



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Vanessa Salto Massarente

**Caracterização bioquímica e purificação das endoglucanases
produzidas por *Myceliophthora thermophila* M.7.7 em cultivo em
estado sólido**

São José do Rio Preto

2018

Vanessa Salto Massarente

**Caracterização bioquímica e purificação das endoglucanases
produzidas por *Myceliophthora thermophila* M.7.7 em cultivo em
estado sólido**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista — Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2018

Massarente, Vanessa Salto.

Caracterização bioquímica e purificação das endoglucanases produzidas por *Myceliophthora thermophila* M.7.7 em cultivo em estado sólido / Vanessa Salto Massarente . -- São José do Rio Preto, 2018

87 f. : il.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla

Rodriguez Coorientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas. 3. Fungos termofílicos. 4. Bioenergia. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Vanessa Salto Massarente

Caracterização bioquímica e purificação das endoglucanases produzidas por *Myceliophthora thermophila* M.7.7 em cultivo em estado sólido

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista — Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luciano Takeshi Kishi

UNESP – Jaboticabal

São José do Rio Preto

24 de Abril de 2018

Àqueles que apesar de todas as adversidades, sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e acompanhar sempre com suas bênçãos;

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez, que desde o início se demonstrou uma pessoa com um coração tão enorme quanto sua sabedoria, não poupando esforços para me ensinar e acompanhar na realização de meu mestrado, independentemente do quão difícil fossem os obstáculos pelo caminho a ser seguido;

Aos meus pais Emílio e Daisy e ao meu irmão Dreisson, que sempre me apoiaram e compreenderam minhas escolhas, que preenchem minha vida com felicidade e que me completam com suas companhias;

Ao meu namorado Eduardo, que me acompanha, me apoia e me ilumina com sua companhia e perseverança;

A todos meus entes queridos e amigos, e aos que permanecem em minha memória;

À Prof. Dra. Eleni Gomes, que me coorientou neste trabalho e me ajudou neste percurso tão especial de minha vida com tanto empenho, sabedoria e dedicação;

Aos meus colegas de laboratório Jéssica Z., Gabriela S., Gabriela M., Sirlene S., Josiane P., Júlia R., Maitê B., Valentina B., Flávio, Álvaro, Isabela, Pedro, Diego, Jennifer, Ana Beatriz, Gilmárcio, Alex e todos os colegas do programa de pós-graduação em Microbiologia, por toda ajuda e companhia durante os experimentos;

A todos os professores e funcionários do IBILCE que me auxiliaram durante o trabalho, em especial aos Prof. Dr. Mauricio Boscolo, Roberto da Silva e João Cláudio Thoméo;

À CAPES pelo incentivo financeiro oferecido e apoio à pesquisa.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO:

Para melhor compreensão do leitor, a dissertação foi dividida em dois capítulos, o primeiro dos quais apresenta o tema, uma revisão bibliográfica, a justificativa, objetivos gerais e específicos e as referências bibliográficas da primeira parte.

O segundo capítulo foi redigido na forma de um manuscrito em fase inicial de redação contendo a arquitetura usual: introdução, objetivos, material e métodos, resultados e discussão, conclusões e referências bibliográficas, embora com as figuras inseridas no corpo do texto. Este capítulo é mais longo do que seria o formato de um artigo a ser submetido, porém permite descrever os métodos utilizados de forma mais detalhada, evitando um texto adicional que tivesse o objetivo de fazer esse detalhamento, tornando-se repetitivo.

RESUMO

As celulasas são enzimas empregadas principalmente na indústria de papel e celulose e têxtil, e têm ganhado destaque pelo seu potencial hidrolítico em materiais lignocelulósicos na produção de etanol, já que são capazes de hidrolisar a celulose. O objetivo do projeto foi efetuar a caracterização e isolamento das endoglucanases produzidas pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7 em cultivo em estado sólido. Foram realizados ensaios para avaliar os efeitos do pH, da temperatura, de diversas substâncias químicas, cátions e compostos fenólicos na atividade enzimática. A estimativa da massa molecular foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e como resultado foi possível observar sete endoglucanases detectadas por zimografia, que possuem massa molecular estimada entre 26 e 82 kDa. O valor ótimo para o pH do extrato enzimático bruto foi 5,5 e 70°C para a temperatura ótima em incubação de 4 minutos. Em relação à estabilidade do extrato bruto, os maiores valores ocorreram entre as faixas de pH de 6 a 6,5, e 30 e 40°C para temperatura até 120 minutos. Entre os reagentes testados, Triton, DTT e Isopropanol aumentaram a atividade enzimática sobre o extrato bruto em cerca de 10%. Os cátions NaCl, SrCl₂, BaCl₂ e ZnCl₂ aumentaram a atividade das endoglucanases. Em relação aos compostos fenólicos, todos induziram em diversos graus o decréscimo da atividade das endoglucanases do extrato bruto. Das sete endoglucanases, três foram isoladas pela extração direta do gel após eletroforese em poliacrilamida. Duas possuem atividade considerável entre os pHs 4,0 e 7,0, e uma em pH 10,5. As três enzimas apresentaram redução em sua atividade nos pHs 8,5 e 9,0, porém apresentaram boa atividade nos pHs 10,0 e 10,5 e tiveram sua temperatura ótima em 70°C. Avaliaram-se os parâmetros termodinâmicos das endoglucanases do extrato enzimático bruto, permitindo determinar o tempo de meia vida em 165 minutos a 50°C, e elevada resistência estrutural à desnaturação térmica, analisados pela variação da entropia, energia livre de Gibbs e entalpia.

Palavras-chave: Enzimas. Endoglucanases. Fungos termofílicos. Bioenergia.

ABSTRACT

Cellulases are enzymes used mainly in the paper and cellulose and textile industries and have been highlighted for their hydrolytic potential in lignocellulosic materials in the production of ethanol, since they are capable of hydrolyzing cellulose. The objective of the project was to characterize and isolate the endoglucanases produced by the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid state cultivation. Tests were carried out to evaluate the effects of pH, temperature, several chemical substances, cations and phenolic compounds on enzymatic activity. The molecular weight estimation was performed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and as a result it was possible to observe seven endoglucanases detected by zymography, which have an estimated molecular mass between 26 and 82 kDa. The optimum pH for the crude enzyme extract was 5.5, and 70 °C for the optimum incubation temperature for 4 minutes. Regarding the stability of the crude extract, the highest values occurred between the pH ranges from 6 to 6.5, and 30 to 40°C for temperature up to 120 minutes. Among the tested reagents, Triton, DTT and Isopropanol increased the enzymatic activity on the crude extract by about 10%. NaCl, SrCl₂, BaCl₂ and ZnCl₂ increased the endoglucanase activity. With respect to the phenolic compounds, all induced to varying degrees the decrease in the activity of the endoglucanases of the crude extract. Of the seven endoglucanases, three were isolated by direct gel extraction after polyacrylamide electrophoresis. Two have considerable activity between pHs 4.0 and 7.0, and one at pH 10.5. The three enzymes presented a reduction in their activity at pHs 8,5 and 9,0, but they showed good activity at pHs 10.0 and 10.5 and had their optimum temperature at 70°C. The thermodynamic parameters of the endoglucanases of the crude enzymatic extract were determined, allowing the determination of the half-life as 165 minutes at 50°C, and high structural resistance to thermal denaturation, analyzed by the entropy, Gibbs free energy and enthalpy variation.

Keywords: Enzymes. Endoglucanases. Thermophilic fungi. Bioenergy.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Estrutura da parede celular vegetal22
- Figura 2.** Complexo lignocelulósico da parede celular vegetal.....23
- Figura 3.** Passos da hidrólise enzimática da molécula de celulose.....24
- Figura 4.** Processo de conversão bioquímica convencional para produção de combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica.....25
- Figura 5.** Processos que ocorrem durante o cultivo em estado sólido, em micro-escala.
.....27

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Curva de produção de endoglucanase pelo fungo termofílico *M. thermophila* por cultivo em estado sólido a 45°C. A barra representa o valor da média de atividade usando substrato CMC de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.49
- Figura 2.** Zimograma de endoglucanases presentes no extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *M. thermophila* (1) e das endoglucanases A (2), B (3) e G (4) isoladas. O gel foi corado com 0,1% de vermelho Congo e descorado com NaCl 1 mol L⁻¹, e a foto editada utilizando-se o programa GIMP 2.8.16 (GNU Image Manipulation Program), usando filtros para transformação da imagem a tons de cinza e aumento do contraste. As bandas claras demonstram a presença das endoglucanases.....51
- Figura 3.** Gel de SDS-PAGE (gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) comparado ao zimograma. A coluna 1 corresponde ao zimograma, a coluna 2 corresponde ao extrato enzimático bruto com tampão de amostra na presença de SDS e sem exposição à fervura, a coluna 3 corresponde aos marcadores de massa molecular High weight standard mixture - Sigma (29 – 205 kDa) e a coluna 4 corresponde ao marcador molecular soro albumina bovina (66 kDa)..52
- Figura 4.** Gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração em gel de poliacrilamida.....53

Figura 5. Atividade enzimática de endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* após 24 horas em variadas temperaturas de armazenamento na presença e na ausência de 50% de glicerol. A barra representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. O valor médio de atividade enzimática das amostras testadas antes do armazenamento com e sem glicerol foram consideradas como controles. a: diferença significativa de amostra sem glicerol em relação ao seu controle; b: diferenças significantes de amostra com glicerol em relação ao seu controle; c: diferenças significantes das amostras com glicerol em relação àquelas sem glicerol.54

Figura 6. Avaliação do efeito de congelamentos e descongelamentos do extrato enzimático bruto de *M. thermophila* M.7.7.. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.....56

Figura 7. Efeito do pH sobre a atividade das endoglucanases do extrato enzimático de *M. thermophila* M.7.7. . O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. Temperatura do ensaio: 50°C.....57

Figura 8. Efeito do pH sobre a atividade das endoglucanases de *M. thermophila* M.7.7 após incubação por 24 h em diferentes valores de pH: O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. O ensaio enzimático foi realizado à 50°C, o controle (100%) foi constituído por água ultrapura e extrato enzimático e também mantido por 24h.....59

Figura 9. Efeito do pH sobre a atividade das endoglucanases produzidas pelo fungo *M. thermophila* M.7.7, isoladas por eletroforese em gel de poli(acrilamida). O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.61

Figura 10. Efeito da temperatura do ensaio enzimático sobre a atividade das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7. Os ensaios foram executados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5 com 4% (m/v) de CMC. O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.62

Figura 11. Efeito da temperatura de pré-incubação em diversos tempos sobre a atividade das endoglucanases do extrato bruto de <i>M. thermophila</i> M.7.7. O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	64
Figura 12. Teste de estabilidade de Selwyn para endoglucanases presente em extrato enzimático produzido pelo fungo termofílico <i>M. Thermophila</i> M.7.7.. As curvas dos diferentes fatores de diluição estão representadas por 2 (●), 5 (□) e 10 (◆). O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.	73
Figura 13. Parâmetros cinéticos aparentes das endoglucanases do extrato bruto de <i>M. thermophila</i> M.7.7 utilizando substrato CMC a 4% na temperatura e pH ótimos.	74
Figura 14. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima das endoglucanases do extrato bruto de <i>M. thermophila</i> M.7.7 utilizando substrato CMC a 4%.	75
Figura 15. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade das endoglucanases do extrato bruto.	77
Figura 16. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{a_d}) das endoglucanases do extrato bruto de <i>M. thermophila</i> M.7.7.....	78
Figura 17. Temperatura de fusão das endoglucanases de <i>M. thermophila</i> M.7.7.	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Efeito de substâncias químicas na concentração final de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade residual percentual (média ± D.P.) de endoglucanases presentes em extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *M. Thermophila* M.7.7. (*) Diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.....66
- Tabela 2.** Efeito de sais contendo cloro na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade das endoglucanases (média ± D.P.) presentes no extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *M. thermophila*. (*) Diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.....69
- Tabela 3.** Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade relativa (%) das endoglucanases presentes em extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *M. Thermophila* M.7.7.. (*) diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes. NR: não realizado.71
- Tabela 4.** Coeficientes térmicos (Q₁₀) das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7 utilizando substrato CMC a 4%, estimados com base no Gráfico de Arrhenius.....76
- Tabela 5.** Parâmetros termodinâmicos da termoinativação irreversível das endoglucanases de *M. thermophila* M.7.7.....78

ABREVIações

CES	Cultivo em Estado Sólido
CMC	Carboximetilcelulose
C_{Sm}	Cultivo Submerso
D.P.	Desvio padrão
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EG	Endoglucanase
kDa	Quilodalton
ln	Logaritmo natural
log	Logaritmo decimal
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
xg	Campo centrífugo relativo (<i>Relative centrifugal field</i>)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. MICRORGANISMOS	18
2.2. MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL	19
2.3. REINO FUNGI	19
2.4. <i>MYCELIOPHTHORA THERMOPHILA</i>	20
2.5. RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.....	20
2.5.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	21
2.5.1.1. CELULOSE.....	21
2.6. CELULASES.....	23
2.6.1. ENDOGLUCANASES	25
2.7. PRODUÇÃO DE ENZIMAS	26
2.8. PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	28
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS	30
5. REFERÊNCIAS	31

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO	40
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. MICRORGANISMO	41
3.2. CULTIVO DO FUNGO	41

3.3. EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA E CLARIFICAÇÃO.....	42
3.4. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS	82

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O planeta Terra vem sofrendo alterações climáticas atualmente explicáveis pelo fenômeno denominado “aquecimento global”, causado pela contínua e crescente liberação de carbono fóssil na atmosfera na forma dos gases metano, dióxido de carbono e outros compostos, em particular a partir da Revolução Industrial, ocorrida entre os séculos XVIII e XIX. A estimativa de emissão de CO₂ derivado de carbono fóssil se situa em torno de 2/3 do total de compostos que contribuem para o efeito estufa (EPA, 2017). Este efeito tem se tornado mais evidente nos últimos anos preocupando ambientalistas e a comunidade internacional, que têm mostrado interesse pelo uso de fontes de energia alternativas “limpas e renováveis” que não usem combustíveis fósseis, conceito amplo no qual se enquadram os biocombustíveis e dentro destes o bioetanol ou etanol de segunda geração. A obtenção deste combustível é possível através da fermentação de açúcares liberados pela ação de enzimas a partir de resíduos vegetais (MENDONÇA, 2015; ROSSET; PORTO, 2015).

Nesses resíduos o termo “material lignocelulósico” refere-se à constituição da parede celular vegetal, a qual é composta por fibrilas de celulose envoltas por uma espécie de camada protetora de hemicelulose e lignina, ligadas covalentemente de forma a garantir rigidez à parede celular e maior resistência à degradação microbiana (JEFFRIES, 1991).

A celulose é o principal constituinte da parede vegetal, considerada um homopolissacarídeo por ser formada por milhares de resíduos de D-glicose com ligações glicosídicas beta-1,4 entre si, sendo também denominada glucano ou beta-glucano. O segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular vegetal é a hemicelulose, sendo composta por diferentes monômeros, incluindo pentoses (D-xilose, L-arabinopiranosose, L-arabinofuranose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), ácidos hexurônicos (D-glicurônico, D-4-O-Metilglicurônico, D-galacturônico) e desoxi-hexoses (L-ramnose e L-fucose) (RABELO, 2010) ligados entre si, resultando em um heteropolissacarídeo com ramificações.

A utilização de enzimas degradadoras do complexo lignocelulósico principalmente de origem microbiana tem sido adotada para a sacarificação da biomassa vegetal ao promoverem a liberação de monômeros de carboidratos para

serem assimilados por leveduras e fermentados para a produção do etanol de segunda geração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos

Entre os microrganismos capazes de produzir enzimas de desconstrução da lignocelulose, os fungos têm posição de destaque. Os fungos adaptam-se a uma grande variedade de substratos em função de suas características de reprodução e crescimento. São considerados decompositores naturais de material vegetal por sua capacidade de secretar uma grande variedade de enzimas, as quais têm sido produzidas e aplicadas industrialmente (GOMES et al, 1998).

Os microrganismos que apresentam temperatura ótima de crescimento em torno de 45°C são classificados como termofílicos. Já os hipertermofílicos crescem em temperatura ótima em torno de 80°C (MADIGAN et al., 2010). Dentre os eucariotos, poucas espécies possuem capacidade de crescimento entre 45° e 50°C. Essa termolabilidade se deve mais aos seus sistemas de membrana do que à termoestabilidade das enzimas ou de outros compostos químicos celulares. Muitos organismos, em função do aumento de temperatura, variam a composição de ácidos graxos de suas membranas fosfolipídicas, assim sua fluidez de membrana é mantida constante para o funcionamento ótimo de transportes nela localizados e de enzimas. Entre as 50.000 espécies de fungos descritas, somente em torno de 30 crescem em temperaturas entre 40°C e 45°C, embora exista algumas com capacidade de crescer entre 60° a 62°C (MORETTI, 2010; MAHESHWARI et al, 2000).

Há um notável interesse no estudo de microrganismos termofílicos que produzam celulasas, pois possuem capacidade de produzir enzimas com potencial estabilidade à temperatura. Além disso, as enzimas termoestáveis geralmente se apresentam mais resistentes à proteólise e à desnaturação, além de serem estáveis em amplas faixas de pH (GOMES et al., 2009; KUMAR; NUSSINOV, 2001).

2.2. Microbiologia industrial

O uso de microrganismos em processos remonta aos primórdios da civilização humana, como por exemplo para a fermentação alcoólica na produção de vinho e cerveja. Desde então os estudos a respeito dos microrganismos foram intensificados, permitindo a obtenção de uma enorme variedade de compostos, alguns deles de aplicação terapêutica como a descoberta dos antibióticos por Alexander Fleming em 1928. Chaim Weizmann descobriu o processo de fermentação de substratos ricos em carboidratos e de baixo custo, com a possibilidade de obtenção de substâncias de elevado valor agregado (DOLEZALKOVA et al., 2016), processo este que atualmente é utilizado para obtenção de diversas substâncias químicas.

Atualmente o uso de microrganismos é rotineiro em processos industriais nos mais variáveis campos, na produção de combustíveis (etanol), bebidas alcoólicas (vinhos e cervejas), nas indústrias farmacêuticas (antibióticos, enzimas) e alimentares (aditivos como aminoácidos), em insumos químicos (ácidos e solventes), podendo nestes processos serem empregadas as células microbianas ou produtos do seu metabolismo (ZANONI, 2017).

2.3. Reino Fungi

O reino Fungi pertence ao domínio eucarioto e se assemelha por um lado aos animais pelo seu metabolismo heterotrófico, estrutura e organização de suas células, e por outro às plantas devido ao seu crescimento imobilizado no substrato, além de possuírem paredes celulares compostas por polissacarídeos, diferenciando-se pela presença de quitina na maioria das espécies fúngicas (MADIGAN et al., 2010).

Os fungos se destacam como produtores de enzimas, sendo mais vantajosos em relação às bactérias, pois podem secretar as enzimas que degradam o substrato sobre o qual crescem para o meio extracelular (ORLANDELLI et al., 2012), o que facilita o seu processo de extração, uma vez que não é necessária a lise celular como no caso das bactérias. Na maioria dos casos, essas enzimas são glicosiladas, o que é considerado em geral como um fator que aumenta a estabilidade, embora exista exceções (SUTTHIRAK; DHARMSTHITI; LERTSIRI, 2005; WANG et al., 1996). Outro

fator vantajoso da utilização de fungos é a sua imensa biodiversidade, que constitui um nicho para a investigação de novas enzimas.

Os fungos filamentosos apresentam uma importante característica morfológica na produção e excreção de enzimas extracelulares, pois o crescimento micelial permite maior superfície de contato com o substrato a ser degradado e consequentemente maior perímetro colonizado pelo fungo, que ao longo do micélio pode apresentar hifas secretoras (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Sendo assim, temos maior capacidade de degradação do substrato e maior excreção de enzimas extracelulares, contribuindo para o crescimento fúngico.

2.4. *Myceliophthora thermophila*

A espécie utilizada neste projeto é um fungo termofílico filamentosos, conhecido também como *Thermostelomyces thermophilus*, *Thermostelomyces thermophila*, *Sporotrichum thermophile*, *Sporotrichum thermophilum* ou *Chrysosporium thermophilum*. A classificação desta espécie segue a ordem: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Sordariales, Chaetomiaceae, *Myceliophthora* (MYCOBANK, 2017).

Em trabalho anterior, Moretti et al. (2012) verificou que o fungo *Myceliophthora thermophila* se destacou entre outros, mostrando ser um bom produtor de enzimas celulolíticas obtidas por cultivo em estado sólido, onde foram utilizados resíduos agroindustriais, como bagaço de cana e farelo de trigo.

2.5. Resíduos lignocelulósicos

O aumento da produção industrial levou a uma grande quantidade de resíduos produzidos que necessitam de tratamento antes de serem descartados no meio ambiente ou podem, eventualmente, ser reciclados. Com a crescente preocupação em diminuir o impacto ambiental, estes resíduos começaram a ser estudados e reaproveitados como matéria-prima para novos produtos, além de sua utilização como fonte de energia. Dentre esses resíduos, encontra-se a biomassa lignocelulósica, que é considerada o material mais abundante do planeta (RABELO, 2010; SHAHEEN et al., 2013). Ela é constituída de celulose (32-50%), lignina (23-32%) e hemicelulose

(19-25%), além de uma parte pequena de ácidos orgânicos, sais e minerais (PANDEY et al., 2000). Como um exemplo, podemos destacar o bagaço de cana-de-açúcar remanescente da produção de sacarose e etanol de primeira geração. A abundância de celulose faz com que esse material seja alvo de interesse das indústrias como matéria-prima na produção de produtos como o etanol, permitindo o aumento da produção sem a ocupação de maior área de cultivo.

