de cultivo na produção da endoglucanase por *P. digitatum*. O meio completo foi o controle. As fontes removidas do meio completo são indicadas. Os dados representam a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em pelo menos três frascos de cultivo. Médias seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,01$ ). C. V. da atividade enzimática 14,78%. C. V. do peso do micélio seco 15,99%.



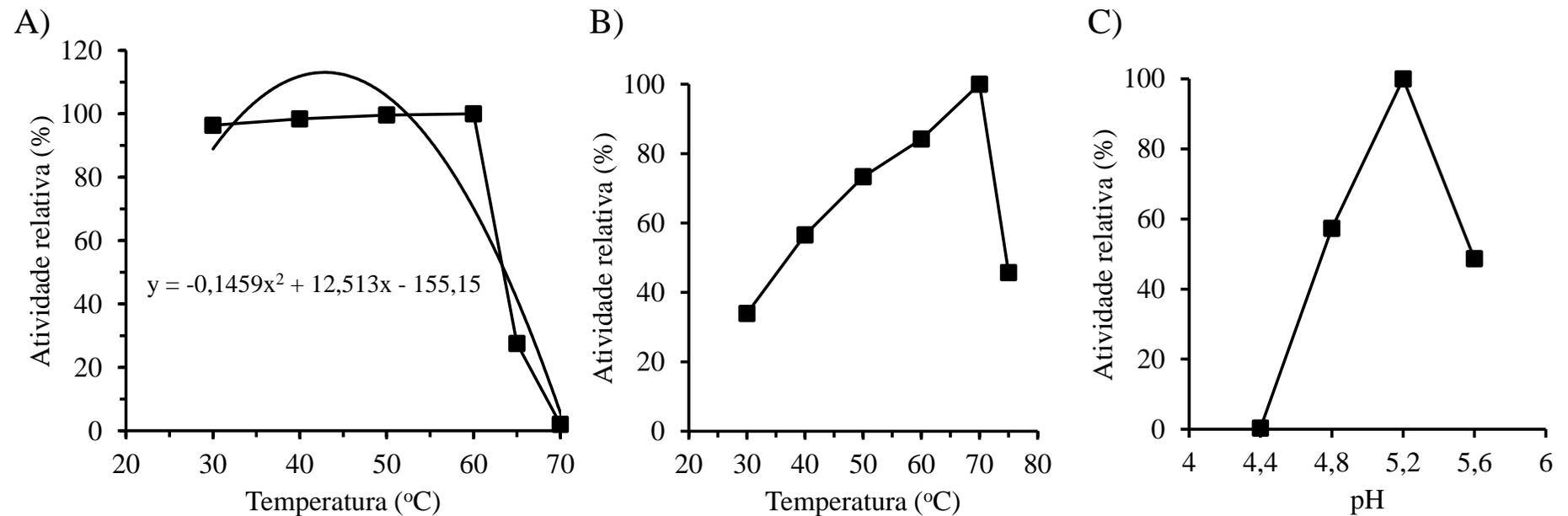
**Figura 7.** Eluição da coluna de Sephacryl S-200 HR. A) A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato 50 mmol/L, pH 4,8. O fluxo foi de 0,6 mL/min e frações de 4 mL foram coletadas. B) Gel de SDS-PAGE 7,5% corado com azul de Coomassie mostrando as proteínas (1  $\mu$ g) das frações indicadas. As posições dos marcadores moleculares (Promega, EUA) são indicadas.



**Figura 8.** Análises eletroforéticas da enzima purificada. A) Análise de SDS-PAGE (7,5%) descontínuo da enzima purificada (0,8 µg) e das proteínas totais (36 µg) do meio de cultivo de *P. digitatum*. O gel foi revelado com a coloração com Azul de Coomassie. Proteínas totais são as proteínas obtidas após precipitação com sulfato de amônio e diálise. As posições dos marcadores moleculares (Promega, EUA) são indicadas. B) A proteína purificada (3 µg) foi corrida em um gel de PAGE descontínuo a 7,5%, que foi revelado com a coloração com Azul de Coomassie. C) A proteína purificada (3 µg) e corrida em um gel de PAGE descontínuo a 7,5% foi submetida à análise de zimograma para mostrar a atividade de endoglicanase sobre a CMC da enzima purificada.



**Figura 9.** Gráfico de Lineweaver-Burk da velocidade inicial para a endoglucanase de *P. digitatum*. A atividade enzimática foi avaliada como descrito no ensaio enzimático com o tampão acetato 50 mmol/L, pH 4,8, a 50 °C.



**Figura 10.** Estabilidade térmica, temperatura e pH ótimos e da endoglicanase de *P. digitatum*. A) A estabilidade térmica foi determinada pela incubação da enzima por 2 horas em diferentes temperaturas seguida do ensaio enzimático a 50 °C com o tampão acetato 50 mmol/L, pH 4,8. A curva e a equação de regressão polinomial obtidas são mostrados. B) A temperatura ótima foi determinada no ensaio enzimático em diferentes temperaturas com o tampão acetato 50 mmol/L, pH 4,8. C) O pH ótimo foi determinado com o ensaio enzimático realizado no tampão de acetato 50 mmol/L em diferentes pHs.