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

MARIA CECILIA MAIA CHIEROTTI

CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENDOGLUCANASE TERMOESTÁVEL DO FUNGO TERMOFÍLICO *Rasamsonia emersonii* S10

São José do Rio Preto

2016

MARIA CECILIA MAIA CHIEROTTI

CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENDOGLUCANASE TERMOESTÁVEL DO FUNGO TERMOFÍLICO *Rasamsonia emersonii* S10

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", Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profª. Drª. Eleni Gomes

Co-orientadora: Dra. Marcia Maria de Souza Moretti

São José do Rio Preto

2016

Chierotti, Maria Cecilia Maia.
Caracterização de uma endoglucanase termoestável do fungo termofílico Rasamsonia emersonii S10 / Maria Cecilia Maia Chierotti. -- São José do Rio Preto, 2016
119 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes
Coorientador: Marcia Maria de Souza Moretti
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos - Aplicações industriais. 3. Enzimas de fungos - Purificação. 4. Fungos termofílicos. 5. Celulase. 6. Termodinâmica. I. Gomes, Eleni. II. Moretti, Marcia Maria de Souza. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663.15

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

MARIA CECILIA MAIA CHIEROTTI

CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENDOGLUCANASE TERMOESTÁVEL DO FUNGO TERMOFÍLICO *Rasamsonia emersonii* S10

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", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Eleni Gomes

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Profª. Dra. Márcia J. Rossini Mutton

UNESP – Jaboticabal

Prof. Gustavo O. Bonilla Rodriguez

UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

08 de julho de 2016

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas condições e boas oportunidades para a realização deste projeto.

À Profª. Drª. Eleni Gomes, agradeço pela orientação, pela experiência compartilhada, pelos conselhos, amizade e principalmente pela oportunidade oferecida.

À minha co-orientadora Marcia Maria de Souza Moretti pela ajuda na elaboração e desenvolvimento deste projeto. Pela paciência, ensinamentos teóricos, práticos e morais que levarei para sempre.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Sonia e José, pelo amor incondicional, pelo brilho no olhar ao ver meu progresso e por não medir esforços para que esta fase, assim como outras já vividas, se concluísse da melhor forma.

À minha irmã, melhor amiga e companheira, pelo apoio, tanto nas horas boas quanto nas difíceis e por não ter perdido o espírito de paz e esperança de quando era criança.

Aos meus avós Esterina e Antônio pela fé, confiança, ajuda e amor que me deram desde que nasci.

Ao meu namorado Lucas, pelo olhar atencioso, calmo e amoroso quando eu era tempestade.

À minha amiga e colaboradora Angélica por todos os ensinamentos sobre purificação, obrigada pela paciência e carinho. Também ao meu amigo Pedro Lucas, que me ensinou que amizade entre homem e mulher pode ser verdadeira, e assim, tornou-se um irmão.

Aos amigos de laboratório Josiane Scarpassa, Josiani Pereira, Diego, Isabel, Carolina Bezerra, Ariane, Carolina Santos, Emily, Erik, José Erick, Bruna e Lucas Trindade, obrigada pela amizade.

Aos Professores Doutores Roberto da Silva e Gustavo O. B. Rodriguez pelo conhecimento compartilhado no exame de qualificação, materiais fornecidos e dúvidas esclarecidas durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

A todos vocês, meu muito obrigada!