2.5.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um exemplo de material lignocelulósico, obtido após a moagem da cana em usinas de açúcar e álcool. É constituído por vários fragmentos com dimensões variadas, entre 1 a 25 mm, sendo que esse tamanho depende dos processos de moagem a que a cana foi submetida e da variedade desta (MARABEZI, 2009).

Com relação às características físicas, o bagaço possui em torno de 45% de estruturas fibrilares e 5% de extrativos e componentes inorgânicos. Em nosso país, o bagaço é em parte queimado em caldeiras de baixa eficiência na produção de energia elétrica e térmica para serem utilizadas na própria usina, e a queima também é tida como solução para os problemas de descarte, restando ainda assim uma quantia de 10% de todo o bagaço gerado (AFONSO, 2012; MARTIN et al., 2002).

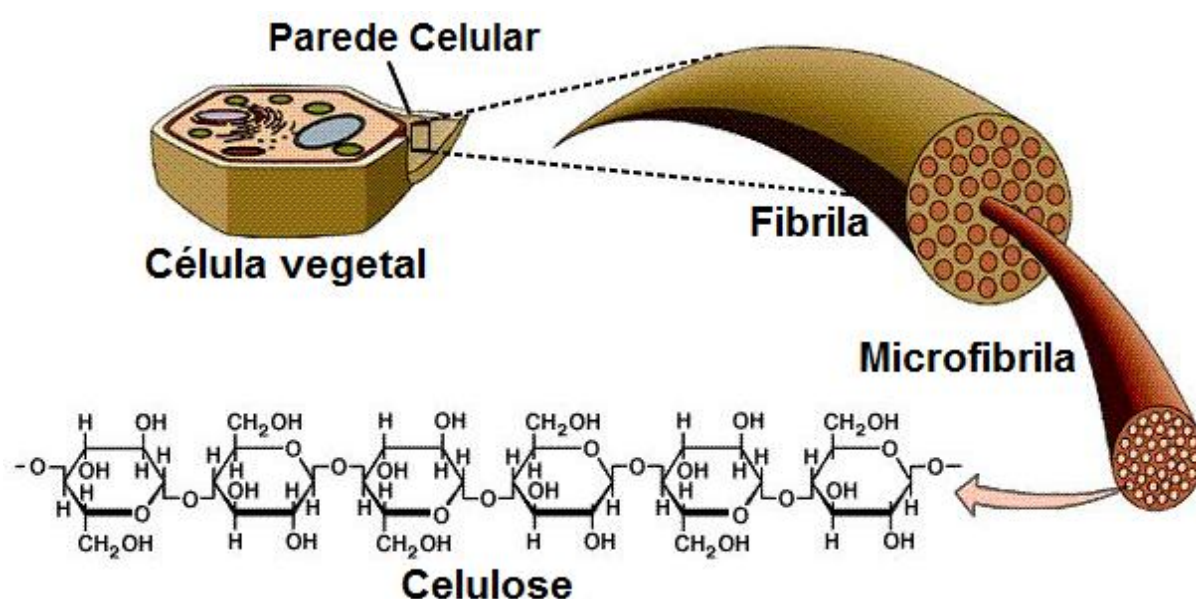
Alguns fatores tendem a contribuir para um aumento dos excedentes de bagaço, que então estariam disponíveis para outros usos como na produção de etanol de segunda geração. Dentre estes fatores podemos citar a expansão do cultivo de cana-de-açúcar, o aumento da eficiência de cogeração de energia nas usinas, a redução do consumo interno de energia e a recuperação da palha para uso energético (AFONSO, 2012; MACEDO, 2005).

2.5.1.1. Celulose

A celulose é o polímero mais abundante em nosso planeta. É composta por milhares de moléculas de glicose unidas por ligações beta (1,4)-glicosídicas (Figura 1). As cadeias de celulose se organizam de forma fibrilar, com ligações de hidrogênio

inter e intramoleculares. Possuem regiões cristalinas e amorfas que ocorrem em intervalos irregulares, sendo que as regiões amorfas estão relacionadas à hidrólise da celulose por via ácida ou enzimática e nelas as ligações de hidrogênio ocorrem em menor quantidade (CHAGAS, 2007). As regiões cristalinas constituem de 50 a 90% da celulose e são organizadas em forma de microfibrilas, menos acessíveis a agentes enzimáticos e químicos, dificultando a hidrólise (FAN et al., 1980).

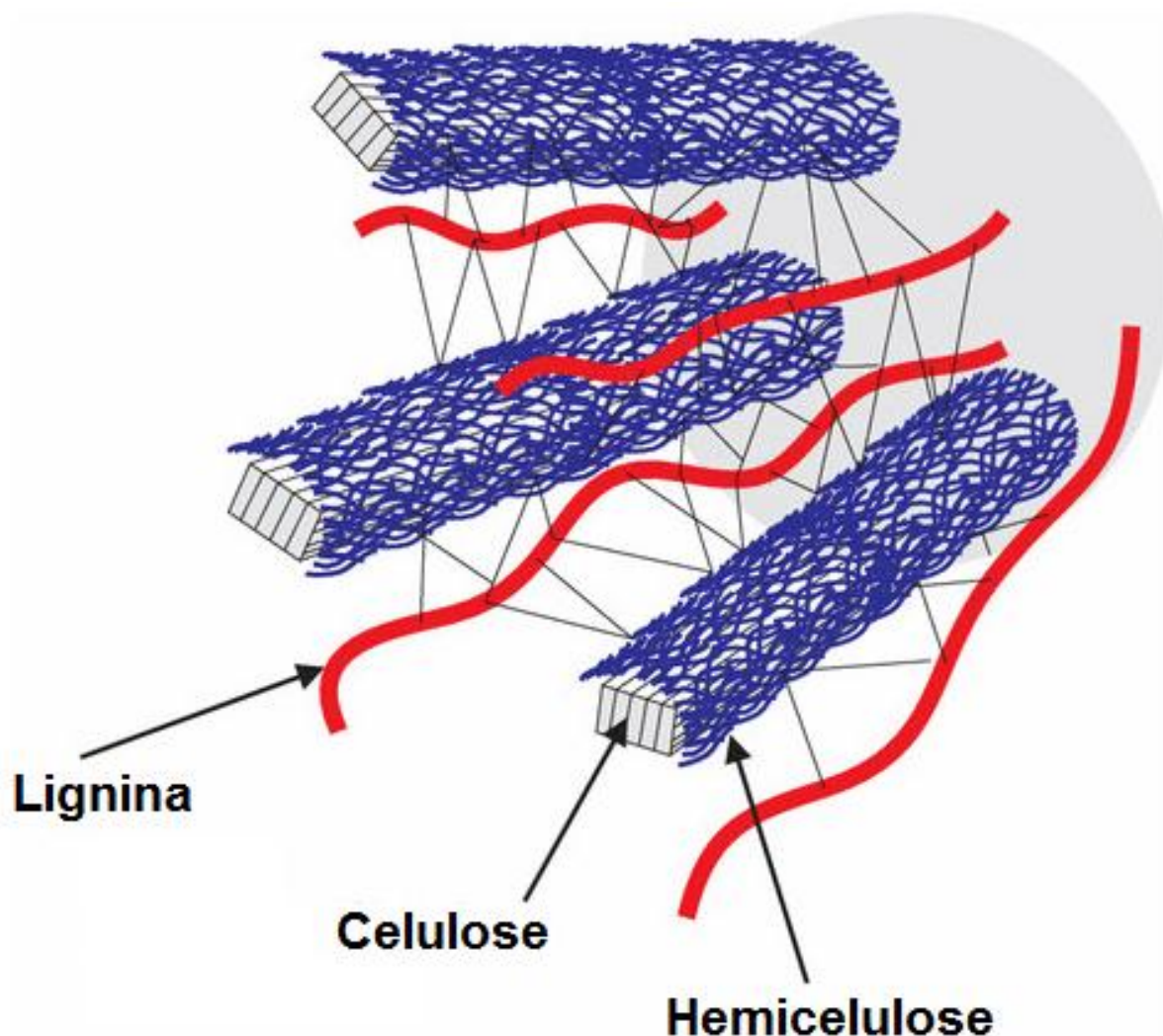
Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal



Fonte: ÇANKAYA, 2015.

No complexo lignocelulósico da parede celular vegetal, também são encontradas hemicelulose e lignina. A primeira encontra-se intercalada às microfibrilas de celulose impedindo-as de se tocarem e proporcionando elasticidade. Já a lignina é fortemente ligada à celulose e à hemicelulose, o que proporciona resistência mecânica, suporte e ação como uma barreira física à água e ao ataque de microrganismos (Figura 2).

Figura 2. Complexo lignocelulósico da parede celular vegetal.



Fonte: GUTIÉRREZ, 2016.

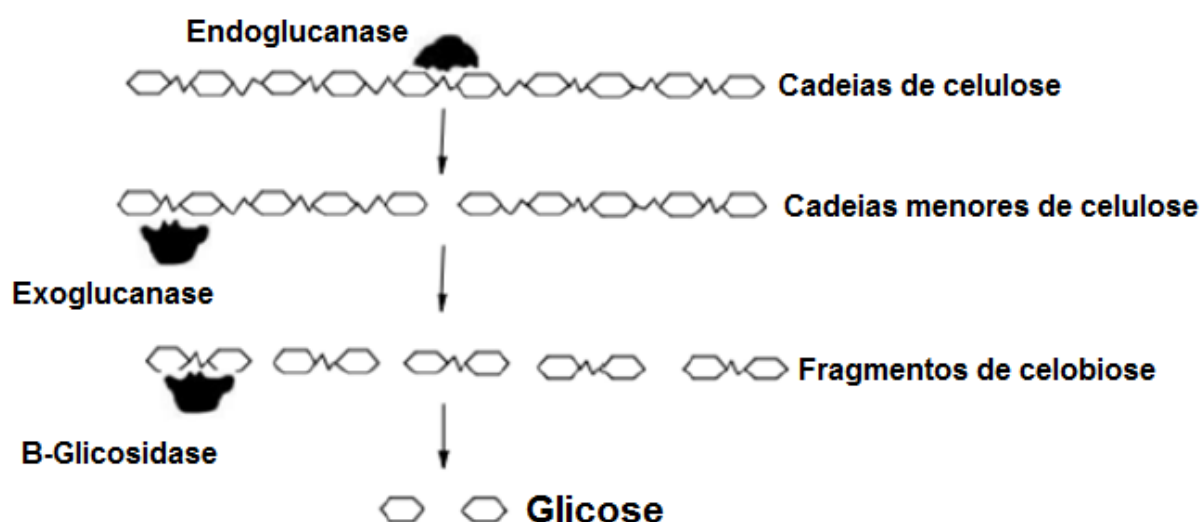
2.6. Celulases

Atualmente as celulases são empregadas principalmente na indústria de papel e celulose e têxtil, além de serem utilizadas na produção de soluções de limpeza (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002), mas têm ganhado destaque pelo seu potencial hidrolítico em materiais lignocelulósicos na produção de etanol, já que são enzimas capazes de hidrolisar a celulose (HIMMEL; RUTH; WYMAN, 1999).

As endoglucanases hidrolisam ligações internas (β -1,4), reduzindo o grau de polimerização deste substrato e produzindo terminais redutores e não-redutores,

preferencialmente nas regiões amorfas que são mais suscetíveis. Sua atuação expõe as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentar o número de oligossacarídeos com terminações suscetíveis ao ataque das exoglucanases (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). As exoglucanases removem monômeros ou dímeros das porções terminais das cadeias. (RIDIEL, 1997). Por fim, as β -glicosidases hidrolisam celobioses e, em alguns casos, outros oligossacarídeos curtos liberando glicose (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). A sucessão destas ações é ilustrada na figura 3:

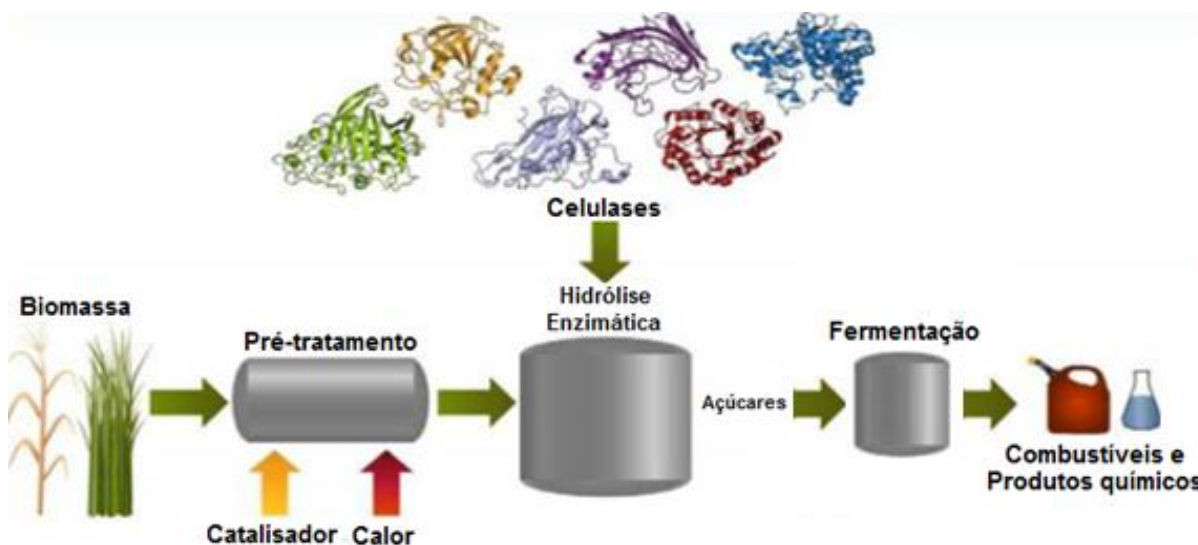
Figura 3. Passos da hidrólise enzimática da molécula de celulose.



Fonte: PALMA-FERNANDEZ, 2002.

As celulasas podem ser utilizadas na conversão da porção de celulose da biomassa não alimentar, tal como resíduos de culturas agrícolas, em açúcares fermentáveis para posterior conversão em combustíveis renováveis e produtos químicos, dentro do conceito de biorrefinarias, conforme a figura 4 (PAYNE et al., 2015).

Figura 4. Processo de conversão bioquímica convencional para produção de combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de PAYNE et al., 2015.

2.6.1. Endoglucanases

As endoglucanases clivam ligações glicosídicas celulósicas internas nas microfibrilas da celulose, de modo aleatório. Isso resulta em uma rápida diminuição no comprimento da cadeia. Estas enzimas parecem apresentar pouca capacidade de degradação de celulose cristalina, pelas fortes interações de hidrogênio presentes nessas fibras, o que torna o contato dessas enzimas inacessível (FELIX; LJUNGDMAL, 1993; RAMIA, 2015).

Essa classe de enzimas se encontra distribuída em 13 famílias, pertencentes a organismos eucarióticos, bactérias, fungos e arquea. Geralmente, seu sítio ativo se parece à um sulco aberto ou uma fenda, que acomoda a cadeia linear da celulose aleatoriamente (YENNAMALLI et al., 2013; SEGATO et al., 2014).

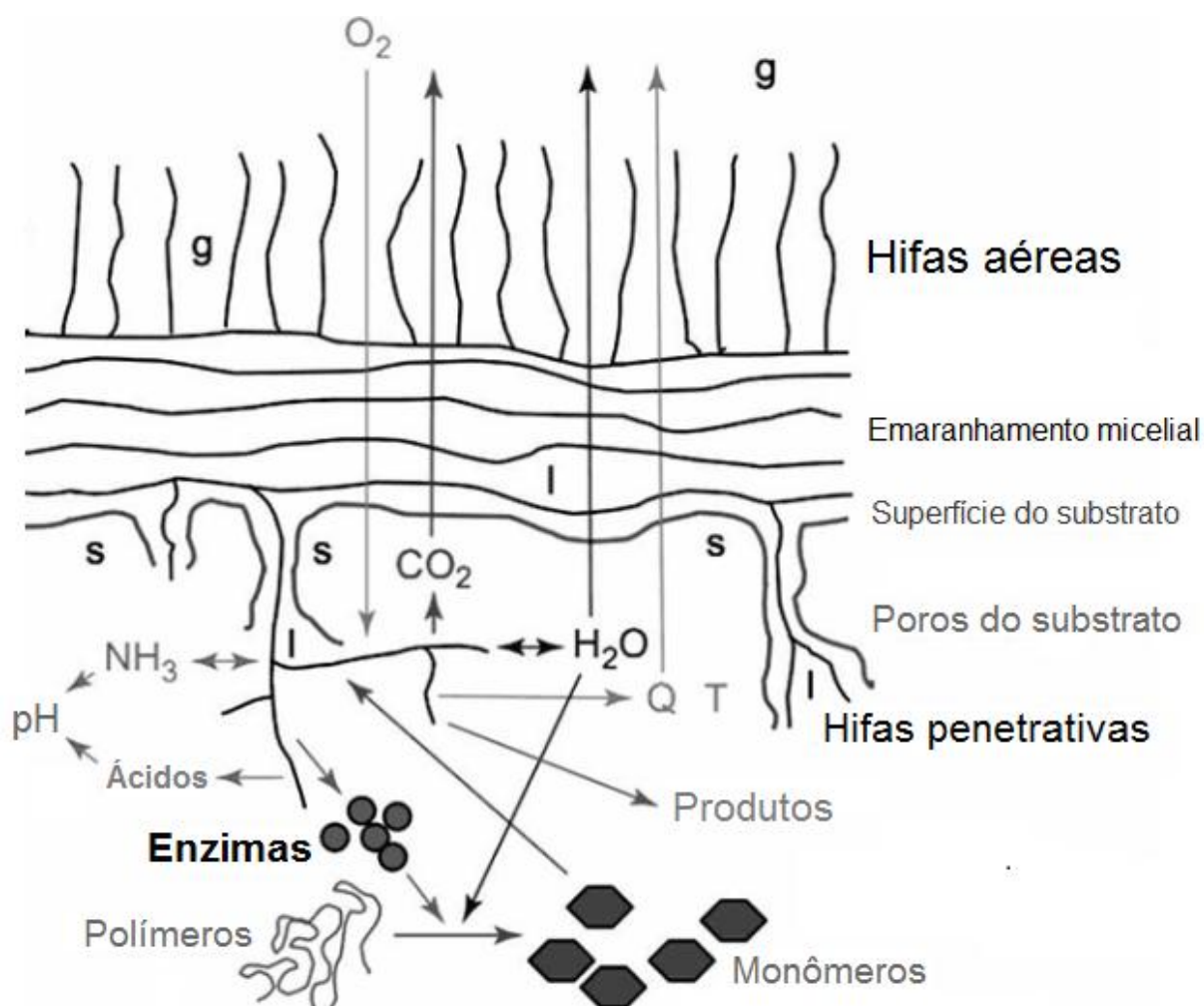
Para que a hidrólise se realize, as endoglucanases mantêm as unidades de glicose dos subsítios -1 e +1 na conformação de cadeia enquanto expandem ou dobram a ligação glicosídica, trazendo-a para uma posição axial. Ao mesmo tempo, distorcem a unidade glicosil -1 para uma conformação de barco e substituem o açúcar +1 (DAVIES et al., 1995; DAVIES et al., 2003).

2.7. Produção de enzimas

Nas indústrias, o cultivo submerso (CSm) tem sido utilizado para a produção de enzimas, porém o alto custo e a baixa eficiência têm dificultado sua aplicação na conversão de biomassa (SINGHANIA et al., 2010). Com isso, o cultivo em estado sólido (CES) vem ganhando espaço com o objetivo de diminuir o custo da enzima pelo aumento de sua produção, além do fato de que neste tipo de cultivo pode-se utilizar resíduos sólidos como substrato (CAMASSOLA; DILLON, 2010; VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

O CES possui muitas vantagens, pois é capaz de resultar em produtos mais concentrados por não requerer grande quantidade de água, além de proporcionar condições que se assemelham ao habitat natural dos fungos, melhorando seu crescimento micelial. O que torna o CES desvantajoso para a escala industrial é o fato de que deve ser assegurada uma grande superfície de contato do fungo com o substrato, pois seria necessária uma vasta área para proporcionar as condições ideais, além do difícil controle de variáveis como umidade, temperatura e oxigenação em grande escala (HÖLKER; LENZ, 2005).

Figura 5. Processos que ocorrem durante o cultivo em estado sólido, em micro-escala.



Fonte: HÖLKER; LENZ, 2005.

A produção e aplicação de celulases vem sendo melhorada ao longo do tempo, seja pela clonagem e expressão de genes para aumento da expressão enzimática nos microrganismos, pelo aumento dos estudos sobre enzimas purificadas e caracterizadas ou pelo entendimento dos mecanismos de degradação da celulose (CASTRO, 2010).

2.8. Purificação de enzimas

Nos extratos enzimáticos obtidos nos cultivos fúngicos, existem várias enzimas extracelulares que podem ser de interesse biotecnológico. Com essa heterogeneidade, há processos que objetivam extrair apenas uma determinada enzima de todo o complexo, a fim de conhecer suas propriedades específicas. Para isso é necessário submeter esse extrato enzimático às diferentes alternativas de purificação a fim de se obter enzimas puras, o que geralmente é realizado para fins acadêmicos. A estratégia ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, mas também das propriedades dos contaminantes presentes no extrato bruto (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Porém a purificação encarece o processo de aplicação dessas enzimas, inviabilizando muitas vezes o uso delas na forma pura do ponto de vista industrial. Com isso, muitos estudos objetivam caracterizar o extrato enzimático obtido nos cultivos de forma bruta, assim seria possível utilizar o complexo enzimático nos processos industriais, como no caso do presente trabalho.

3. JUSTIFICATIVA

A grande quantidade de resíduos industriais e a busca constante por fontes de energia renováveis, impulsionam os estudos que buscam aplicar enzimas nesses resíduos lignocelulósicos e nos procedimentos industriais como formas de obtenção de bioetanol e outros produtos de valor agregado. O grupo de pesquisa tem experiência nos últimos anos no tema de hidrolases de origem fúngica (BONFÁ et al., 2018; ZANONI, 2017; DA SILVA et al., 2016; TRINDADE et al., 2016; FERRAREZI et al., 2013; ZANPHORLIN et al., 2011; ZANPHORLIN et al., 2010), nos motivando a analisar as endoglucanases de *M. thermophila* M.7.7.

Devido à grande quantidade de açúcares potencialmente fermentáveis presentes nas paredes vegetais, principalmente na forma de fibras de celulose, faz-se necessário a pesquisa sobre enzimas capazes de degradar a celulose, para aperfeiçoamento de processos biotecnológicos, sendo a purificação (quando possível) um processo essencial para avaliar as características de uma enzima. Após a obtenção da enzima isolada do complexo enzimático, é possível estudar de maneira mais aprofundada sua estrutura e função. A espécie escolhida, *Myceliophthora thermophila* M.7.7, apresentou boa capacidade de produção de endoglucanases, mostrando potencial do ponto de vista biotecnológico.

4. OBJETIVOS

Objetivos gerais: O presente projeto teve por objetivo analisar as propriedades das endoglucanases produzidas em cultivo em estado sólido pelo isolado M.7.7 do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* no extrato bruto e da(s) enzima(s) parcialmente purificada(s).

Os objetivos específicos iniciais foram: Determinar a curva de produção enzimática por cultivo em estado sólido; Identificar as possíveis isoformas de endoglucanases produzidas pelo fungo; Caracterizar funcional e estruturalmente as enzimas incluindo a análise dos efeitos do pH e a temperatura sobre a atividade e estabilidade, efeito de íons e diversas substâncias na atividade e a estabilidade, parâmetros cinéticos aparentes, determinação da massa molecular e efeito de compostos fenólicos; Estabelecer um protocolo de purificação da(s) enzima(s) mediante a combinação de diversos métodos, explorando a solubilidade, carga, hidrofobicidade, massa molecular, por exemplo: precipitação salina ou por solventes, cromatografias de troca iônica, filtração em gel e hidrofóbica, etc.; Se a purificação for bem sucedida analisar a termodinâmica da desnaturação irreversível, e dependendo da viabilidade e do tempo disponível, efetuar experimentos de dicroísmo circular, determinação da sequência primária e cristalização, todos em colaboração com outros grupos de pesquisa.

Parte dos objetivos traçados inicialmente não foi atingida em virtude das dificuldades no que se refere à purificação e rendimento.

5. REFERÊNCIAS

AFONSO, L. C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BONFÁ, E. C.; MORETTI, M. M. S.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** v. 13, p. 311-318, 2018.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1889-1900, 2010.

ÇANKAYA, N. Cellulose Grafting by Atom Transfer Radical Polymerization Method, Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends, Dr. Matheus Poletto (Ed.), **InTech**, DOI: 10.5772/61707, 2015. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/cellulose-fundamental-aspects-and-current-trends/cellulose-grafting-by-atom-transfer-radical-polymerization-method>. Acessado em 8/3/2018.

CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.

CHAGAS, C. F. D. Técnica de processo para a viabilização econômica do processo de hidrólise. In: **I SEMINÁRIO DE ETANOL CELULÓSICO**, 2007, São Paulo.

DA SILVA, V. C. T.; COTO, A. L. S.; SOUZA, R. C.; NEVES, M. B. S.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Effect of pH, Temperature, and Chemicals on the Endoglucanases and β -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

DAVIES, G. et al. Structures of oligosaccharide-bound forms of the endoglucanase V from *Humicola insolens* at 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, v. 34, n. 49, p. 16210 – 16220, 1995.

DAVIES, G. J. et al. Mapping the conformational itinerary of beta-glycosidases by X-ray crystallography. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 523-527, June 2003.

DOLEZALKOVA, M.; SEMBER, A.; MAREC, F.; RAB, P.; PLOTNER, J.; CHOLEVA, L. Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclinal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? **BMC Genet**, v. 17, n. 1, p. 100, 2016.

EPA. **Global Greenhouse Gas Emissions Data**. 2017. Disponível em: <https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data>, Acesso em 8/3/2018.

FAN, L. T.; LEE, H. Y.; BEARDMORE, D. H. Major Chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering** v. 14, p. 101-117, 1980.

FELIX, C. R.; LJUNGDMAL, L. G. The cellulosome: the exocellular organelle of clostridium. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, p. 791-819, 1993.

FERRAREZI, A. L.; PIVETTA, D. H.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; DA SILVA, R.; GUIBAN, J. M.; GOMES, E.; PESSELA, B. C. Partial purification, immobilization and preliminary biochemical characterization of lipases from *Rhizomucor pusillus*. **Advances in Enzyme Research**, v.1, p. 79-90, 2013.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2–12, 2009.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000/01/01 2000.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n. 1, p. 31-39, 2009.

GOMES, E.; SILVA, R.; SERZEDELLO, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 187-192, 1998.

GUTIÉRREZ, T., ALVAREZ, V. Cellulosic materials as natural fillers in starch-containing matrix-based films: a review. **Polymer Bulletin**. 74. 2401–2430, 2016.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p. 358-364, 1999.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation- are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301- 306, 2005.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. In: (Ed.). **Physiology of Biodegradative Microorganisms**: Springer, p.163-176, 1991.

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

KUMAR, S.; NUSSINOV, R. How do thermophilic proteins deal with heat? A review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1216-1233, 2001.

MACEDO, I. **A energia da cana-de-açúcar** (Sugarcane's energy: twelve studies on Brazilian sugar cane agrobusiness and its sustentability). UNICA (Sao Paulo Sugarcane Agroindustry Union), São Paulo, Brasil, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre, Brasil.: Editora Artmed, 2010.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-**

açúcar. 142p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARTIN, C.; GALBE, M.; JÖNSSON, L. J. Comparison of the fermentability hydrolysates of sugar cane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnation agents. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 98, p. 699-716, 2002.

MENDONÇA, F. Aquecimento global e saúde: uma perspectiva geográfica–notas introdutórias. **Terra Livre**, v. 1, n. 20, p. 205-221, 2015.

MORETTI, M. M. S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2010.

ORLANDELLI, R. C. SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. P. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidases do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus***. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresouce Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PAYNE, C. M. KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E., SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, Washington, v.119, n.30, p. 9601-9613, 2015.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos.**, Ed. Manole, Barueri, cap. 1, p. 1-5, 2005.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.**

2010. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia Química

RAMIA, M. P. **Estudos funcionais e estruturais de uma endoglucanase de *Phanerochaete chrysosporium* da família 45 das hidrolases de glicosídeos.** 2015. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2015.

RIDIEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (Cel Z) and Avicelase II (Cel Y) in the degradation cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, p. 239-243, 1997.

ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. Catálise Enzimática: Transesterificação do Óleo de Soja e Esterificação do Ácido Oleico via Lipases. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, 2015.

SEGATO, F. et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by Aspergilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588-613, Dec. 2014.

SHAHEEN, M.; CHOI, M.; ANG, W.; ZHAO, Y.; XING, J.; YANG, R. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 57, p. 462-468, 9// 2013.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SUTTHIRAK, P.; DHARMSTHITI, S.; LERTSIRI, S. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2821-2826, 2005.

TRINDADE, L. V.; DESAGIACOMO, C.; POLIZELI, M. L. T. M.; DAMASIO, A. R. L.; LIMA, A. M. F.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Biochemical Characterization, Thermal Stability, and Partial Sequence of a Novel Exo-Polygalacturonase from the Thermophilic Fungus *Rhizomucor pusillus* A13.36

Obtained by Submerged Cultivation. **Biomed Research International**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMERO-GOMEZ, S. J.; DIAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003.

WANG, C.; EUFEMI, M.; TURANO, C; GIARTOSIO, A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7299-7307, 1996.

YENNAMALLI, R. M. et al. Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 136, Sept. 2013.

ZANONI, J. A. **Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em estado sólido**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, 2017.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L. JULIANO, M. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137–2143, 2011.

ZANPHORLIN, L. M.; FACCHINI, F. D. A.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Production, Partial Characterization, and Immobilization in Alginate Beads of an Alkaline Protease from a New Thermophilic Fungus *Myceliophthora* sp. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 331-336, 2010.

CAPÍTULO II

Caracterização bioquímica das endoglucanases produzidas por *Myceliophthora thermophila* M.7.7 em cultivo em estado sólido

Vanessa Salto Massarente, Eleni Gomes, Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez *

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Campus São José do Rio Preto, SP, Brasil.

(*) Autor para correspondência: Gustavo O. Bonilla Rodriguez, DQCA, IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto SP 15054-000 Brasil. E-mail gustavo.b.rodriguez@unesp.br.

Resumo

As celulasas são enzimas empregadas principalmente na indústria de papel e celulose e têxtil, e têm ganhado destaque pelo seu potencial hidrolítico em materiais lignocelulósicos na produção de etanol, já que são capazes de hidrolisar a celulose. O objetivo do projeto foi efetuar a caracterização e isolamento das endoglucanases produzidas pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7 em cultivo em estado sólido. Foram realizados ensaios para avaliar os efeitos do pH, da temperatura, de diversas substâncias químicas, cátions e compostos fenólicos na atividade enzimática. A estimativa da massa molecular foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e como resultado foi possível observar sete endoglucanases detectadas por zimografia, que possuem massa molecular estimada entre 26 e 82 kDa. O valor ótimo para o pH do extrato enzimático bruto foi 5,5 e 70°C para a temperatura ótima em incubação de 4 minutos. Em relação à estabilidade do extrato bruto, os maiores valores ocorreram entre as faixas de pH de 6 a 6,5, e 30 e 40°C para temperatura até 120 minutos. Entre os reagentes testados, Triton, DTT e Isopropanol aumentaram a atividade enzimática sobre o extrato bruto em cerca de 10%. Os cátions NaCl, SrCl₂, BaCl₂ e ZnCl₂ aumentaram a atividade das endoglucanases. Em relação aos compostos fenólicos, todos induziram em diversos graus o decréscimo da atividade das endoglucanases do extrato bruto. Das sete endoglucanases, três foram isoladas pela extração direta do gel após eletroforese em poliacrilamida. Duas possuem atividade considerável entre os pHs 4,0 e 7,0, e uma em pH 10,5. As três enzimas apresentaram redução em sua atividade nos pHs 8,5 e 9,0, porém apresentaram boa atividade nos pHs 10,0 e 10,5 e tiveram sua temperatura ótima em 70°C. Avaliaram-se os parâmetros termodinâmicos das endoglucanases do extrato enzimático bruto, permitindo determinar o tempo de meia vida em 165 minutos a 50°C, e elevada resistência estrutural à desnaturação térmica, analisados pela variação da entropia, energia livre de Gibbs e entalpia.

Palavras-chave: Enzimas. Endoglucanases. Fungos termofílicos. Bioenergia.

Abreviações utilizadas: DNS: ácido 3,5-dinitrossalicílico; DTT: Ditioneitol; EDTA: ácido etilendiaminotetracético; EG: endoglicanase; PEG: polietilenglicol; PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila; SDS: Dodecil sulfato de sódio.

1. INTRODUÇÃO

Em resposta ao fenômeno denominado “aquecimento global”, causado pela contínua e crescente liberação de carbono na atmosfera, tem aumentado o interesse pelo uso de fontes de energia alternativas “limpas e renováveis” que não usem combustíveis fósseis, conceito amplo no qual se enquadram os biocombustíveis e dentro destes o bioetanol ou etanol de segunda geração. Sua obtenção é possível através da fermentação de açúcares liberados pela ação de enzimas a partir de resíduos vegetais ou lignocelulósicos, os quais contêm fibrilas de celulose envoltas por uma espécie de camada protetora de hemicelulose e lignina, ligadas covalentemente de forma a garantir rigidez à parede celular e maior resistência à degradação microbiana (MENDONÇA, 2015; ROSSET; PORTO, 2015; JEFFRIES, 1991).

A celulose é o principal e mais abundante constituinte da parede vegetal, considerada um homopolissacarídeo por ser formada por repetidas unidades de D-glicose com ligações glicosídicas beta-1,4 entre si. O segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular vegetal é a hemicelulose, sendo composta por diferentes monômeros, incluindo pentoses (D-xilose, L-arabinopiranosose, L-arabinofuranose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), ácidos hexurônicos (D-glicurônico, D-4-O-Metilglicurônico, D-galacturônico) e desoxi-hexoses (L-ramnose e L-fucose) (RABELO, 2010) ligados entre si, resultando em um heteropolissacarídeo com ramificações.

A utilização de enzimas degradadoras do complexo lignocelulósico tem sido adotada para a sacarificação da biomassa vegetal ao promoverem a liberação de monômeros de carboidratos para serem assimilados por leveduras e fermentados para a produção do etanol de segunda geração. Isso motiva realizar a pesquisa por enzimas eficientes e resistentes produzidas por microrganismos e capazes de agir sobre resíduos lignocelulósicos.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais: O presente projeto teve por objetivo analisar as propriedades das endoglucanases produzidas em cultivo em estado sólido pelo isolado M.7.7 do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* no extrato bruto, isolá-las e caracterizá-las.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

A espécie foi obtida através do isolamento realizado pela Dra. Márcia Maria de Souza Moretti em trabalho que objetivou isolar espécies termofílicas e termotolerantes produtoras de celulases e xilanases em cultivo sólido (MORETTI, 2012). Em seu trabalho, o isolado M.7.7 de *Myceliophthora thermophila* produziu elevada quantidade de celulase por grama de bagaço utilizado no cultivo. Em virtude disto, foi escolhido este microrganismo para dar prosseguimento aos estudos destas celulases produzidas, com ênfase nas endoglucanases.

3.2. Cultivo do fungo

O meio de cultivo para o pré-inóculo foi constituído por 39 g L⁻¹ de PDA (*Potato dextrose agar*) dissolvidos em água destilada, e o pH foi ajustado para 5,0. Este meio de cultura foi preparado em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio cada. O fungo foi inoculado com o auxílio de alça de repique, e cultivado em uma estufa BOD a 45 °C por 72 horas.

O processo de cultivo ocorreu em Erlenmeyers de 250 mL contendo 4 g de bagaço de cana e 1 g de farelo de trigo. Para inóculo do microrganismo foi realizada raspagem do pré-inóculo com auxílio de alça de repique e adição de meio líquido nutriente. Este meio nutriente teve como composição 1g L⁻¹ de sulfato de amônio, 2 g L⁻¹ de cloreto de potássio, 3 g L⁻¹ de fertilizante MAP (mono amônio fosfato), 0,1 g L⁻¹ de cloreto de cálcio, 0,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio e 0,1 g L⁻¹ de tween 80. Foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 30 minutos, assim como os recipientes

onde ocorreram a fermentação, e inoculado com um volume de suspensão de esporos equivalente a 10^7 esporos mL^{-1} . A umidade inicial do substrato com a adição do meio líquido foi ajustada para 70%. O cultivo ocorreu em uma incubadora por 144 horas a $45\text{ }^\circ\text{C}$, sendo retiradas amostras a cada 24h para a determinação da curva de produção da endoglucanase, a qual foi quantificada pelo ensaio enzimático descrito no item 3.4. Com isso, optou-se pelo uso do tempo de cultivo onde obteve-se a máxima produção da enzima de interesse.

3.3. Extração enzimática e clarificação

Após o término do cultivo, foram adicionados 100 mL de água ultrapura (ELGA Labwater) em cada Erlenmeyer e manteve-se em agitação orbital a 150 rpm por 40 minutos para extração das enzimas secretadas pelo microrganismo. A amostra foi então filtrada em gaze e em seguida a vácuo, utilizando filtros de membrana de nylon com poros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

A clarificação se deu por centrifugação a 10.000 xg a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. O sobrenadante foi removido, homogeneizado e armazenado em alíquotas em congelador a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, sendo denominado extrato enzimático bruto.

3.4. Caracterização enzimática

Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata, sendo calculados a média da atividade enzimática e seu desvio padrão com auxílio do programa Excel 2007 (Microsoft Corporation). A atividade enzimática foi expressa através da quantificação em micromoles de açúcares redutores liberados por minuto na reação de incubação do extrato enzimático com o substrato tamponado, utilizando o DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959). Como referência, foram confeccionadas várias retas de calibração, de acordo com o ensaio a ser realizado.

A equação 1, utilizada para a quantificação foi: $U\text{ mL}^{-1} = [(dA/dt)/\varepsilon] \times V_f/V_a \times 1000$ (JOHN, 2002), onde dA é a leitura de absorvância, dt o tempo de incubação em minutos, ε é o coeficiente de extinção molar (M^{-1}), V_f o volume final do ensaio e V_a o volume da solução enzimática, ambos em mililitros.

Em cada tubo de ensaio foi adicionado 225 μL de substrato (tampão acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 5,5 contendo substrato CMC (carboximetilcelulose) a 4% (m/v) e 25 μL da solução enzimática bruta. Os tubos foram incubados em banho a 50 °C por 10 minutos, e, após esse tempo, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 250 μL de DNS. Os tubos foram colocados por 10 minutos em banho fervente e em seguida resfriados em banho de gelo. Após o resfriamento foram adicionados 2 mL de água ultrapura e os tubos foram homogeneizados em vórtex. A leitura da absorbância da amostra foi feita a 540 nm em espectrofotômetro contra um branco composto por nove partes de água ultrapura para uma parte de DNS.

Para garantir a eliminação de qualquer absorção de luz no comprimento de luz utilizado que não fosse advindo dos açúcares redutores liberados pela ação da enzima, foi confeccionado um tubo controle contendo a mesma composição do tubo onde houve a reação enzimática, porém mudando-se a ordem para: primeiramente a amostra enzimática, em seguida o reagente DNS e posteriormente o tampão contendo substrato. Este tubo foi submetido somente ao banho fervente pelo tempo de 10 minutos, e resfriado em banho de gelo. O volume foi completado com a adição de 2 mL de água ultrapura. Seguindo a definição da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio é denominada uma unidade de atividade enzimática (NC-IUB, 1979).

Visando diminuir os volumes utilizados, o ensaio enzimático das endoglucanases isoladas foi realizado em microplacas em termociclador MJ Research PTC200, utilizando-se a mistura de 90 μL de tampão acetato 0,1 mol L^{-1} pH 5,5 contendo substrato e 10 μL de solução enzimática (GARFIN, 2009). As placas foram incubadas a 80 °C por 10 min e após este tempo foram adicionados 100 μL de solução de DNS para paralisar a reação. As amostras então foram aquecidas por 10 minutos a 95°C e em seguida resfriadas em banho de gelo. A absorbância foi medida em 540 nm utilizando-se leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS (Spectra max – PLUS 384®).

Para determinação do tempo de incubação onde se obteria a liberação de produto em função do tempo em uma relação linear, a reação enzimática foi realizada variando-se o tempo de incubação em banho-maria a 50°C a cada minuto, durante 10 minutos.

Para a determinação do pH ótimo foram utilizados os seguintes tampões (0,1 mol L⁻¹) contendo 4% (m/v) de CMC: Citrato (pH 3,0 e 3,5), Acetato (pH 4, 4,5, 5,0 e 5,5), MES (pH 6,0, 6,5 e 7,0), Tris (pH 7,5 e 8,0) e Glicina (pH 8,5, 9,0 e 9,5). Houve ajustes eventuais para correção do efeito de deslocamento do pKa em função da temperatura, em consonância com os valores tabelados, (APPLICHEM, 2008) e a quantidade de unidades de atividade enzimática de endoglucanase foi quantificada conforme descrito anteriormente.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de endoglucanase foi analisado variando-se a temperatura do ensaio enzimático de 30 a 90°C, em intervalos de 10°C. Para este ensaio foi utilizado o tampão com substrato no pH ótimo de reação.

Para determinar a estabilidade da atividade das endoglucanases em diversos pHs, o extrato enzimático bruto foi diluído em tampões 0,1 mol L⁻¹ com pHs diferentes na proporção 1:1 (v/v), sendo para isso utilizados os tampões descritos sem a adição de substrato. Como controle, em uma amostra foi adicionada água ultrapura no lugar de tampão. As misturas foram mantidas por 24 horas na temperatura de 24°C e, após este período, a atividade enzimática foi medida utilizando-se o ensaio enzimático no pH ótimo já determinado anteriormente. A atividade residual relativa foi comparada ao controle.

A estabilidade térmica do extrato enzimático bruto foi avaliada submetendo-se alíquotas em triplicata em temperaturas de 30 a 90 °C pelos seguintes tempos: 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 240 e 360 minutos.

Decorridos estes tempos, a atividade residual foi determinada pelo ensaio já descrito, sendo que nos ensaios enzimáticos foram utilizadas as condições ótimas de pH e temperatura. Como controle, as amostras foram comparadas com uma alíquota do extrato enzimático bruto que não foi submetida à temperatura.

Para análise da melhor condição de armazenamento a garantir estabilidade ao extrato enzimático bruto, foram testadas as seguintes temperaturas: -196, -80, -20, 4 e 25°C. Alíquotas do extrato foram armazenadas por 24 horas com e sem a adição de 50% de seu volume de glicerol. A aferição da atividade enzimática foi feita previamente e posteriormente ao armazenamento. No caso das amostras que tiveram que ser descongeladas, este processo se deu pela imersão das mesmas em água na temperatura aproximada de 25°C. Com os valores de atividade enzimática calculados

através da equação 1, foi possível identificar as melhores condições de armazenamento.

Outro teste consistiu em analisar a atividade enzimática em uma alíquota do extrato enzimático sem glicerol, submetida a sucessivos congelamentos e descongelamentos em congelador comum (-20°C), totalizando 7 ciclos. Após cada um, foi medida a atividade enzimática e comparada à inicial (antes do primeiro congelamento).