RESUMO

Um dos interesses biotecnológicos e econômicos da atualidade é otimizar o emprego da biomassa em processos industriais mediado por biocatalisadores, como as enzimas. O objetivo do presente trabalho foi purificar e caracterizar uma endoglucanase produzida pelo fungo *Rasamsonia emersonii* S10, em fermentação em estado sólido, tendo como substrato resíduos lignocelulósicos. A partir de solução enzimática bruta detectou-se 2 isoformas da enzima, com massas moleculares de 45 e 60 kDa, sendo escolhida a primeira para ser purificada. A solução foi clarificada em carvão ativado e concentrada por ultrafiltração tangencial. A endoglucanase foi purificada em coluna cromatográfica iônica e de exclusão molecular, intermediada por diálise. O processo levou a um fator de purificação de 6,7 e rendimento de 8,8%. A enzima apresentou temperatura ótima de 85,3 ºC e pH 4,0. Ativação foi evidenciada quando a enzima foi mantida de 40 até 60 ºC. A enzima foi estável, quando mantida em temperaturas de 65 a 80 ºC e faixa de pH entre 6 e 7,5. Estudo do efeito de íons e compostos orgânicos revelaram ativação em presença de $MnCl_2$ e inibição por $HgCl_2$ e ácido 4-hidroxibenzóico e 5-hidroximetilfurfural. A enzima mostrou afinidade por CMC, porém também foi capaz de hidrolisar Avicel®. A CMCase exibiu *Km* de 3,53 $mg.mL^{-1}$ e *Vmax* de 2,86 µmol/min.mL. Os parâmetros termodinâmicos indicaram uma endoglucanase estável a altas temperaturas, com tempo de meia vida de 355 min a 40 ºC e temperatura de fusão em 89 ºC.

Palavras-chave: celulase; endoglucanase; *Rasamsonia emersonii*; termoestabilidade.

ABSTRACT

Nowadays, one of the technological and economic interests is to optimize the use of biomass in industrial processes mediated by biocatalysts such as enzymes. The objective of this study was to purify and characterize an endoglucanase produced by the fungus Rasamsonia emersonii S10 in solid state fermentation, as substrate lignocellulosic residues. From the crude enzyme solution was detected 2 isoform of the enzyme, with a molecular weight of 45 kDa and 60, the first being chosen to be purified. The solution was clarified by activated carbon and concentrated by tangential ultrafiltration. The endoglucanase was purified by ion chromatographic and molecular exclusion mediated by dialysis. The process led to a purification factor of 6.7 and 8.8% yield. The enzyme showed optimum temperature of 85.3 °C and pH 4.0. Activation was observed when the enzyme was maintained at 40 to 60 °C. The enzyme was stable when maintained at temperatures 65-80 °C and pH between 6 and 7.5. Study of the effect of ions and organic compounds showed activation in the presence of $MnCl_2$ and $HgCl_2$ inhibition and 4-hydroxybenzoic acid and 5-hydroxymethylfurfural. The enzyme showed affinity for CMC, but was also able to hydrolyze Avicel®. The CMCase exhibited Km 3.53 mg.mL^{-1} and Vmax of 2.86 mmol/min.mL^{-1}. The thermodynamic parameters indicated endoglucanase stable at high temperatures, with half-life of 355 min at 40 °C and the melting temperature at 89 °C.

Keywords: cellulase; endoglucanase; Rasamsonia emersonii; thermostability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular da celulose	**20**
Figura 2	Estrutura dos principais componentes moleculares da hemicelulose e da estrutura do polímero	**21**
Figura 3	Representação molecular parcial da lignina	**22**
Figura 4	Sistema de funcionamento de uma biorrefinaria	**24**
Figura 5	Esquema representando a atuação de celulases sobre o polímero de celulose liberando monômeros de glicose	**32**
Figura 6	Curvas de Boltzmann. Na temperatura mais alta (em verde) há mais moléculas com energia cinética *E* do que na temperatura mais baixa (em azul)	**34**
Figura 7	Desenvolvimento de celulases na ciência e tecnologia	**40**
Figura 8	Representação do fungo *R. emersonii* S10: (a) em placa de Petri cultivado em meio de aveia e (b) por micrografia de seu esporângio e esporos em microscópio fotômico binocular (LeicaICC 50) – 40x	**46**
Figura 9	Estratégia de purificação com as amostras de endoglucanase em tubos de 5 mL com resina de troca aniônica Q-Sepharose® Fast Flow (Sigma-Aldrich)	**53**
Figura 10	Atividade enzimática total das soluções enzimáticas obtidas por diferentes condições de extração. ▥10:1 água/material fermentado ($mL.g^{-1}$) e 30 min de agitação; ▩ 10:1 água/ material fermentado ($mL.g^{-1}$) e 120 min de agitação; ▭ 30:1 água/ material fermentado ($mL.g^{-1}$) e 30 min de agitação; ▨ 30:1 água/ material fermentado ($mL.g^{-1}$) e 120 min de agitação; a – primeiro ciclo de extração; b – segundo ciclo; c – terceiro ciclo	**61**
Figura 11	Perfis de bandas eletroforéticas referentes a endoglucanases presentes na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *R. emersonii* S10 em FES utilizando mistura (1:1:1) de farelo de trigo, palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar por 240h. Esquerda: Gel SDS-PAGE 10% com visualização das bandas de proteínas reveladas pelo método de prata. Direita: Zimograma específico para detecção de atividade de endoglucanase em gel 10% mostrando duas isoformas da enzima de estudo (setas)	**63**
Figura 12	Efeito da clarificação da sol enz bruta**.** a) Diferença de coloração e turbidez entre a sol enzi bruta não tratada (a esquerda) e a amostra tratada com carvão ativado em coluna (direita). b) Bandas eletroforéticas referentes	**65**