Para análise do efeito de íons, o extrato enzimático bruto foi previamente submetido a uma resina de troca iônica mista (*Mixed Bed Resin*), que retém cátions e ânions. Este procedimento foi realizado para garantir a confiabilidade da análise, já que a amostra poderia conter contaminantes e sais que interfeririam no resultado. A amostra tratada foi utilizada para testar o efeito da presença de vários cátions na forma de sais de cloro na atividade enzimática através da adição individual de ZnCl_2 , AlCl_3 , NaCl , FeCl_3 , MnCl_2 , KCl , MgCl_2 , NiCl_2 , BaCl_2 , LiCl , CoCl_2 , CdCl_2 , CrCl_3 , SrCl_2 , CuCl_2 , CaCl_2 , além de tensoativos (Triton, SDS, Tween,), reagentes para cisteínas (DTT) e serinas (PMSF), solventes (etanol, acetona, isopropanol) e polímeros (PEG 3,35 kDa) seguindo os procedimentos já aplicados a outras enzimas (POLIZELLI; FACCHINI; BONILLA-RODRIGUEZ, 2013). A solução enzimática foi submetida à presença da substância química a ser testada na concentração final de 10 mmol L^{-1} , e a partir dessa mistura realizou-se o ensaio enzimático nas condições ótimas de pH e temperatura de reação.

Para verificar o efeito de compostos fenólicos, o extrato enzimático foi submetido a concentrações finais de 10 mmol L^{-1} dos compostos a seguir para verificação da ativação ou inibição de suas endoglucanases: ácido tânico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, ácido vanílico e siringaldeído. A mistura permaneceu por 10 minutos, 24 e 48 horas em temperatura ambiente (cerca de 24°C), para posterior quantificação da atividade enzimática nas condições ótimas de pH e temperatura de reação.

O teste de estabilidade de Selwyn consistiu em vários ensaios enzimáticos com o intuito de verificar a estabilidade da enzima em relação a diluição, baseados na proposta de Selwyn (SELWYN, 1965). A amostra do extrato enzimático bruto foi diluída duas, cinco e dez vezes, variando-se o tempo de reação em 2, 6, 10, 14, 18, 22, 30, 40 e 60 minutos. O gráfico de Selwyn foi confeccionado pelo produto da reação

versus o tempo de incubação, multiplicado pela concentração de enzima. O valor da concentração de produto é determinado pelo produto do tempo e da concentração de enzima. Caso a enzima seja estável em relação à diluição, o conjunto de curvas de progresso da reação devem se sobrepor.

Os parâmetros cinéticos das endoglucanases utilizando substrato CMC foram determinados variando-se a concentração do substrato (0,2 a 40 mM) com tempo de reação de 5 minutos, conforme o método antes descrito. Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir de ajuste não linear de parâmetros utilizando como modelo a equação de Michaelis-Menten no programa QtiPlot versão 0.9.9.12 (© Ion Vasilief 2004-2017).

Para a visualização do perfil de proteínas presentes no extrato enzimático bruto, foi preparado um gel de poliacrilamida contendo SDS para realização de eletroforese desnaturante (RHODES; BOSSIO; LAUE, 2009; SEE; JACKOWSKI, 1990). Para o gel de corrida, foi utilizada a concentração de 10% de acrilamida. Já para o de empilhamento, 5%. O tampão utilizado foi Tris-Glicina 2 mol L⁻¹, no pH 8,3.

No preparo da amostra a ser aplicada nos poços do gel, foi utilizada a proporção de 1:1 (v/v) de solução enzimática e tampão de amostra com azul de bromofenol 0,1%, glicerol 20% e SDS 10%. Também foi colocado como referência em um pocinho 5 µL da mistura dos marcadores de massa molecular *Low range* 6,5 – 66,0 kDa (Sigma-Aldrich). Para a coloração foi adotado o método com nitrato de prata (CHEVALLET; LUCHE; RABILLOUD, 2006).

Com base na migração dos marcadores de massa molecular, foi estimada a massa molecular das endoglucanases pela confecção de um gráfico de Fischer, onde o logaritmo da massa molecular vs. a migração relativa no gel (distância percorrida pela banda em relação à migração do azul de bromofenol, representando este a máxima migração) permitiram estimar os valores de massa molecular das endoglucanases (DENNISON, 2003).

Para realização do zimograma, foi utilizado o protocolo estabelecido por Polizeli e colaboradores (POLIZELI et al., 2012), com adição de algumas modificações de acordo com Liao e colaboradores (LIAO et al., 2012). Após a corrida, o gel de eletroforese permaneceu em agitação leve por 30 minutos imerso em solução 1% (v/v) de Triton X-100 para remoção do SDS e eventual renaturação proteica, sendo posteriormente incubado em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,5 também em agitação

leve. Após 15 minutos trocou-se a solução anterior por tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5 contendo 4% (m/v) do substrato CMC, nesta permanecendo a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho por mais 30 minutos. A coloração foi feita com solução 0,1% (m/v) de vermelho Congo em temperatura ambiente, durante 1 hora em agitação leve e a descoloração foi feita com NaCl 1 mol L^{-1} também em agitação leve até o aparecimento de bandas claras. Para dar o efeito de contraste ao gel e possibilitar melhor visualização das bandas foram acrescentadas gotas de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Devido à presença de diversas isoformas em variadas massas moleculares e às tentativas falhas de separação por métodos de precipitação e cromatografia de filtração em gel (resultados não mostrados), foram realizadas tentativas bem-sucedidas de separação das isoformas presentes no extrato enzimático bruto com a utilização de eletroforese. Com isso, o método que consiste em realizar uma eletroforese em gel de poliacrilamida com o gel de separação na concentração de 10% e o de empilhamento a 5% foi adotado para isolamento das isoformas. Esta estratégia foi descrita em um projeto que a utilizou para isolamento de uma lipase vegetal (POLIZELLI et al., 2008).

O gel de poliacrilamida, após a corrida, foi cortado separando-se uma parte para realizar coloração seguindo a metodologia de zimograma (item 5.18.), que foi utilizada como referência da localização da migração das isoformas no gel. Enquanto esse procedimento era realizado, a parte que foi utilizada na separação permaneceu imersa em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5. Esta parte que não sofreu coloração, foi incubada em solução de 1 % de triton x-100 para remoção do SDS proveniente da preparação do gel e do tampão de corrida utilizado, e em seguida lavada com tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5. Ao final da coloração ambas as partes foram colocadas lado a lado, cortando-se tiras horizontais do gel sem coloração, correspondentes às isoformas identificadas no gel corado.

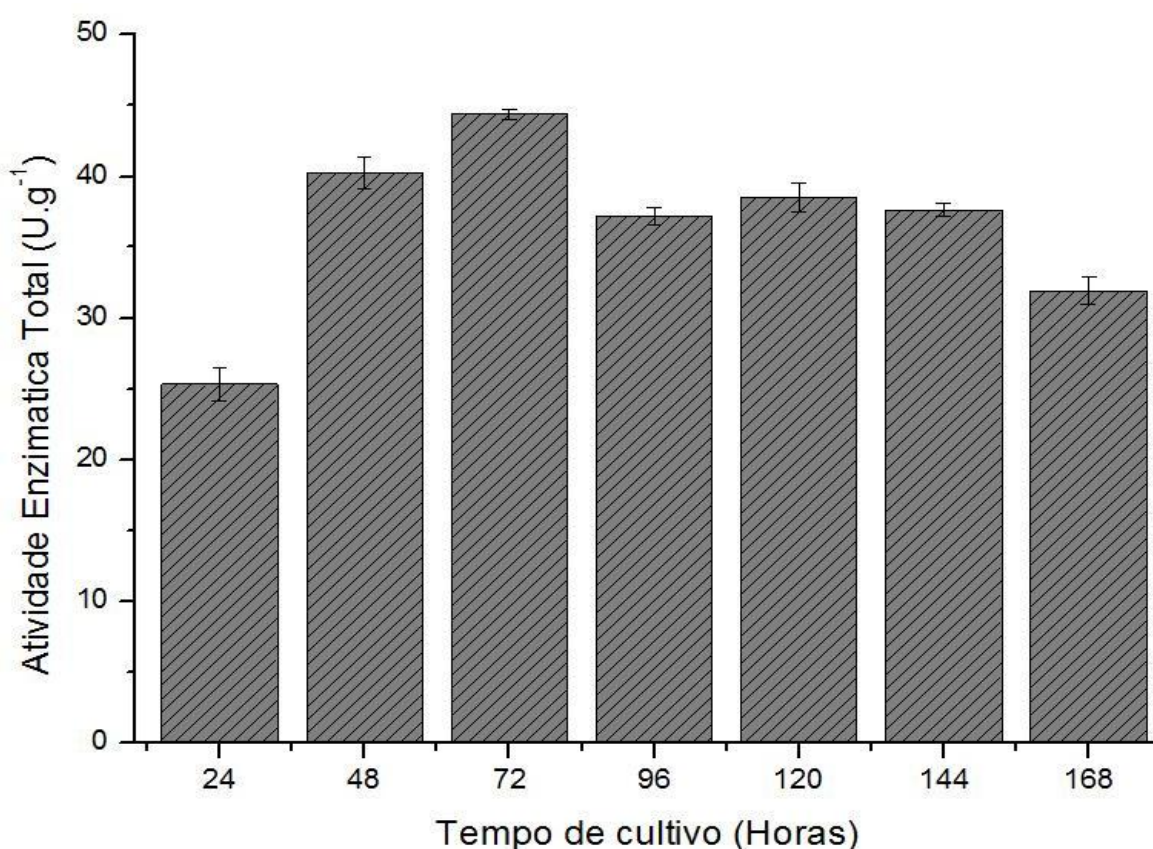
As enzimas foram extraídas do gel com a adição de 1 mL de tampão acetato pH 5,5 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e trituração com bastão de vidro, deixando-se em repouso por aproximadamente dois minutos e retirando o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta. Para checar a pureza das frações, uma nova eletroforese foi realizada e a coloração de zimograma utilizada.

Para a análise da termodinâmica da desnaturação térmica irreversível foram utilizadas as linhas gerais propostas por autores que analisaram a desnaturação térmica de enzimas (SAQIB et al., 2012; SAQIB et al., 2010; SIDDIQUI et al., 1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para confecção da curva de produção das endoglucanases, foram retiradas amostras a cada 24 horas, até o período total de 168 horas. Foi detectada a maior produção após decorridas 72 horas de cultivo em BOD a 45°C, apresentando 44,4 U g⁻¹. Este tempo foi utilizado como padrão para a produção de volumes maiores de extrato enzimático, utilizado nas análises subsequentes (Figura 1).

Figura 1. Curva de produção de endoglucanases pelo fungo termofílico *M. thermophila* por cultivo em estado sólido a 45°C. A barra representa o valor da média de atividade usando substrato CMC de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

A combinação de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo se mostrou eficiente para a produção das endoglucanases. Muitos estudos utilizam farelo de trigo como substrato para produção de biomassa ou metabólitos como enzimas por ser rico em amido, sendo um ótimo indutor de amilases, porém os oligossacarídeos presentes em sua composição se mostram eficientes na indução da produção de celulasas e hemicelulasas (SUN et al., 2008). Já o bagaço da cana-de-açúcar é considerado um

co-produto na obtenção de produtos com valor agregado devido à sua composição química característica, rica em celulose, hemicelulose e lignina, além de ser um importante resíduo agroindustrial (CANILHA et al., 2013). Essas características o tornam um substrato atraente para cultivo de microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas, pois a presença de celulose favorece o crescimento principalmente de fungos, em tempos menores.

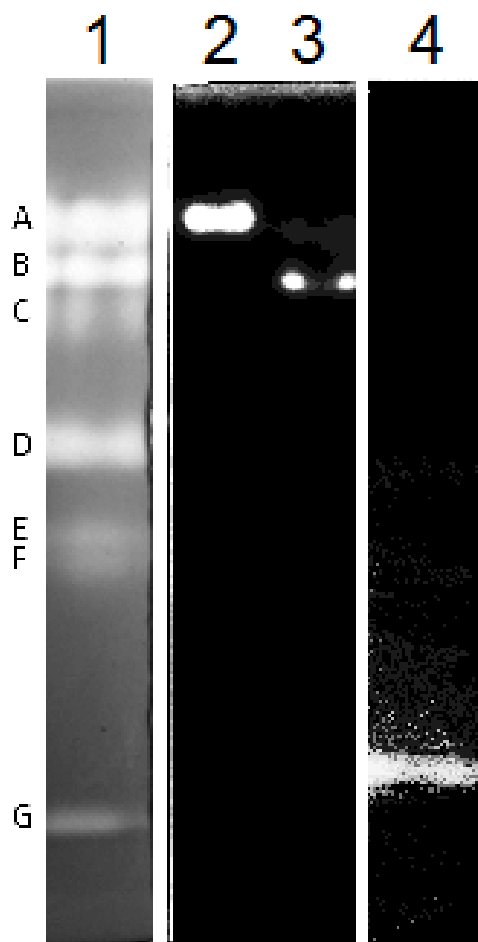
Em trabalho anterior que foi responsável pelo isolamento da cepa utilizada no presente trabalho, foi obtido 54 U g^{-1} de CMCase após o cultivo por 192 horas em uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo na proporção 9:1 (Moretti et al., 2012). O resultado obtido no presente trabalho em 72 horas de cultivo e na proporção 4:1, demonstrou-se relativamente próximo aos valores encontrados por esta autora com a mesma cepa.

Uma produção significativamente maior de 350 U g^{-1} de CMCase foi descrita para o fungo *M. thermophila I-1D3b* em cultivo por 144 horas em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (7:3) e umidade inicial de 80% (CASCIATORI et al., 2014).

Heidorne, em seu cultivo de *Ceriporiopsis suvermispora* utilizando lascas de madeira para a fermentação em estado sólido, obteve uma produção entre 15 e 31 U g^{-1} de CMCase (HEIDORNE et al., 2006). Já Kalogeris e seus colaboradores obtiveram valores muito superiores aos obtidos no presente trabalho (1.572 U g^{-1} de CMCase) ao cultivarem o fungo *Thermoascus aurantiacus*, espécie conhecida pela excelente produção de xilanase e celulase (KALOGERIS et al., 2003).

O zimograma do extrato enzimático bruto demonstrou a presença de sete endoglucanases, sendo estas observadas pelo aparecimento de bandas. Para sua identificação, estas foram denominadas A, B, C, D, E, F e G, conforme a migração no gel de eletroforese, e a imagem foi editada utilizando-se o programa GIMP 2.8.16 (GNU Image Manipulation Program), usando filtros para transformação da imagem a tons de cinza e aumento do contraste (Figura 2).

Figura 2. Zimograma de endoglucanases presentes no extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *M. thermophila* (1) e das endoglucanases A (2), B (3) e G (4) isoladas. O gel foi corado com 0,1% de vermelho Congo e descorado com NaCl 1 mol L⁻¹, e a foto editada utilizando-se o programa GIMP 2.8.16 (GNU Image Manipulation Program), usando filtros para transformação da imagem a tons de cinza e aumento do contraste. As bandas claras demonstram a presença das endoglucanases.

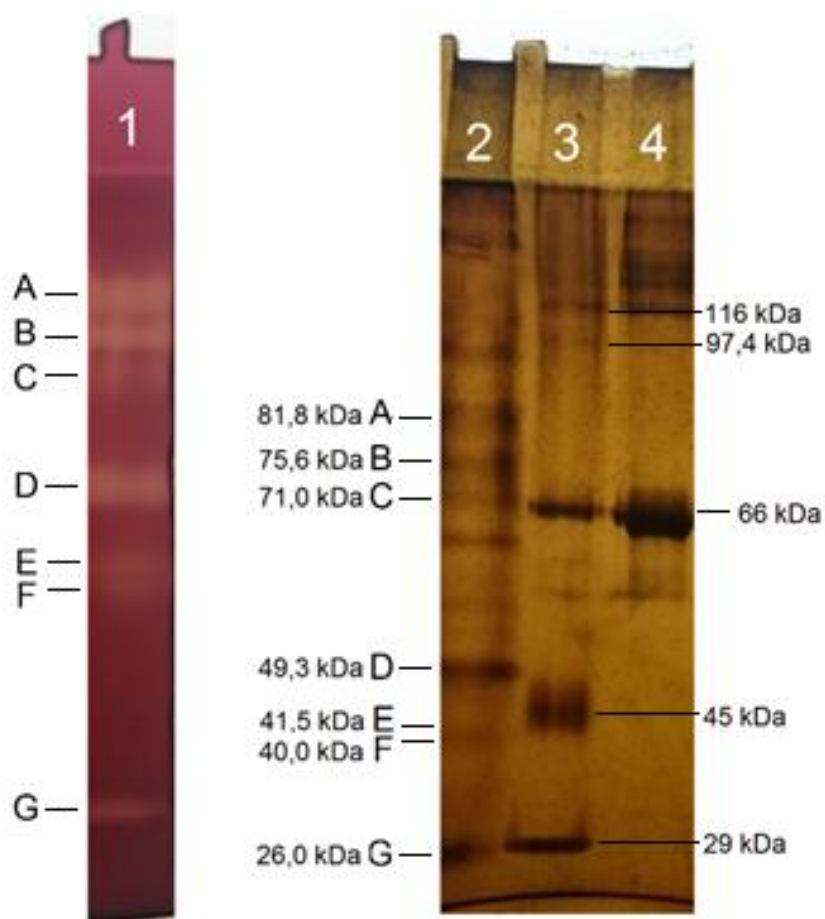


Fonte: Autoria própria.

A presença de isoformas de endoglucanase no extrato enzimático bruto também foi relatada por Da Silva e colaboradores; em seus estudos, ao realizar fermentação em estado sólido com o fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4, detectou seis bandas em seu zimograma (DA SILVA et al., 2016).

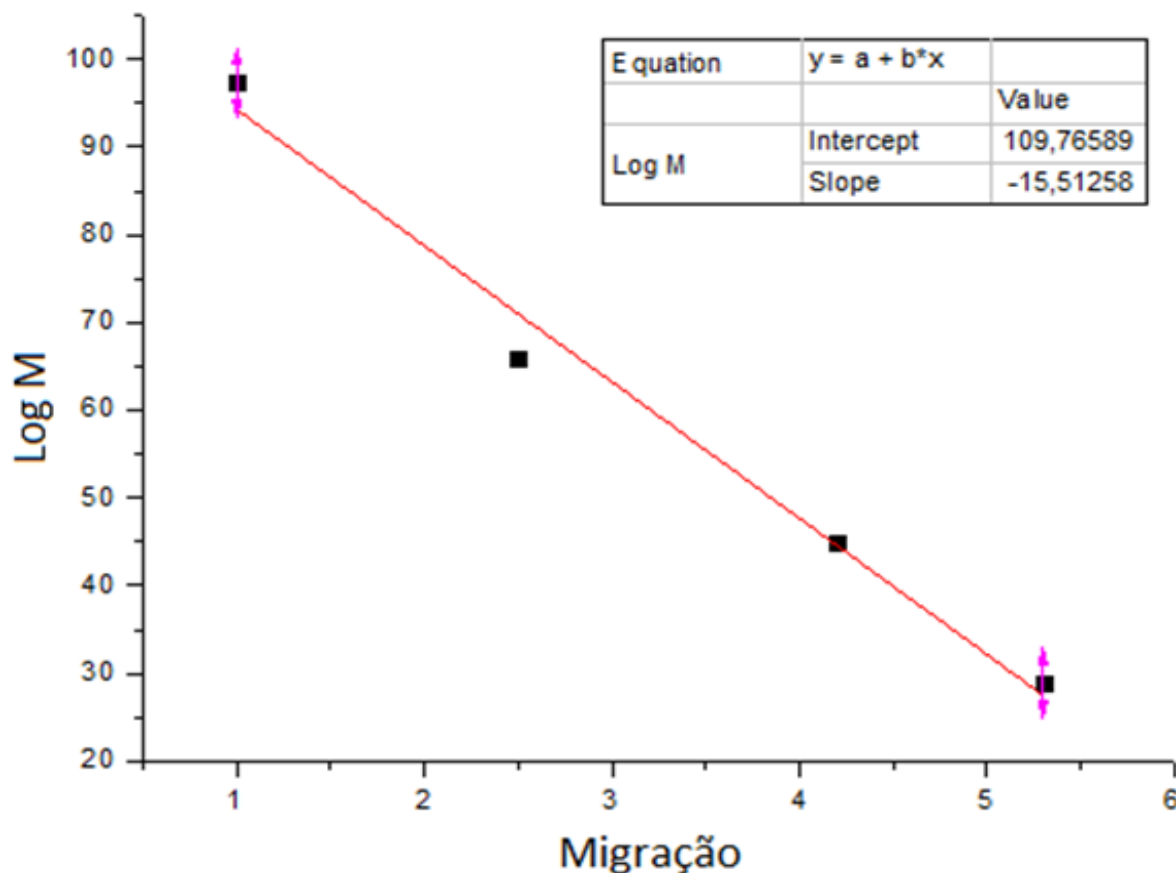
Com base nos resultados obtidos a partir da técnica de eletroforese SDS-PAGE (Figura 3), foi confeccionado um gráfico do logaritmo da massa molecular vs. a migração no gel de poliacrilamida (Figura 4) e por meio da regressão linear obteve-se a seguinte equação da reta $y = 109,77 + (-15,51 * x)$.

Figura 3. Gel de SDS-PAGE (gel de corrida a 10% e gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida) comparado ao zimograma. A coluna 1 corresponde ao zimograma, a coluna 2 corresponde ao extrato enzimático bruto com tampão de amostra na presença de SDS e sem exposição à fervura, a coluna 3 corresponde aos marcadores de massa molecular *High weight standard mixture* - Sigma (29 – 205 kDa) e a coluna 4 corresponde ao marcador molecular soro albumina bovina (66 kDa).



Fonte: Autoria própria.

Figura 4. Gráfico de Fischer (DENNISON, 2003) do logaritmo da massa molecular dos padrões vs. a migração em gel de poliacrilamida.



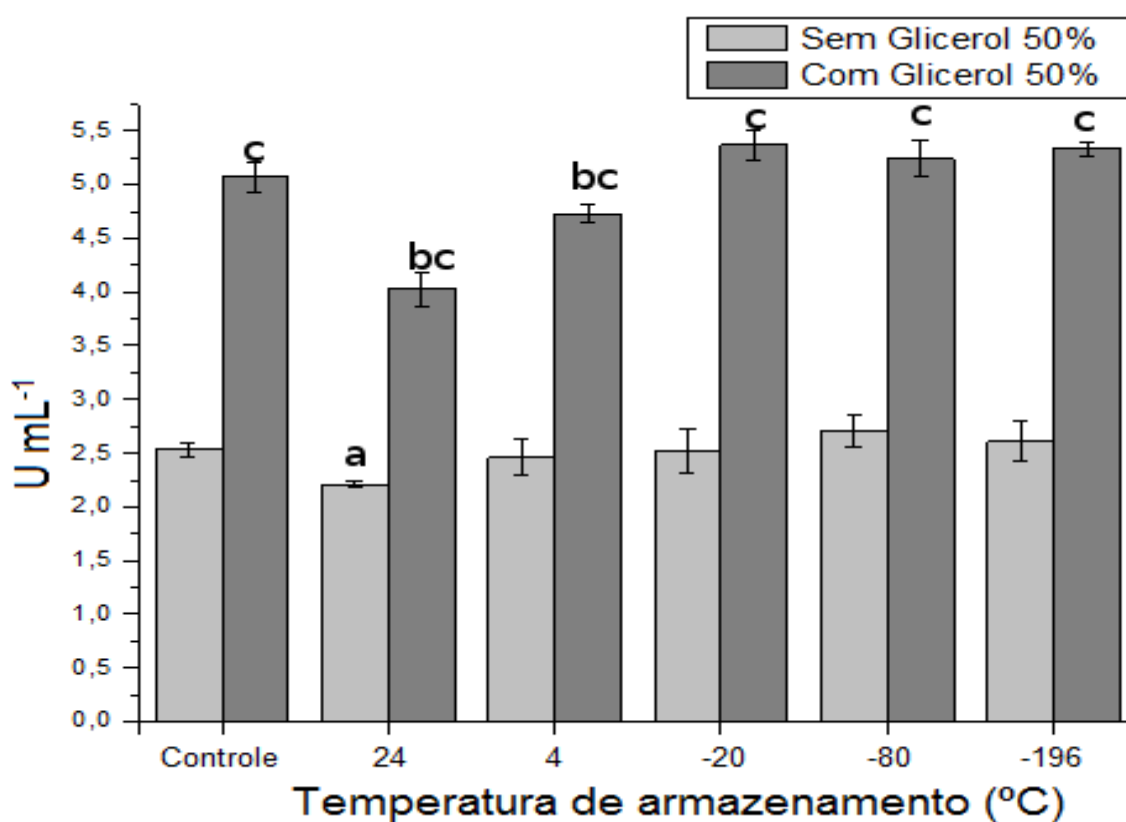
Fonte: Autoria própria.

Utilizando-se este gráfico foram estimadas as massas moleculares das endoglucanases, observa-se que as bandas denominadas A, B, C, D, E, F e G, indicadas na coluna 2 da figura 3, melhor se assemelham ao perfil de bandas aparentes na técnica de zimografia visto na coluna 1. Devido à heterogeneidade proteica do extrato enzimático bruto, é difícil estabelecer com exatidão qual banda observada em SDS-PAGE corresponde à mesma banda aparente em zimografia. Por essa razão, concluímos que as massas moleculares das endoglucanases do fungo *M. thermophila* se encontram na faixa entre 26 e 82 kDa.

Em vista da grande quantidade de isoformas, optou-se por realizar a purificação destas endoglucanases através da extração do gel de poliacrilamida após a realização da eletroforese, para caracterizá-las quanto ao pH e temperatura ótimos de reação.

Foi testado o efeito da temperatura de armazenamento sobre as endoglucanases do extrato bruto com e sem glicerol 50%, observando na figura 5 uma elevação da atividade na presença dessa substância.

Figura 5. Atividade enzimática de endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* após 24 horas em variadas temperaturas de armazenamento na presença e na ausência de 50% de glicerol. A barra representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. O valor médio de atividade enzimática das amostras testadas antes do armazenamento com e sem glicerol foram consideradas como controles. a: diferença significativa de amostra sem glicerol em relação ao seu controle; b: diferenças significantes de amostra com glicerol em relação ao seu controle; c: diferenças significantes das amostras com glicerol em relação àquelas sem glicerol.



Fonte: Autoria própria.

A refrigeração do material garantiu maior atividade do extrato enzimático na ausência de glicerol em relação às alíquotas mantidas à temperatura ambiente; há diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle e a amostra mantida à temperatura ambiente por 24h, porém não em relação às demais amostras mantidas em refrigeração.

É notável o efeito do glicerol, o qual aumentou de forma significativa, praticamente duplicando a atividade em todas as condições. Comparando as amostras contendo glicerol com o seu respectivo controle, há diferenças significantes ($p < 0,05$) apenas para as enzimas mantidas à temperatura ambiente e 4°C. Resultados ainda mais chamativos foram relatados por Naika e colaboradores (NAIKA; PRAKASH; TIKU, 2009) trabalhando com endoglucanases de *Aspergillus aculeatus*; uma concentração de 40% de glicerol aumentou 4 vezes a atividade enzimática.

As enzimas podem perder sua capacidade catalítica por alterações estruturais, que podem ser reversíveis ou irreversíveis, sendo o estado nativo aquele no qual a molécula se encontra biologicamente ativa, e o estado desnaturado aquele no qual a molécula sofreu alteração do seu estado nativo por desenovelamento e conseqüentemente perda da sua capacidade catalítica (BISSWANGER, 2014).

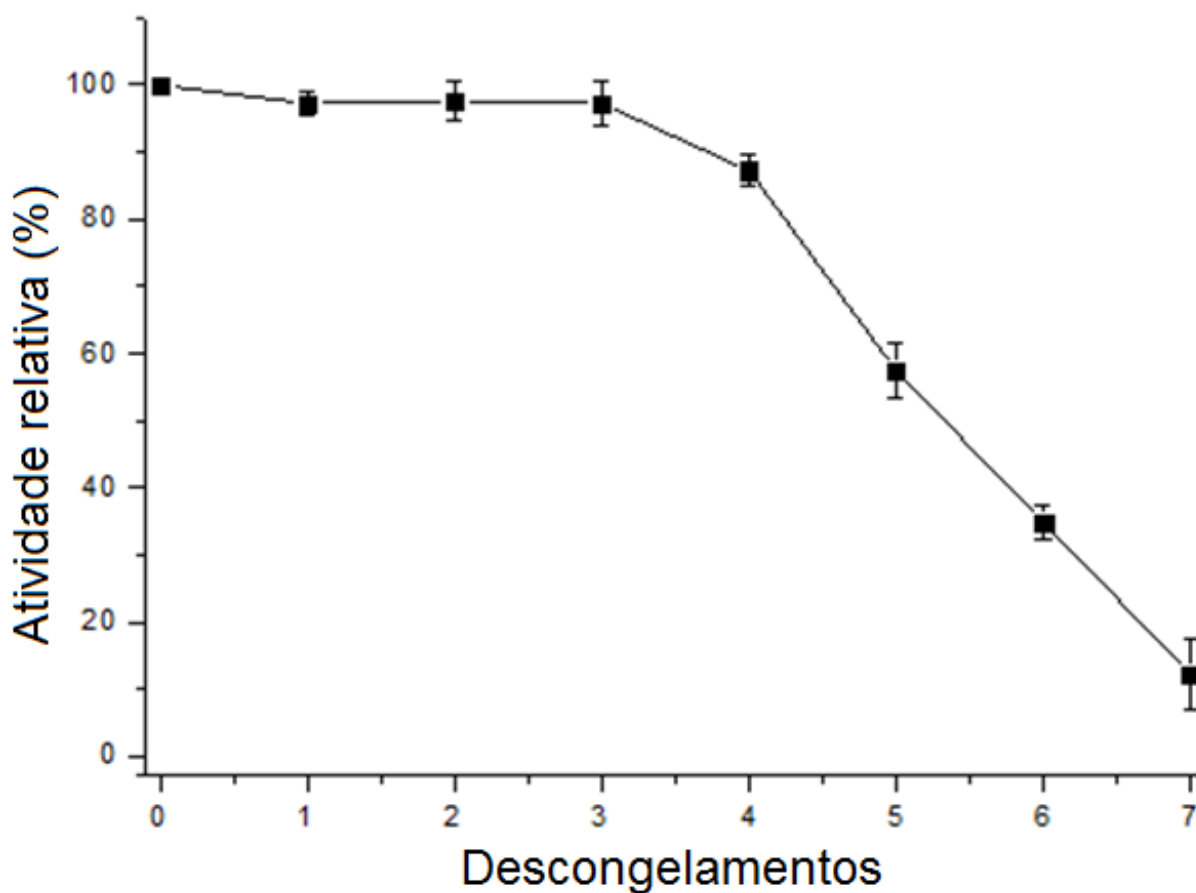
É conhecido o efeito de osmólitos sobre a estabilidade conformacional de proteínas em situações adversas de estresse celular (VIANA; FILHO; PENHA-SILVA, 2006), sendo o glicerol um poliálcool. De forma similar ao que ocorre com o sorbitol, ele favorece o enovelamento da proteína, tornando a cadeia polipeptídica mais compacta e menos flexível, uma vez que ele atua deslocando o equilíbrio da reação para o estado menos energético. Em concentrações entre 20 a 40% (v/v), o glicerol é preferencialmente excluído da superfície das proteínas na sua conformação nativa; em virtude do qual a energia livre necessária para desdobrar proteínas na presença do aditivo é aumentada e a estrutura da proteína nativa é estabilizada (CHONG; HARRISON; O'HARA, 2014).

A interação da enzima com o osmólito não é favorável para sua função, por isso eles são excluídos da superfície da proteína, onde ocorre a formação de uma camada de hidratação, formada por várias moléculas de água altamente organizadas e menos flexíveis que as demais. Sendo assim o estado desenovelado apresenta maior superfície de contato da cadeia polipeptídica com as moléculas de água, resultando em uma camada de hidratação maior, que necessitará de mais energia para estabilização, por essa razão o glicerol irá atuar deslocando o equilíbrio da reação no sentido do estado nativo, elevando assim os níveis de atividade enzimática (FONSECA, et al., 2006; GEKKO; TIMASHEFF, 1981).

No teste de congelamentos a -20°C e descongelamentos sucessivos em intervalos de um dia (Figura 6) é possível observar que a atividade enzimática mostrou

decréscimo progressivo a partir do terceiro ciclo. Após isso, a atividade foi reduzindo significativamente até que no sétimo descongelamento já se encontrava com apenas 12,3% da atividade inicial, indicando que embora as enzimas apresentem aparente estabilidade, a partir do quarto ciclo este processo é prejudicial à sua função.

Figura 6. Avaliação do efeito de congelamentos e descongelamentos do extrato enzimático bruto de *M. thermophila* M.7.7.. O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



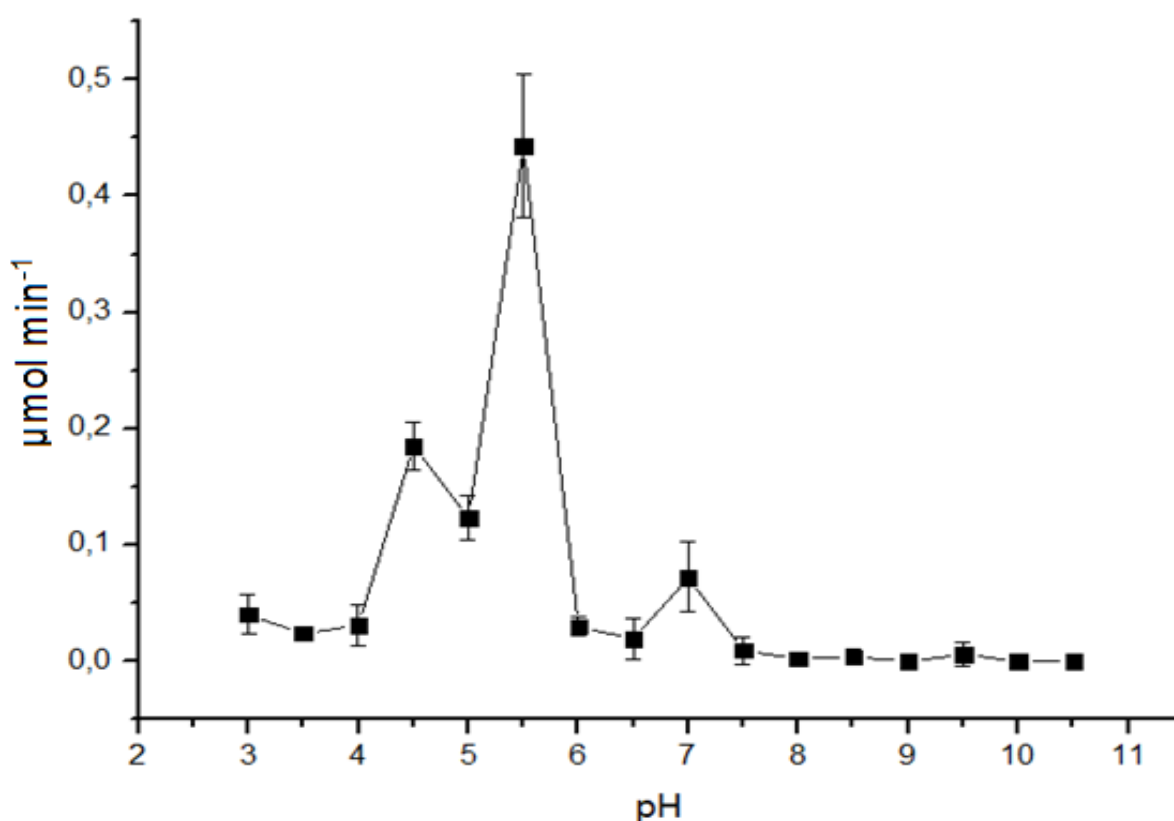
Fonte: Autoria própria.

As propriedades cinéticas de uma enzima são importantes na definição do seu eventual potencial para utilização em aplicações industriais e biotecnológicas. As medidas cinéticas pressupõem a quantificação da liberação do produto formado pela enzima por unidade de tempo (minuto), a denominada taxa inicial de reação ou velocidade inicial (V_0). A variação da concentração do produto é linear em função do tempo apenas durante um período mais ou menos breve, o qual sugere que o

consumo do substrato seja ínfimo (menor a 5%), não afetando sua disponibilidade e, portanto, a ligação enzima-substrato. Isso segue os pressupostos da teoria de Michaelis-Menten (DENNISON, 2003). Nas condições testadas (resultados não mostrados) a linearidade se manteve até quatro minutos de incubação, tempo adotado para as medidas; tempos maiores levariam a subestimar a taxa inicial de reação.

O efeito do pH sobre a atividade foi testado com o extrato enzimático; a figura 7 mostra o pH ótimo do extrato enzimático em torno de 5,5, com clara diminuição da atividade em torno desse valor. Um segundo pico com ao redor de 40% da atividade do primeiro pode ser visto em pH 4,5 e outro ainda menor em pH 7,0, o que pode refletir valores diferentes de pH ótimo para as diversas endoglucanases presentes no extrato e já mostradas na figura 2. Os ensaios foram realizados a 50°C.

Figura 7. Efeito do pH sobre a atividade das endoglucanases do extrato enzimático de *M. thermophila* M.7.7. . O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. Temperatura do ensaio: 50°C.



Fonte: Autoria própria.

Moretti e colaboradores estudaram as endoglucanases do fungo utilizado no presente trabalho e encontraram o pH ótimo de reação como sendo 5,5 em temperatura de 65°C (MORETTI et al., 2012), similar à máxima atividade encontrada neste trabalho.

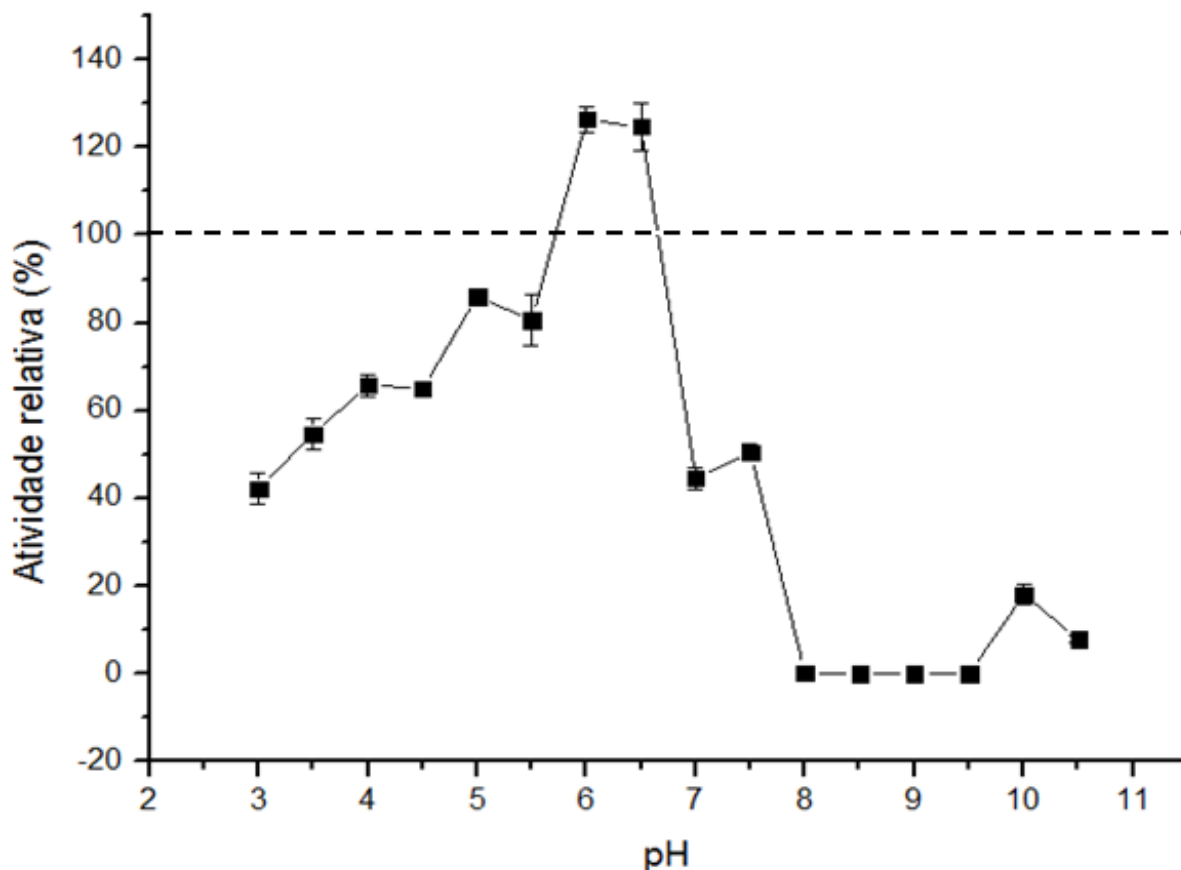
Casciadori e colaboradores (CASCIATORI et al., 2014) testaram as endoglucanases produzidas por dois fungos. Em seu trabalho, avaliou-se a temperatura e pH ótimos para atividade endoglucanase dos extratos celulolíticos produzidos pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e pelo mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414 durante cultivo sólido em bagaço de cana e farelo de trigo. A maior atividade de endoglucanase foi obtida em pH 4,5 e temperatura igual a 45°C para *T. reesei*, enquanto para *M. thermophila*, foi obtida em pH 5,5 e temperatura igual a 65°C.

As endoglucanases produzidas por fermentação em estado sólido com o fungo *M. heterothallica* F.2.1.4, demonstraram pH 5,5 como o ótimo de atividade enzimática realizada a 60°C (DA SILVA et al., 2016). Ao analisar uma endoglucanase extracelular produzida pelo *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104), Roy e colaboradores obtiveram o pH 4,8 como ótimo, em ensaios realizados a 65°C (ROY et al., 1990).

Kaur e colaboradores estudaram duas endoglucanases produzidas por *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 e obtiveram os valores de 5,0 e 6,0 como os ótimos de pH para cada uma delas em ensaios realizados a 70 e 50°C respectivamente (KAUR et al., 2007). Por outro lado, quando analisada a endoglucanase do fungo *Myceliophthora thermophila* BJA, foi encontrado o pH 10,0 como o ótimo desta enzima em ensaios a 50°C (PHADTARE; JOSHI; SATYANARAYANA, 2017).

A estabilidade com relação ao pH das endoglucanases presentes no extrato enzimático bruto também foi analisada (Figura 8), constatando-se que estas enzimas apresentam melhor atividade quando são mantidas em tampões entre os pHs 6,0 e 6,5, sendo a atividade maior do que a de uma amostra controle mantida em água ultrapura pelo mesmo período. O teste perdurou por 24 horas, e também demonstrou que em pHs abaixo de 5,5 a atividade sofreu diminuição da atividade, porém menos drástica do que acima de pH 6,5.

Figura 8. Efeito do pH sobre a atividade das endoglucanases de *M. thermophila* M.7.7 após incubação por 24 h em diferentes valores de pH: O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão. O ensaio enzimático foi realizado à 50°C, o controle (100%) foi constituído por água ultrapura e extrato enzimático e também mantido por 24h.



Fonte: Autoria própria.

As endoglucanases de *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *M. thermophila* M.7.7. apresentaram a melhor estabilidade no pH 7,5, quando incubadas na ausência de substrato pelo período de 1 hora (MORETTI et al., 2012). A faixa de pH de estabilidade encontrada por Da Silva e colaboradores em seu trabalho com as endoglucanases presentes no extrato bruto produzido pelo fungo *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. em fermentação em estado sólido (DA SILVA et al., 2016) foi de 4,0 a 9,0. Em pHs maiores e menores do que este, a atividade relativa diminuiu consideravelmente, efeito que também foi observado nas endoglucanases do presente trabalho.