a sol enz bruta (EB) e após o tratamento com carvão ativado em coluna (EF). M– marcador de peso molecular

Figura 13 Perfil de atividade enzimática dos eluatos obtidos de minicolunas de resina Q-Sepharose Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH **67**

Figura 14 Perfis eletroforéticos dos eluatos obtidos de minicolunas de resina Q-Sepharose Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH de testes. M – marcador de peso molecular; EB – solução enzimática bruta; seta – endoglucanase **67**

Figura 15 Perfil de atividade enzimática das alíquotas dos sobrenadantes frente ao gradiente salino com NaCl (0,02 a 1 M) usado para eluição da endoglucanase da coluna com resina Q-Sepharose Fast Flow **68**

Figura 16 Gel SDS-PAGE ilustrando a etapa de eluição da proteína da resina Q-Sepharose Fast Flow no teste de purificação em pequena escala frente a simulação de gradiente salino linear com NaCl (0,02 a 1 M). M – marcador de peso molecular; EB – solução enzimática bruta; seta – edoglucanase **69**

Figura 17 Cromatograma da purificação de uma isoforma da enzima endoglucanase de *R. emersonii* S10 por troca aniônica com resina Q-Sepharose Fast Flow realizada em sistema FPLC Äkta Purifier (GE Helthcare Life Sciences). Seta – representa o pico em que a proteína de interesse foi detectada **71**

Figura 18 Gel SDS-PAGE das amostras provenientes das frações eluídas de coluna cromatográfica de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow com atividade detectadas. Setas e caixas verdes (A) e pretas (B) – apontam para a separação das amostras, as quais foram posteriormente dialisadas, separadamente, de acordo com o perfil de contaminação detectado **72**

Figura 19 Cromatograma obtido por cromatografia de exclusão molecular realizada em sistema FPLC Äkta Purifier (GE Helthcare Life Sciences) usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR da da amostra A, da isoforma da enzima endoglucanase de *R. emersonii* S10. Seta – representa o pico em que a proteína de interesse foi detectada **73**

Figura 20 Pico cromatográfico e bandas eletroforéticas das frações com atividade de endoglucanase em cromatografia por exclusão molecular usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR - amostra A, e análise em **73**

gel SDS-PAGE das frações eluídas. Seta – indicando a proteína purificada; os números indicam os tubos em que as amostras foram coletadas

Figura 21 Picos das frações em cromatografia de exclusão molecular em sistema FPLC, usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR – amostra B. Seta – representa o pico em que a proteína de interesse foi detectada **74**

Figura 22 Pico cromatográfico e bandas eletroforéticas das frações com atividade de endoglucanase, cromatografia por exclusão molecular usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR - amostra B. Seta – indicando a proteína purificada; os números indicam os tubos em que as amostrasforam coletadas **75**

Figura 23 Efeitos das diferentes concentrações de tampão (25, 50 e 100 mM) na atividade de endoglucanase purificada **77**