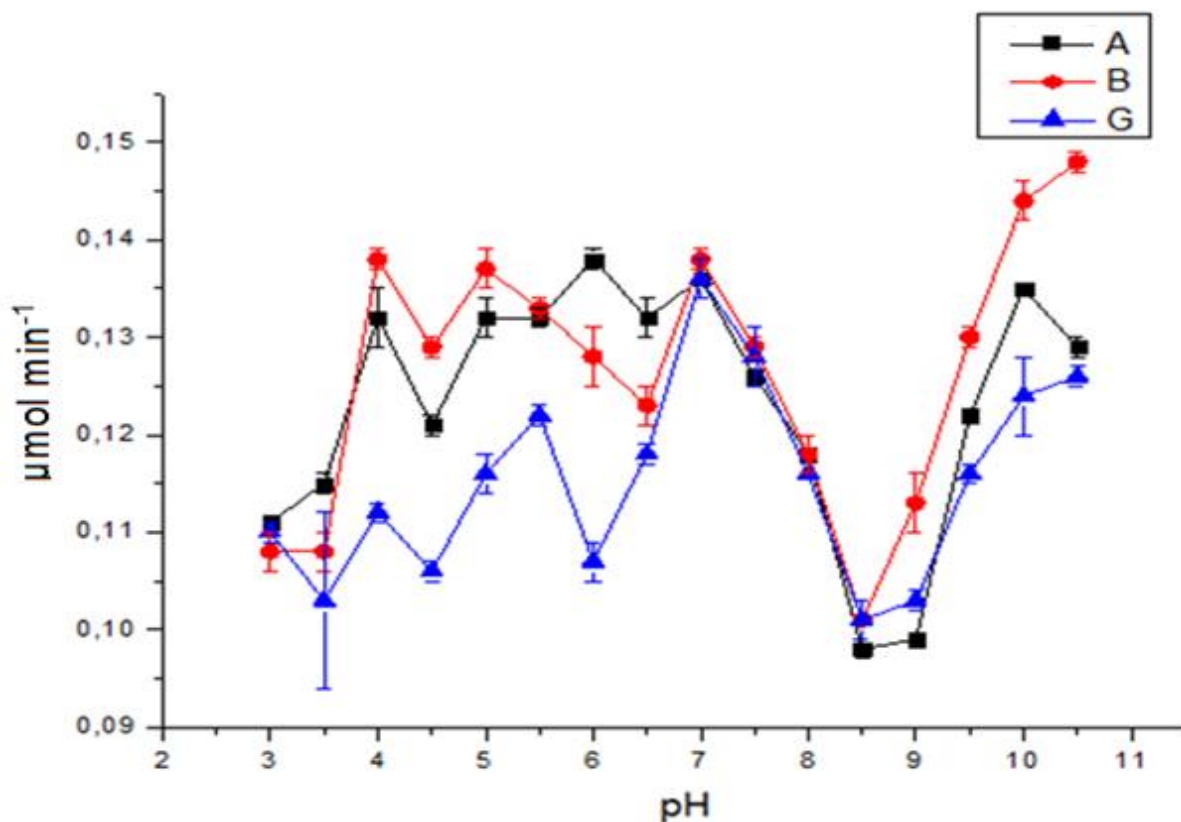
Em virtude das dificuldades que tivemos para isolamento das endoglucanases presentes no extrato pelos métodos cromatográficos convencionais, fizemos extração de algumas dessas enzimas com maior atividade direto do gel de poliacrilamida após

uma corrida eletroforética. As endoglucanases (EG) A, B e G isoladas dessa maneira demonstraram perfis parecidos com relação ao pH ótimo de reação (Figura 9). Os ensaios realizados na temperatura de 70°C demonstraram que a maior atividade da EGA foi em pH 6,0, valor próximo ao pH ótimo de reação do extrato enzimático bruto (5,5). Já a EGG apresentou sua maior atividade em pH 7,0.

Podemos observar que EGA e EGB possuem atividade considerável entre os pHs 4,0 e 7,0, pois os valores nessa faixa de pH foram ligeiramente maiores que os apresentados pela endoglucanase G nesta mesma faixa. As três enzimas apresentaram redução em sua atividade nos pHs 8,5 e 9,0, porém voltaram a apresentar boa atividade nos pHs 10,0 e 10,5, com destaque para a endoglucanase B que apresentou seu maior valor no pH 10,5.

A diferença de comportamento acima de pH 8,0 poderia ser atribuída a eventuais modificações químicas das enzimas durante a corrida eletroforética. Têm sido relatadas alterações possíveis em proteínas nessas condições (TALIAN, et al., 2012). Em outras palavras, a modificação química não intencional conferiu às enzimas atividade significativa em uma faixa de pH na qual originalmente não a possuíam.

Figura 9. Efeito do pH sobre a atividade das endoglucanases produzidas pelo fungo *M. thermophila* M.7.7, isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida. O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.

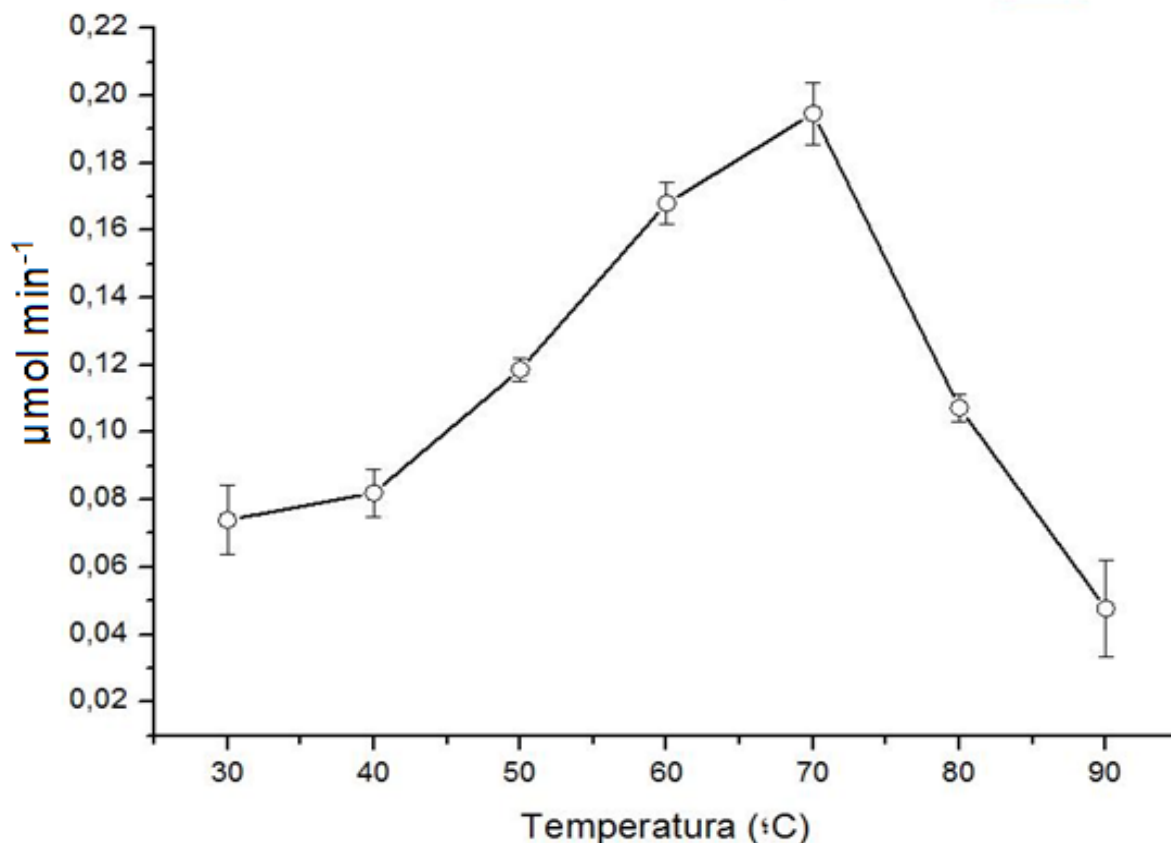


Fonte: Autoria própria.

Uma endoglucanase extracelular produzida por *M. thermophila* D-14 (ATCC 48104) foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, seguida de duas cromatografias de troca iônica em resina DEAE-Sephadex A-50. Nas análises de pH e temperatura ótima para a sua atividade foram encontrados os valores de 4,8 e 65°C, respectivamente (ROY et al., 1990).

Nos ensaios para determinação da temperatura ótima de reação das endoglucanases, ao realizar o ensaio por 4 minutos podemos observar que ocorreu um aumento progressivo na atividade enzimática até atingir 70°C (onde encontramos o maior valor de atividade), seguida de uma queda acentuada nas temperaturas mais elevadas (Figura 10).

Figura 10. Efeito da temperatura do ensaio enzimático sobre a atividade das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7. Os ensaios foram executados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5 com 4% (m/v) de CMC. O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

As celulasas são enzimas muito importantes na produção de bioetanol a partir de biomassa agroindustrial e têm sua atividade dependente de pH e temperatura. Casciadori e colaboradores estudaram as endoglucanases produzidas por dois fungos (o termofílico *M. thermophila* I-1D3b e o mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414) durante cultivo sólido em bagaço de cana e farelo de trigo. A ótima atividade de endoglucanase foi obtida em temperatura igual a 45 °C para *Trichoderma reesei*, sendo esta enzima inativada a partir de 70 °C. Para *M. thermophila* I-1D3b, a ótima atividade de endoglucanase foi obtida em temperatura igual a 65 °C, e somente declinou a partir de 80 °C, sugerindo que as celulasas de fungos termofílicos são promissoras para aplicação na cadeia de produção do etanol de segunda geração (CASCIATORI et al. 2014).

As endoglucanases produzidas em cultivo em estado sólido e em cultivo submerso pelo fungo *M. heterothallica* F.2.1.4., apresentaram os valores de 60 e 65°C como temperatura ótima de reação, respectivamente (DA SILVA et al., 2016).

Analisando as enzimas obtidas por cultivo sólido, as de *P. sanguineus* apresentaram temperatura ótima de 60°C. Os valores entre 60 e 70°C foram apresentados por endoglucanases produzidas por *Trichoderma atroviride* 676, e valores similares a este foram relatados para as enzimas do fungo *Penicillium* sp CR-316 (FALKOSKI et al., 2012; GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2013; PICART et al. 2007).

Phadtare e colaboradores, em seus estudos da endoglucanase recombinante de *M. thermophila* BJA, encontrou na temperatura de 50°C sua atividade máxima (PHADTARE, JOSHI, SATYANARAYANA, 2017). A endoglucanase extracelular de *M. thermophila* D-14 (ATCC 48104) purificada mostrou maiores níveis de atividade na temperatura de 65°C, assim como as do fungo *M. thermophila* M. 7.7. (MORETTI et al., 2012; ROY et al., 1990).

Para as endoglucanases isoladas a partir de geis de eletroforese, os ensaios enzimáticos de temperatura ótima de reação foram realizados em microplacas. Os maiores valores de atividade foram obtidos a 70°C (resultados não mostrados), conforme verificado no extrato enzimático.

O efeito da temperatura na atividade de CMCase presente no extrato bruto concentrado e frações semi purificadas produzidas por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja foi analisado. A maior atividade foi obtida a 60 °C no extrato concentrado e na fração Cel-QFF, e a 70 °C na fração Cel-DEAE. Todas as amostras apresentaram atividade celulolítica em uma ampla faixa de temperatura. Foi retida, pelo menos, 70 % da atividade máxima na faixa de temperatura entre 40 e 70 °C em todas as amostras analisadas. As enzimas parcialmente purificadas apresentaram maior atividade relativa em temperaturas elevadas (70 °C e 80 °C) em relação às enzimas presentes no extrato concentrado (SCIUTO, 2015).

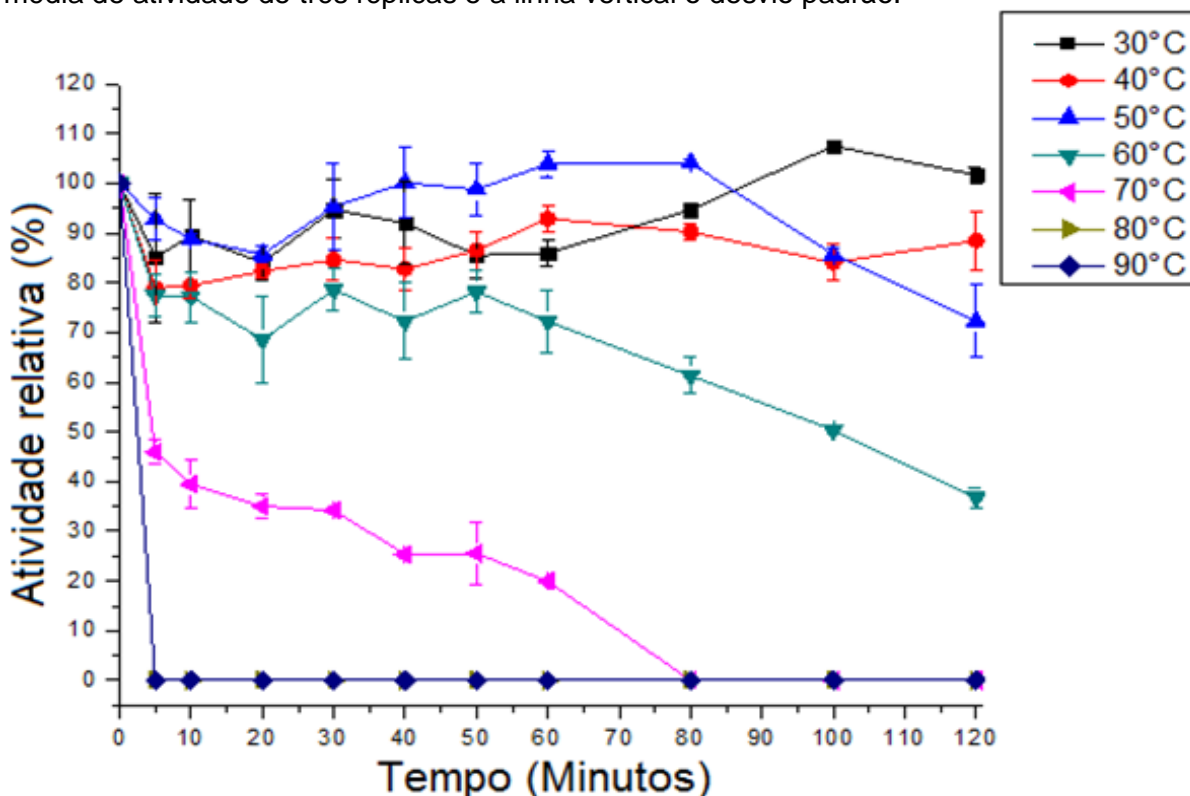
Ao realizar o teste de estabilidade térmica incubando-se o extrato bruto na ausência de substrato por diferentes intervalos de tempos nas mesmas temperaturas avaliadas anteriormente para posterior realização do ensaio enzimático (Figura 11), observou-se que em todas as temperaturas foram obtidos valores menores de 100% da atividade relativa para as incubações mais curtas, até 20 minutos. Enquanto nas temperaturas de 60 graus ou mais elevadas a queda de atividade conforme aumenta

o tempo é evidente, nas temperaturas entre 30 e 50°C ocorre uma recuperação da atividade. Observações semelhantes têm sido relatadas para endoglucanases do actinomiceto termofílico *Thermomonospora curvata*, com aumento da atividade em resposta ao aquecimento dependente do pH, sendo observável em pH alcalino a 70°C (STUTZENBERGER; LUPO, 1986).

A interpretação desse comportamento é complexa sem ter a enzima pura e sem experimentos adicionais para a compreensão da origem do fenômeno. Poderia ser aventado, *a priori*, que sendo enzimas termofílicas e com maior rigidez estrutural, um aumento da temperatura em faixas abaixo daquelas que promovem sua desnaturação seja capaz de promover alguma leve alteração estrutural que seja capaz de elevar sua atividade catalítica.

Mesmo nas temperaturas de 60 e 70°C as enzimas mantiveram aproximadamente 40% de atividade após 2 horas e 20% após 1 hora, respectivamente. Já em 80 e 90°C, os pontos se sobrepõem em zero.

Figura 11. Efeito da temperatura de pré-incubação em diversos tempos sobre a atividade das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7. O símbolo representa o valor da média de atividade de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

As endoglucanases de *Aspergillus fumigatus* M.7.1 e *M. thermophila* M.7.7. apresentaram a melhor estabilidade nas temperaturas de 50 e 35 a 40°C respectivamente e, quando incubadas na ausência de substrato pelo período de 1 hora, a atividade se manteve em 100%. Quando incubadas em temperaturas maiores ou menores que estas, as endoglucanases mostraram menor atividade relativa (MORETTI et al., 2012).

Já as endoglucanases produzidas em cultivo sólido e em cultivo submerso de *M. heterothallica* F.2.1.4., nos ensaios realizados em pH 5,5, apresentaram maior estabilidade nas temperaturas de 50 e 40°C respectivamente. É importante ressaltar que a atividade relativa só aumentou no caso da endoglucanase produzida em cultivo sólido (DA SILVA et al., 2016).

Para planejar com maior eficiência os processos nos quais se deseja aplicar a enzima e garantir a maior eficiência catalítica, é de grande importância o conhecimento de quais substâncias podem exercer efeito de aumento ou diminuição da atividade enzimática.

Em relação ao efeito de substâncias químicas (Tabela 1), a atividade enzimática das endoglucanases presente no extrato bruto produzido pelo fungo *M. thermophila* M.7.7 diminuiu de forma significativa na presença da maioria das substâncias testadas, com exceção de Triton, DTT e Isopropanol. Já na presença de polietilenoglicol (3.350 kDa), a redução comparada ao valor inicial foi de 28,5%. Por outro lado, Triton X-100 e Isopropanol foram capazes de aumentar significativamente a capacidade catalítica respectivamente, enquanto o DTT não a aumentou de forma significativa.

A atividade se mostrou bastante sensível à presença de 10 mmol L⁻¹ do detergente SDS, assim como à acetona e EDTA, que causaram diminuição significativa da atividade.

Tabela 1. Efeito de substâncias químicas na concentração final de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade residual percentual (média ± D.P.) de endoglucanases presentes em extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *M. thermophila* M.7.7. (*) Diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.

Substância	Ativ. Residual (%)	± DP
SDS	67,2*	1,2
PEG	71,5*	0,7
Triton	109,5*	4,7
DTT	104,8	3,1
Acetona	68,3*	0,5
Etanol	93,6	4,5
Isopropanol	112,3*	1,6
EDTA	56,8*	4,0
Controle	100,0	3,4

Fonte: Autoria própria.

A grande diminuição da atividade observada na presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) sugeriria que as enzimas são metaloenzimas, pois essa substância é um quelante para íons metálicos e isso sugere a existência de cofator (TERRASAN et al., 2016) que ao ser retirado prejudica a ação catalítica da enzima.

No caso da diminuição da atividade apresentada na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) pode ser devido ao fato dele ser um detergente aniônico. Com isso, a porção hidrofóbica do SDS se liga às proteínas em uma proporção de uma molécula de detergente para cada dois resíduos de aminoácidos, assim as ligações hidrofóbicas das proteínas são desestabilizadas e estas perdem sua estrutura tridimensional nativa, enquanto que a porção hidrofílica do tensoativo apresenta elevada carga negativa, que passa a ser predominante na superfície da proteína e leva ao desenovelamento da proteína devido à repulsão eletrostática; dessa forma as enzimas perdem suas características estruturais e conseqüentemente sua capacidade catalítica. Contudo, há ainda aspectos controversos em relação a essas propostas (BHUYAN, 2010).

Em contraste, o Triton é um detergente não iônico, ou seja, não apresenta grupamento hidrofílico ionizado. É utilizado na extração de proteínas de membrana,

pois interage mais fortemente com lipídeos do que com proteínas, desestabilizando a membrana lipoproteica e facilitando a extração das proteínas (BHAIRI; MOHAN, 2007). Por essa razão não é considerado agente desnaturante, uma vez que não afeta a estrutura e a carga da proteína, e pode apresentar efeito de elevação da atividade enzimática, como no caso do presente trabalho. É usado, inclusive, para retirada do SDS em protocolos de zimografia (DA SILVA et al., 2016).

Em relação ao efeito de solventes orgânicos como o etanol e a acetona eles induziram queda da atividade na presença de 10 mmol L⁻¹ embora o efeito do primeiro não tenha sido significativo, como o da acetona. O isopropanol apresentou um ligeiro aumento na atividade.

A ausência de efeitos adversos para os álcoois provavelmente seja devido à baixa concentração; no caso do etanol corresponde a aproximadamente 0,046%, calculada a partir da fórmula $C\% = M \times 100\% \times m/d$, onde C% é a concentração percentual, M a molaridade, *m* a massa molecular e *d* a densidade. Solventes orgânicos em geral são capazes de promover a desnaturação e a perda da atividade enzimática devido à sua ação disruptiva sobre as interações hidrofóbicas que mantêm a conformação nativa, bem como promovem alterações de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio devido à sua menor constante dielétrica (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2007).

O DTT causa a redução das ligações dissulfeto em resíduos de cisteínas (ROCHA et al., 2005), e ao clivarem as ligações dissulfeto (-S-S-) desestabilizam a estrutura tridimensional das proteínas, diminuindo sua atividade enzimática. Este efeito não foi observado nas endoglucanases do presente trabalho, que apresentaram um aumento não significativo de sua atividade; isso sugere a ausência desse tipo de ligações, pelo menos em regiões críticas da estrutura.

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero hidrofílico e solúvel em água, usado em técnicas de precipitação de proteínas por floculação, pois suas moléculas sequestram a água disponível no meio forçando as proteínas a precipitarem. Sendo assim, acredita-se que proteínas maiores tendem a precipitar mais rápido que proteínas menores (DENNISON, 2003). O PEG testado neste trabalho induziu diminuição significativa da atividade enzimática.

Aproximadamente um terço das enzimas conhecidas precisa de cofatores para sua ação catalítica, sendo estes em muitos casos cátions mono ou divalentes, e os

metais essenciais para a atividade enzimática podem ser classificados em sua maioria em dois grupos: os que não participam em reações redox são usados para estabilizar cargas negativas ou ativar substratos agindo como ácidos de Lewis, enquanto os que participam em reações redox podem cumprir esse último papel ou também agir como centros redox (ANDREINI et al., 2008). Quando detectada que a presença de um desses íons eleva a atividade enzimática, costuma-se atribuir a ele um papel fisiológico como cofator.

O efeito dos íons no sentido mais geral e não apenas relacionado aos cátions metálicos sobre a atividade enzimática, pode ser explicado por três mecanismos diferentes: primeiro sendo o íon o próprio substrato enzimático, segundo o íon agindo como cofator ou co-substrato e auxiliando a atividade catalítica, e terceiro o íon como parte da estrutura enzimática, mas sem efeito direto na função catalítica (BAUDUIN et al., 2004).

Se pensarmos que o metal não necessariamente participa da ação da enzima por ligação ao sítio ativo, porém poderia alterar sua conformação por interação com outras partes da proteína, isso explicaria por que a atividade enzimática não é nula na ausência do cátion. A enzima estaria na forma ativa, porém com atividade menor do que a conformação que seria induzida pela ligação do íon. Comportamento semelhante é induzido pelo íon sódio na trombina da coagulação sanguínea induzindo alterações conformacionais (DI CERA, 2008).

Tabela 2. Efeito de sais contendo cloro na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade das endoglucanases (média ± D.P.) presentes no extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *M. thermophila*. (*) Diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes.

Sal	Ativ. Res. (%)	± D.P.
CaCl ₂	39,9*	3,2
NaCl	102,0	3,3
KCl	90,3	1,7
CdCl ₂	33,1*	3,9
SrCl ₂	124,2*	2,2
LiCl	94,4	3,3
FeCl ₃	0,0*	0,0
MnCl ₂	88,2*	3,3
AlCl ₃	10,3*	1,4
BaCl ₂	107,8	3,6
ZnCl ₂	104,4	3,9
CoCl ₂	33,4*	2,0
NiCl ₂	70,0*	2,6
MgCl ₂	66,9*	1,4
CrCl ₃	33,4*	2,7
CuCl ₂	41,0*	6,7
Controle	100,0	3,4

Fonte: Autoria própria.

Quando testamos diversos cátions na forma de sais contendo cloro para mantermos o ânion invariável (Tabela 2), apenas o estrôncio promoveu aumento da atividade enzimática enquanto que outros provocaram sua diminuição, como no caso do ferro que inibiu completamente a ação enzimática e do alumínio que causou diminuição de aproximadamente 90% nos níveis de atividade das endoglucanases. O efeito de ativação seria casual, sem significado prático, embora existam evidências de enzimas que apresentam aumento significativo da atividade na presença desse elemento, como a metanol desidrogenase, na qual um íon cálcio foi substituído por estrôncio (HARRIS; DAVIDSON, 1994). Eventualmente íons que podem participar de reações de óxido-redução poderia ser o efeito redox promovendo a oxidação das extremidades hemiacetálicas e levando à inibição, como verificado com celulases (TEJIRIAN; XU, 2010).

Ao testar o efeito de íons por 30 minutos na concentração de 5 mmol L⁻¹, Phadtare e colaboradores obtiveram, assim como no presente trabalho, redução na atividade enzimática residual da endoglucanase produzida por *M. thermophila* BJA (rMt-egl) quando na presença dos íons Ca⁺², Fe⁺³, Co⁺², Ni⁺², Mg⁺² e Cu⁺². Porém, em seu trabalho (PHADTARE; JOSHI; SATYANARAYANA, 2017), encontraram que o zinco também reduziu em mais de 50% a atividade, diferentemente das endoglucanases de *M. thermophila* M. 7.7 aqui estudadas, que não tiveram sua atividade afetada por esse íon.

Andrade e colaboradores relataram resultados similares aos obtidos no presente trabalho, na atividade de celulase de *Trichoderma* sp. na presença de 10 mmol L⁻¹ de Ca⁺², Co⁺, Cu⁺², Fe⁺², e Mg⁺², que apresentaram queda superior a 50% na atividade. Já quando utilizados os íons Na⁺, K⁺ e Mn⁺², os resultados diferiram dos deste trabalho, pois na presença destes íons as endoglucanases de *M. thermophila* M. 7.7 não perderam tanto sua atividade quanto as de *M. thermophila* BJA (rMt-egl). Os íons Ba⁺² e Zn⁺² causaram uma redução de mais de 50% na atividade do trabalho citado, enquanto que neste foi apresentada melhora na atividade enzimática (ANDRADE et al., 2011).

Outro tipo de substâncias químicas que deve ser considerado na caracterização de enzimas para degradação de resíduos lignocelulósicos é formado pelo grupo dos compostos fenólicos, que são constituídos por hidroxilas ligadas a hidrocarbonetos aromáticos, fazem parte da estrutura da lignina e são liberados

durante o pré-tratamento térmico e ácido da biomassa lignocelulósica (SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997; TEJIRIAN; XU, 2010). Por serem conhecidos como inibidores da ação enzimática e do crescimento de microrganismos fermentadores, o efeito desses compostos foi avaliado em três tempos de exposição sobre a atividade das endoglucanases do extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *M. thermophila*, e os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Efeito de compostos fenólicos na concentração de 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade relativa (%) das endoglucanases presentes em extrato bruto produzido pelo fungo termofílico *M. thermophila* M.7.7.. (*) diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle, pelo teste t de Student para amostras independentes. NR: não realizado.

	10 minutos		24 horas		48 horas	
	%	DP	%	DP	%	DP
Tânico	9,3*	6,1	43,1*	3,8	53,0*	4,0
Cumárico	53,8*	6,6	42,7*	2,7	36,1*	4,0
Gálico	53,3*	3,5	59,6*	2,0	45,8*	3,5
Ferúlico	61,3*	4,8	41,3*	1,3	26,5*	5,8
Hidroxibenzoico	20,4*	6,0	30,7*	2,3	45,0*	6,2
Vanílico	46,2*	6,7	29,8*	3,4	27,7*	4,8
Vanilina	45,8*	4,3	60,4*	0,8	61,0*	2,0
Siringico	56,4*	2,0	57,8*	6,6	59,0*	2,3
Siringaldeido	80,4*	3,4	80,9*	1,5	NR	-
Controle	100,0	4,8	100,0	4,6	100,0	2,4

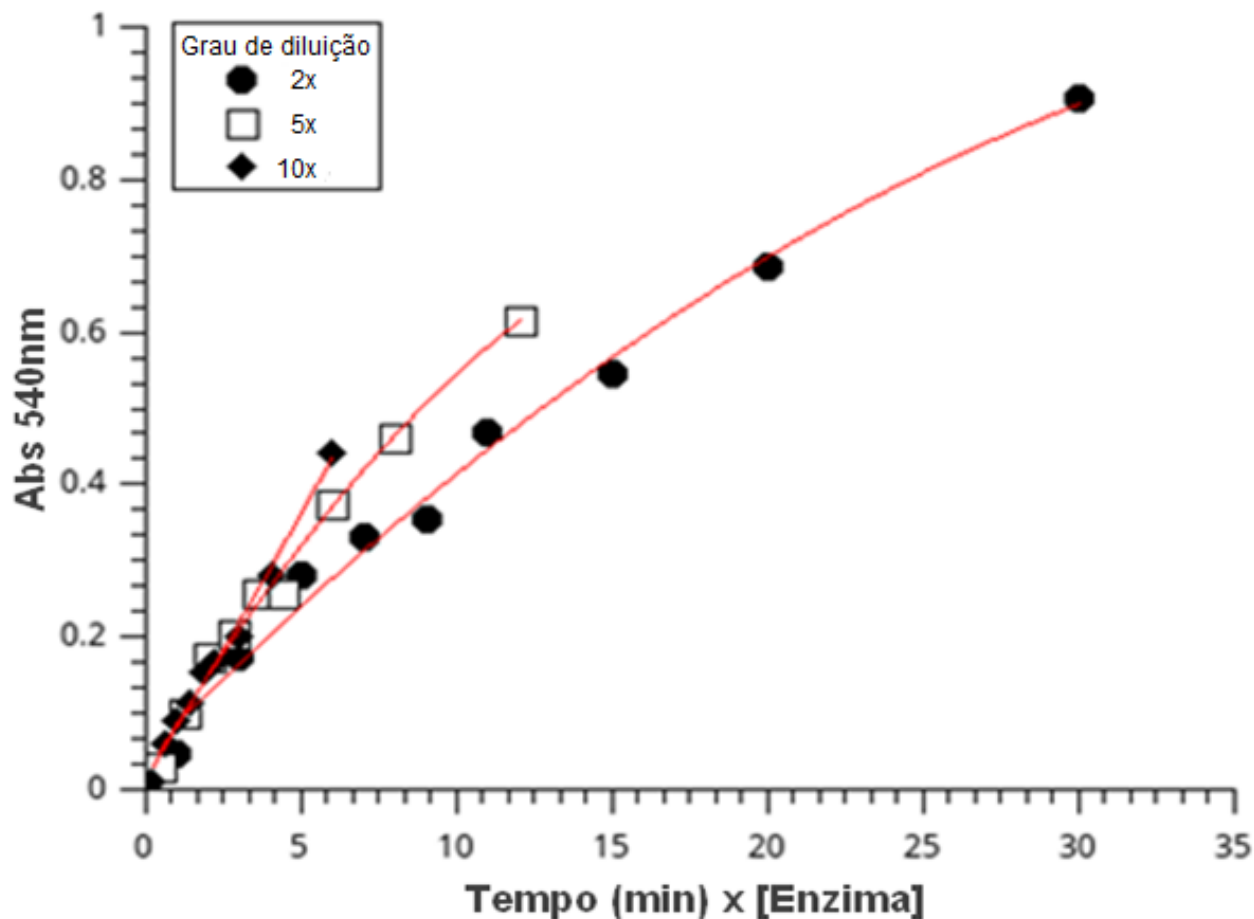
Fonte: A autoria própria.

Todos os compostos fenólicos avaliados em 10 minutos de tratamento diminuíram significativamente os níveis de atividade em comparação ao controle, e os valores se mantiveram menores e significantes que o do controle em todos os tempos de tratamento, porém não aboliram completamente a atividade mesmo após 48 horas.

Em seus estudos, Chierotti e colaboradores constataram que os ácidos gálico, ferúlico e 4-hidroxibenzóico em concentração de 100 mmol L⁻¹ também reduziram muito a atividade da endoglucanase de *R. emersonii* S10 (CHIEROTTI, 2016).

Geralmente as enzimas se apresentam mais instáveis em baixas concentrações do que em concentrações maiores, porém no caso das endoglucanases avaliadas a partir do extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *M. thermophila*, a maior estabilidade se mostrou em maiores diluições (Figura 12). De acordo com Selwyn, isso pode ser explicado por duas causas, primeiro pelo efeito protetor do substrato sobre a enzima, pois em maiores diluições a enzima se encontra com maior superfície de contato com o substrato do que em soluções mais concentradas, segundo pelo efeito inibidor de algum dos produtos da reação sobre as enzimas, seja por inibição competitiva (quando o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima) ou não competitiva (quando o inibidor liga-se a um sítio de ligação da enzima que não seja o sítio ativo) (SELWYN, 1965). Por não conhecermos a concentração das enzimas testadas adotamos o critério de representar a concentração de forma arbitrária; a solução diluída 1:1 (2x) seria 0,5, aquela 1:4 (5x) 0,2, e a mistura 1:9 (10x) seria 0,1. Não foi feita a comparação com a enzima na concentração usada usualmente, porém as diluições testadas mostram claramente o comportamento relatado acima.

Figura 12. Teste de estabilidade de Selwyn para endoglucanases presente em extrato enzimático produzido pelo fungo termofílico *M. thermophila* M.7.7.. As curvas dos diferentes fatores de diluição estão representadas por 2 (●), 5 (□) e 10 (◆). O símbolo representa o valor da média de três réplicas e a linha vertical o desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

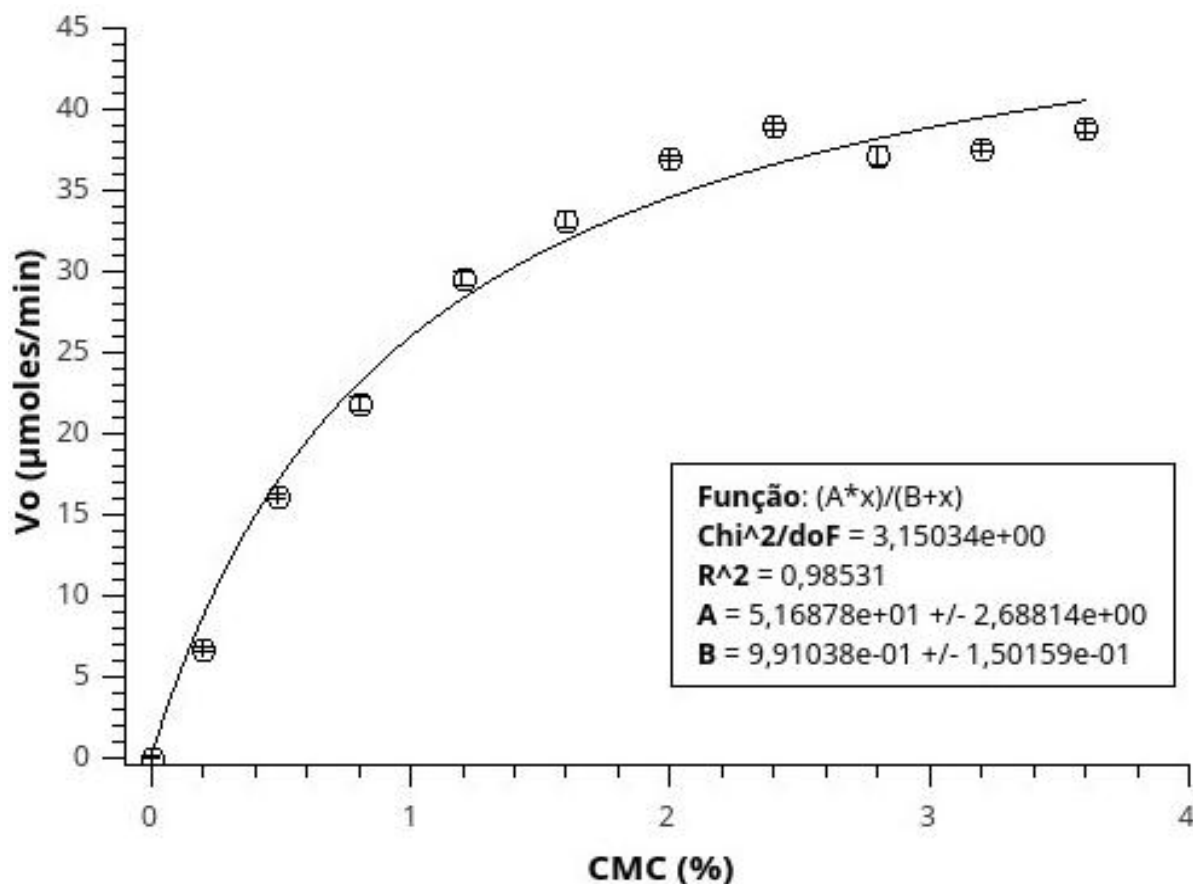
A figura 13 mostra o gráfico de Michaelis-Menten para as EGs do extrato bruto; em decorrência disso as estimativas de parâmetros cinéticos serão consideradas “aparentes” e refletem a atividade da mistura das isoformas. A curva hiperbólica da taxa inicial de reação em função da concentração do substrato CMC representa o melhor ajuste aos pontos experimentais, adotando a equação de Michaelis-Menten. Até 1,8% os pontos se distribuem satisfatoriamente em torno da curva, porém constata-se uma diferença entre os pontos de 2 e 2,5 e valores superiores de concentração de substrato, que apresentam maior viscosidade. Isso sugere que

eventualmente os valores de V_{\max} e K_m seriam superiores aos estimados, pois para o ajuste nenhum ponto foi descartado.

Os valores aparentes estimados foram de $V_{\max} = 51,7 \pm 2,7 \mu\text{mol min}^{-1}$ e $K_m = 0,99 \pm 0,15 \text{ g\% de CMC}$ ($9,9 \text{ mg mL}^{-1}$). O valor da V_{\max} depende da concentração E_t da enzima ($V_{\max} = k_2 \cdot [E_t]$), logo não será comparado com a literatura, e no nosso caso a determinação da concentração de proteínas incluiria todas aquelas presentes no extrato, e não apenas as endoglucanases.

Em termos comparativos, Dave e colaboradores (DAVE; SUDHIR; SUBRAMANIAN, 2015) estimaram um valor de K_m de 37 mg mL^{-1} para endoglucanase de *Thermoascus aurantiacus*. Outras EGs mostram valores inferiores como os $1,74 \text{ mg mL}^{-1}$ da enzima de *Daldinia eschscholzii* e outros superiores, como a EG de *Aspergillus awamori* F18, com K_m de $17,24 \text{ mg mL}^{-1}$ (SINGH et al., 2011).

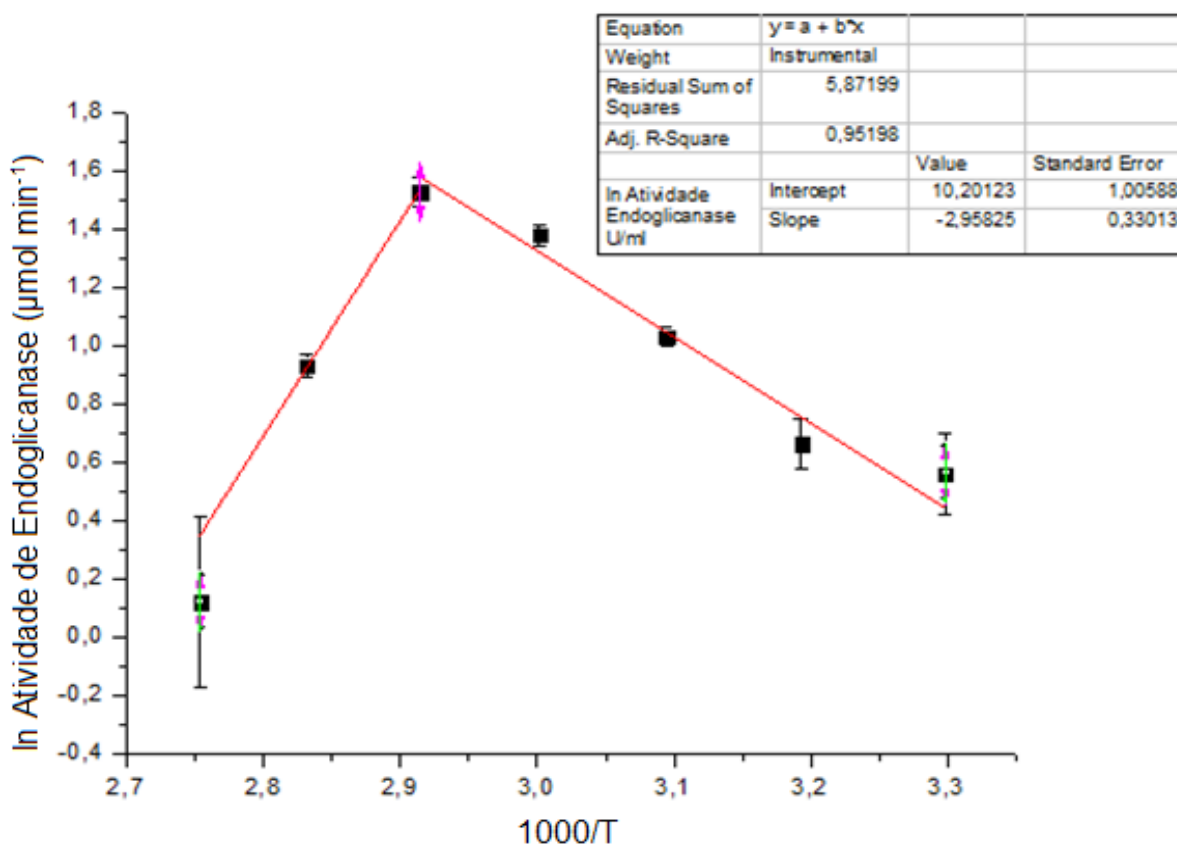
Figura 13. Parâmetros cinéticos aparentes das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7 utilizando substrato CMC a 4% na temperatura e pH ótimos.



Fonte: Autoria própria.

Outro aspecto importante da caracterização de enzimas com potencial utilização em processos industriais ou biotecnológicos constitui a análise dos efeitos da desnaturação térmica. A partir da interseção no eixo x do ponto de encontro entre as porções ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius (\ln da atividade vs. $1000/T$) foi possível calcular a temperatura ótima de catálise enzimática, que no caso das endoglucanases do presente trabalho, foi de 70°C (Figura 14). A energia de ativação da enzima foi calculada em $24,6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Os coeficientes térmicos Q_{10} entre 50 e 70°C estão apresentados na tabela 4.

Figura 14. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7 utilizando substrato CMC a 4%.



Fonte: Autoria própria.