Figura 24 Efeito da temperatura de armazenamento durante 24 h sobre a atividade da endoglucanase de *R. emersonii* S10 purificada **78**

Figura 25 Efeito do tempo de estocagem da endoglucanase de *R. emersonii* S10 purificada em temperatura ambiente (aproximadamente 24 ºC) **79**

Figura 26 Influência do tempo de reação (0, 2, 5, 10 e 15 min) na atividade enzimática da endoglucanase purificada de *R. emersonii* S10 **80**

Figura 27 Efeito do pH (3 a 10,5) sobre a atividade da endoglucanase purificada, com reação enzimática realizada a 80 ºC, utilizando tampão acetato de sódio (pH 3 – 5,5), MES (pH 6 e 6,5), HEPES (pH 7 e 7,5), glicina (pH 8 – 9,5) e CAPS (pH 10 e 10,5) acrescido de CMC a 4% **81**

Figura 28 Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da endoglucanase da isoforma purificada. A reação ocorreu em pH 4,0, utilizando tampão acetato de sódio a 50 mM, contendo 4% de CMC, por 10 min **82**

Figura 29 Efeito do pH sobre a estabilidade da endoglucanase purificada quando em ausência de substrato **84**

Figura 30 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da endoglucanase purificada quando em ausência de substrato com atividade enzimática determinada a 60 ºC (a) e 85 ºC (b) e mantida a diferentes temperaturas durante 1 h **86**

Figura 31 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da endoglucanase purificada quando em ausência de substrato e em presença de íons Hg^{2+} (1 mM). A **88**

enzima foi mantida nas diferentes temperaturas por 1h e a atividade residual determinadas a 85 ºC

Figura 32 Curva de Michaelis-Menten da enfoglucanase purificada utilizando como substrato a CMC **95**

Figura 33 Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (Ea) e temperatura ótima da endoglucanase purificada **97**

Figura 34 Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da endoglucanase purificada: 40 ºC (■), 80 ºC (●) e 90 ºC (▲) **98**

Figura 35 Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (Ead) da endoglucanase purificada **99**

Figura 36 Gráfico apresentando a temperatura de fusão Tm (*melting temperature*) da endoglucanase purificada **101**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos microrganismos de acordo com sua temperatura ótima de crescimento	**26**
Tabela 2	Principais diferenças entre as hidrólises ácida e enzimática	**30**
Tabela 3	Dados explicativos do experimento de extração	**49**
Tabela 4	Clarificação da solução enzimática bruta usando caulim, carvão ativado e PEI, em pH 7	**64**
Tabela 5	Síntese do processo de purificação de uma isoforma de endoglucanase de *R. emersonii* S10	**75**
Tabela 6	Efeito de íons, detergentes, quelantes e agentes desnaturantes sobre a atividade da endoglucanase de *R. emersonii* S10. A atividade foi determinada em pH 4,0, a 85 ºC, por 10 min	**90**
Tabela 7	Efeito de compostos orgânicos sobre a atividade da endoglucanase de *R. emersonii* S10. A atividade foi determinada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, a 85 ºC, por 10 min.	**92**
Tabela 8	Especificidade da isoforma purificada em relação aos substratos	**97**
Tabela 9	Coeficiente de temperatura (Q_{10}) estimado com base no Gráfico de Arrhenius	**93**
Tabela 10	Parâmetros termodinâmicos da termoinativação irreversível da endoglucanase purificada	**99**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta \mathbf{G_d}$	Variação da energia livre de Gibbs da desnaturação térmica irreversível
$\Delta \mathbf{H_d}$	Variação de entalpia da desnaturação térmica irreversível
$\Delta \mathbf{S_d}$	Variação de entropia da desnaturação térmica irreversível
CAPS	Tampão ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfônico
CMC	Carboximetilcelulose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido Dinitrossalicílico
Ea	Energia de ativação da enzima
$\mathbf{Ea_{(d)}}$	Energia de ativação para desnaturação irreversível
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
$\boldsymbol{h}$	Constante de Planck ($6{,}63 \times 10^{-34}$ J.s)
HEPES	Tampão ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanossulfónico
$\boldsymbol{k_b}$	Constante de Boltzmann ($1{,}38 \times 10^{-23}$ J.K^{-1})
$\boldsymbol{k_d}$	Constante de primeira ordem da taxa de reação da inativação térmica
MES	Tampão ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
NMWC	*Nominal Molecular Weight Cutoff*
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pNPG	p-*nitro*-fenil-β-D-glicopiranosídeo
pNPX	p-*nitro*-fenil-β-D-xilopiranosídeo
$\mathbf{Q_{10}}$	Coeficiente térmico
$\boldsymbol{R}$	Constante universal dos gases (8,314 J.mol^{-1} K^{-1})
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de SDS
T	Temperatura absoluta em Kelvin
t½	Tempo de meia vida (em minutos)
TRIS	Tampão Tris (hidroximetil) aminometano
UV-VIS	Ultravioleta-visível