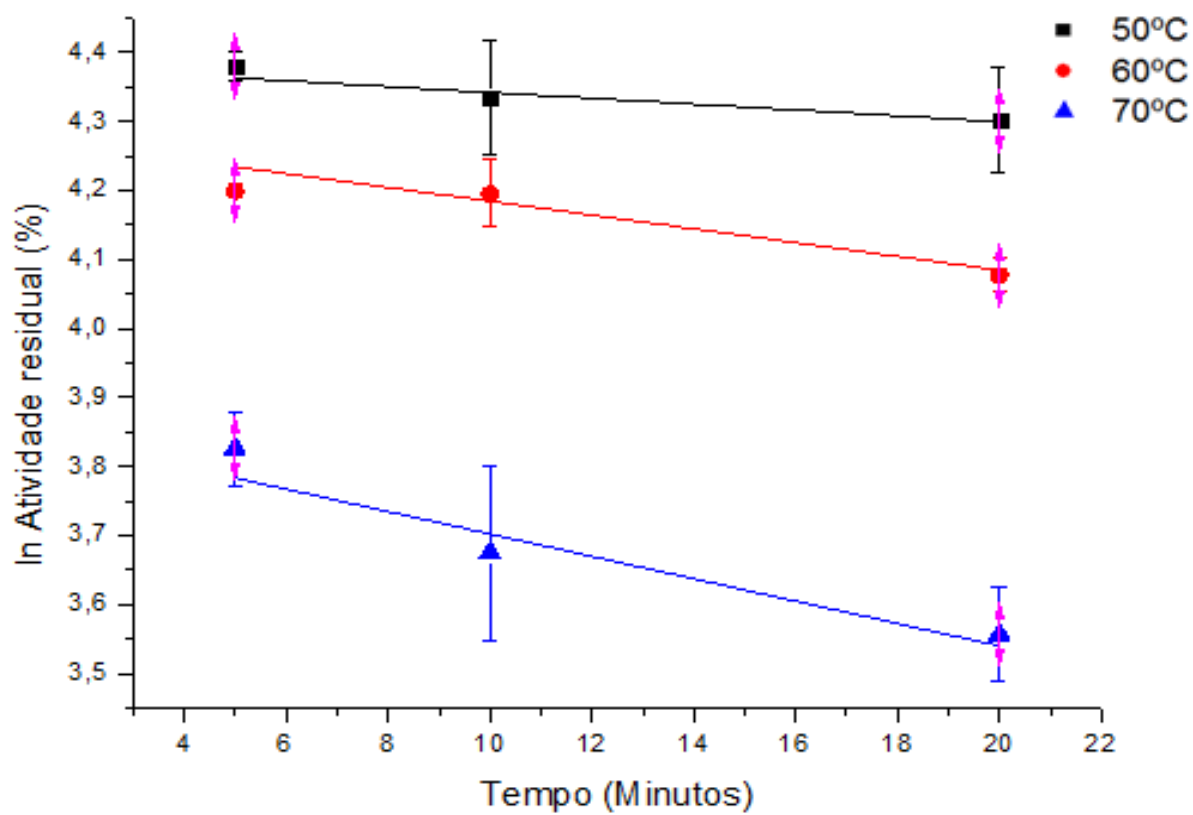
Tabela 4. Coeficientes térmicos (Q_{10}) das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7 utilizando substrato CMC a 4%, estimados com base no Gráfico de Arrhenius.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Q_{10}
50	323,15	1,33
60	333,15	1,31
70	343,15	1,29

Fonte: Autoria própria.

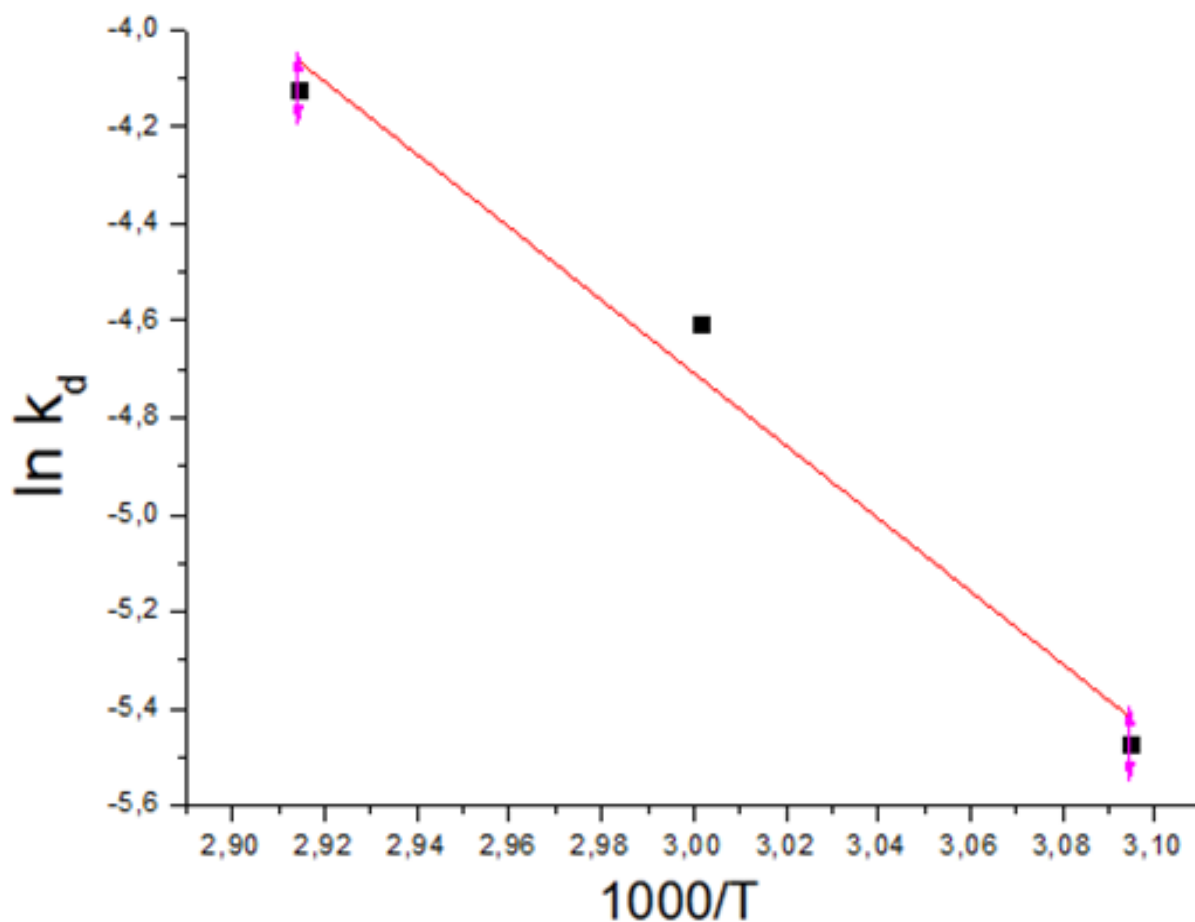
Para as endoglucanases, o Q_{10} estimado nas temperaturas avaliadas diminui com a temperatura, tornando evidente o progressivo efeito desnaturante. A figura 17 representa o efeito da temperatura na desnaturação irreversível, sendo usada para cálculo da constante k_d para cada temperatura.

Figura 15. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade das endoglucanases do extrato bruto.



Fonte: Autoria própria.

Figura 16. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{a_d}) das endoglucanases do extrato bruto de *M. thermophila* M.7.7.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos da termoinativação irreversível das endoglucanases de *M. thermophila* M.7.7.

Temp. (°C)	Temp. (K)	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	ΔH_d (kJ.mol ⁻¹)	ΔG_d (kJ.mol ⁻¹)	ΔS_d (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
50	323,15	0,0042	165	59,8	94,1	-106,2
60	333,15	0,0099	69	59,7	94,7	-105,0
70	343,15	0,0162	42	59,6	96,2	-106,7

Fonte: Autoria própria.

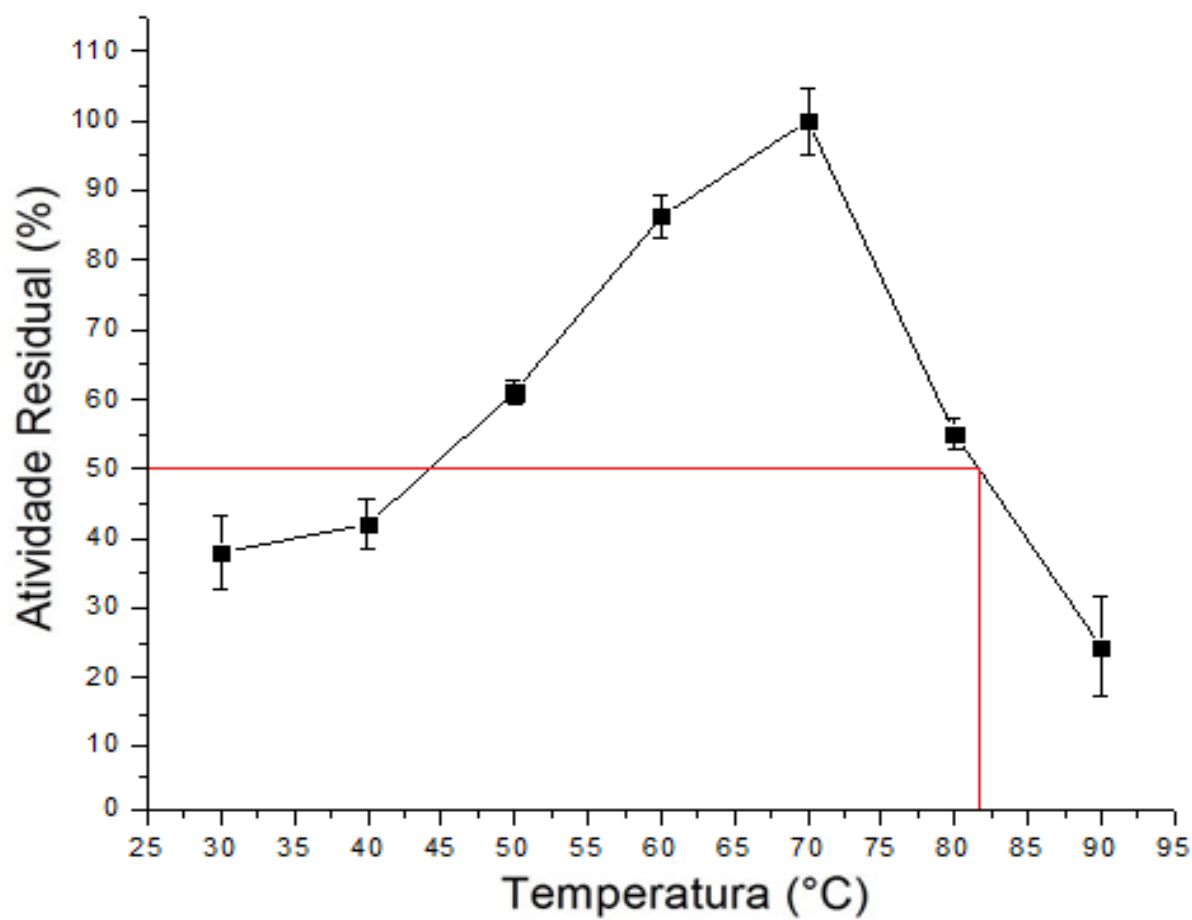
O tempo de meia vida encontrado para as endoglucanases do presente trabalho foi maior em temperaturas menores, sendo que a 50°C são necessárias mais de 2 horas para que a atividade enzimática caia pela metade. A endoglucanase produzida pelo fungo *M. thermophila* BJA (rMt-egl), demonstrou tempo de meia vida de 1 hora em temperatura de 90°C e de 15 minutos na temperatura de 100°C (PHADTARE; JOSHI; SATYANARAYANA, 2017).

A entalpia de ativação da desnaturação térmica (ΔH_d) representa a quantidade de calor envolvida na quebra de 1 mol de ligações não covalentes durante o processo de desnaturação da enzima. No caso das endoglucanases do presente trabalho, esse parâmetro não apresentou variação significativa em relação ao aumento da temperatura, indicando resistência estrutural da enzima frente a variações da mesma.

Os altos valores de energia livre (ΔG_d) com combinações desfavoráveis da variação da entalpia e da entropia confirmam a resistência das endoglucanases em relação à desnaturação térmica, mostrando pequena variação na faixa entre 50 e 70°C. Valores negativos de entropia (ΔS_d) revelam a resistência para que ocorra a reação de desnaturação, fato confirmado pelos valores de energia livre (ΔG_d) encontrados para as endoglucanases, pois com o aumento da temperatura e o enfraquecimento das interações polares, as interações hidrofóbicas são fortalecidas (SIDDIQUI et al., 1997) garantindo resistência da enzima à desnaturação.

Avaliou-se também a temperatura de fusão apresentada pelas endoglucanases, como mostrado na figura 19. A temperatura de fusão é considerada a temperatura na qual a atividade da enzima cai pela metade do seu máximo, na faixa de desnaturação térmica. No caso das endoglucanases, o máximo de atividade se deu em 70°C, e caiu para 50% desse valor em pouco mais de 80°C, sendo essa a temperatura de fusão da enzima.

Figura 17. Temperatura de fusão das endoglucanases de *M. thermophila* M.7.7.



Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÕES

Com este trabalho de caracterização do extrato enzimático bruto e das enzimas isoladas, foi possível identificar que o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7 produziu sete endoglucanases detectáveis por zimografia que analisadas em conjunto possuem pH ótimo de reação em 5,5 e estabilidade em pH 6,0. Com relação à temperatura, os melhores níveis de atividade enzimática foram detectados a 70°C, mesmo nas enzimas isoladas. O isolamento das enzimas mostrou grandes dificuldades, e a opção mais adequada seria a utilização do extrato enzimático, eventualmente com purificação parcial.

Avaliaram-se os parâmetros termodinâmicos do extrato enzimático bruto, que demonstrou mais de 2 horas a 50°C como tempo de meia vida, e elevada resistência estrutural à desnaturação térmica quando avaliados os resultados de entropia, energia de ativação e entalpia. Por outro lado, embora os compostos fenólicos testados tenham promovido diminuição da atividade enzimática, nenhum foi capaz de anulá-la, mesmo após exposição durante 48 horas.

Os testes demonstraram potencial de aplicabilidade destas enzimas pela indústria, pois conseguem ter sua ação preservada em temperaturas de até 70°C na ausência de substrato por mais de 20 minutos, e serem estáveis em uma faixa de pH próxima à neutralidade.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, J. P.; BISPO, A. S. R.; MARBACH, P. A. S.; NASCIMENTO, R. P. Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma sp.* IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

ANDREINI, C.; BERTINI, I.; CAVALLARO, G.; HOLLIDAY, G. L.; THORNTON, J. M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.13, p. 1205-2018, 2008.

APPLICHEM. **Biological Buffers**. APPLICHEM: 18 p. 2008.

BAUDUIN, P.; RENONCOURT, A.; TOURAND, D.; KUNZ, W.; NINHAM, B. W. Hofmeister effect on enzymatic catalysis and colloidal structures. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Oxford, v. 9, n. 1/2, p. 43-47, 2004.

BHAIRI, S. M.; MOHAN, C. Detergents: a guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. **San Diego: Calbiochem**, 2007. (**EMD Biosciences**, v. 200).

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, p. 41-55, 2014.

BHUYAN, A. K. On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. **Biopolymers**, v. 93, p. 186–199, 2010.

CANILHA, L.; RODRIGUES, R. C. L. B.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; FELIPE, M. D. G. A. et al. Bioconversion of hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: techniques, applications and commercialization**. p. 15-45, 2013.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; DA SILVA, R.; THOMÉO, J. C. pH e temperatura ótimos para atividade endoglucanase de fungos em cultivo sólido. **20. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, v. 1., n. 2. 2015

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

CHIEROTTI, M. C. M., **Caracterização de uma endoglucanase termoestável do fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* S10**. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2016.

CHONG, B. F.; HARRISON, M. D.; O'HARA, I. M. Stability of endoglucanases from mesophilic fungus and thermophilic bacterium in acidified polyols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 61-62, p. 55-60, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's Food Chemistry**. 4ª edição, CRC Press, 2007.

DA SILVA, V. C. T.; COTO, A. L. S.; SOUZA, R. C.; NEVES, M. B. S.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Effect of pH, temperature, and chemicals on the endoglucanases and β -glicosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4: obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochemistry Research International**, New York, v. 2016, p. 1-9, 2016.

DAVE, B. R.; SUDHIR, A. P.; SUBRAMANIAN, R. B. Purification and properties of an endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus*. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 85–90, 2015.

DENNISON, C. **A guide to protein isolation**. London. Springer Netherlands, 2003.

DI CERA, E. Thrombin. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 4, p. 203–254, 2008.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; DE REZENDE, S. T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 166, n. 6, p. 1586–1603, 2012.

FONSECA, L. C.; CORREA, N. C. R.; GARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, n. 3., p. 543-548, 2006.

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, New York, v. 463, p. 497-513, 2009.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures? **Biochemistry**, v.20, p. 4667-4676, 1981.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; OLIVEIRA, M. M.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P.; COELHO, R. R. Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 4, p. 1373–1385, 2013.

HARRIS, T. K.; DAVIDSON, V.L. Replacement of enzyme-bound calcium with strontium alters the kinetic properties of methanol dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 300, p. 175–182, 1994.

HEIDORNE, F. O.; MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A. L.; MILAGRES, A. M. F. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, 38, p. 436–442, 2006.

IPCC. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. **Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. In: (Ed.). **Physiology of Biodegradative Microorganisms**: Springer, p.163-176, 1991.

JOHN, R. A. Photometric assays. In: **Enzyme assays: a practical approach**. pp. 59–92. Eisenthal, R.; Danson, J. (Eds.) IRL Press, 2002.

KALOGERIS, E. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, London, 38, p. 1099 - 1104, 2003.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; SAINI, H. S. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**, Essex, 98 p. 74–81, 2007.

LIAO, H.; XU, C.; TAN, S.; WEI, Z.; LING, N.; YU, G.; RAZA, W.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, Essex, v. 123, p. 117-124, 2012.

MENDONÇA, F. Aquecimento global e saúde: uma perspectiva geográfica–notas introdutórias. **Terra Livre**, v. 1, n. 20, p. 205-221, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, p. 1062-1071, 2012.

MORETTI, M. M. S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2010.

NAIKA, G. S.; PRAKASH, V.; TIKU, P. K. Effect of Cosolvents on the Structural Stability of Endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p.10450–10456, 2009.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (NC-IUB). Units of enzyme activity. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 97, n. 2, p. 319-320, 1979.

PHADTARE, P.; JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Recombinant thermo-alkali-stable endoglucanase of *Myceliophthora thermophila* BJA (rMt-egl): biochemical characteristics and applicability in enzymatic saccharification of agro-residues.

International Journal of Biological Macromolecules, Guildford, v. 104, p. 107-116, 2017.

PICART, P.; DIAZ, P.; PASTOR, F. I. Cellulases from two *Penicillium sp.* strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 108–113, 2007.

POLIZELI, M. L.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; DA SILVA, T. M.; MALLER, A.; CABRAL, H. Gel electrophoresis for investigating enzymes with biotechnological application. In: MAGDELDIN, S. (Ed.). **Gel electrophoresis: advanced techniques**. Intech, 2012. p.97-110.

POLIZELLI, P. P.; FACCHINI, F. D.; CABRAL, H.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. A new lipase isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (*Bombacaceae*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 150, n. 3, p. 233-242, 2008.

POLIZELLI, P. P.; FACCHINI, F. D.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Stability of a lipase extracted from seeds of *Pachira aquatica* in commercial detergents and application tests in poultry wastewater pretreatment and fat particle hydrolysis. **Enzyme Research**, New York, v. 2013, p. 1-6, 2013.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia Química

RHODES, D. G.; BOSSIO, R. E.; LAUE, T. M. Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. **Methods in Enzymology**, New York, v. 463, p. 691-723, 2009.

ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. Catálise Enzimática: Transesterificação do Óleo de Soja e Esterificação do Ácido Oleico via Lipases. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, 2015.

ROY, S. K.; DEY, S. K.; RAHA, S. K.; CHAKRABARTY, S. L. Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14

(ATCC 48104). **Journal of General Microbiology**, London, v. 136, p. 1967-1971, 1990.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, London, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SAQIB, A. A. N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. U.; HAYAT, U.; SHAHJAHAN, B. A Thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, New York, v. 2012, p. 196853, 2012.

SCIUTO, D. L. **Produção de holocelulases por *Clonostachys byssicola* cultivado em casca de soja**: purificação parcial e caracterização de uma endoglucanase. 2015. Mestrado em Biologia Microbiana Universidade de Brasília.

SEE, Y. P.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weight of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: Creighton T. E. (Ed.): **Protein structure**: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1990. p.1-22.

SELWYN, M. J. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. **Biochimica et Biophysica Acta**: enzymology and biological oxidation, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 193-195, 1965.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin Impact on Fiber Degradation. 3. Reversal of Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Chemical Modification of Lignin and by Additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 45 (5), 1823-1828, 1997.

SIDDIQUI, K.; SAQIB, A. A. N.; RASHID, M. H.; RAJOKA, M. I. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 19, n. 4, p. 325-330, 1997.

SINGH, S.; SHUKLA, L.; KHARE, S.; NAIN, L. Detection and Characterization of New thermostable endoglucanase from *Aspergillus awamori* Strain F18. **Journal of mycology and plant pathology**, v. 41, p. 97-103, 2011.

STUTZENBERGER, F.; LUPO, D. pH-dependent thermal activation of endo-1,4- β -glucanase in *Thermomonospora curvata*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 205-208, 1986.

SUN, X.; LIU, Z.; QU, Y.; LI, X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 146, n. 1, p. 119-128, 2008.

TALIAN, I.; KOVÁČOVÁ, V.; PETROVIČ, M.; SABO, J. Impact of un-polymerized acrylamide monomer residues onto protein identification by MALDI TOF MS. **Central European Journal of Chemistry**, v.10, n. 4., p. 1073-1078, 2012.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. **Applied Environmental Microbiology** 76, 7673–7682, 2010.

TERRASAN, C. R. F.; GUISAN, J. M.; CARMONA, E. C. Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: purification, characterization and hydrolysis of substrates. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 23, p. 54-62, 2016.

VIANA, Y. A.; GARROTE FILHO, M. D. S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 2, 2006.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura do autor