Sumário

1. INTRODUÇÃO **17**
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **19**
2.1. Biomassa lignocelulósica **19**
2.1.1. Celulose **19**
2.1.2. Hemicelulose **20**
2.1.3. Lignina **22**
2.2. Aproveitamento da biomassa lignocelulósica **23**
2.3. Cultivo de microrganismos em substrato sólido **25**
2.4. Microrganismos termofílicos **26**
2.4.1. Fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* **28**
2.5. Hidrólise enzimática **29**
2.6. Enzimas do complexo celulolítico **30**
2.6.1. Endoglucanases **31**
2.6.2. Celobiohidrolases **32**
2.6.3. B-glicosidases **33**
2.7. Enzimas termofílicas **33**
2.8. Aplicação de celulases **39**
3. OBJETIVOS **45**

Objetivo geral **45**

Objetivos específicos **45**

4. MATERIAL E MÉTODOS **46**
4.1. Microrganismo e cultivo **46**
4.2. Produção da enzima por cultivo em estado sólido **46**
4.3. Dosagem da atividade de endoglucanase **47**
4.4. Teste de extração da enzima endoglucanase **48**
4.5. Teste de clarificação da solução enzimática bruta em pequena escala **49**
4.6. Ensaios de eletroforese **50**
4.7. Determinação dos teores de proteínas totais **51**
4.8. Purificação da endoglucanase **51**
4.8.1. Clarificação da solução enzimática bruta **51**
4.8.2. Ultrafiltração tangencial da solução enzimática **51**
4.8.3. Ensaios preliminares de purificação em pequena escala **52**
4.8.4. Cromatografia líquida por troca aniônica **53**
4.8.5. Diálise das frações da enzima **54**
4.8.6. Cromatografia líquida por exclusão molecular – Gel filtração **54**
4.9. Caracterização da endoglucanase **54**
4.9.1. Determinação da molaridade de tampão mais adequada para a dosagem de atividade da enzima **54**
4.9.2. Determinação da melhor condição de armazenamento da enzima **55**
4.9.3. Determinação do tempo apropriado para reação **55**

de endoglucanase
4.9.4. Tempo de estabilidade em temperatura ambiente **55**
4.9.5. Caracterização bioquímica da endoglucanase de *R. emersonii* S10 **55**
4.9.5.1. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima **55**
4.9.5.2. Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato **56**
4.9.5.3. Efeito de íon, solventes, detergentes e quelantes sobre a atividade de endoglucanase **57**
4.9.5.4. Efeito de compostos orgânicos sobre a atividade da enzima **57**
4.9.5.5. Especificidade pelo substrato e parâmetros cinéticos **58**
4.9.5.6. Termodinâmica da termoinativação irreversível **58**
4.9.5.7. Caracterização quanto à temperatura ótima, cálculo de Ea e Q_{10} **58**
4.9.5.8. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível **59**
4.9.5.8.1. Determinação do k_d **59**
4.9.5.8.2. Tempo de meia vida t½ **60**
4.9.5.8.3. Energia de ativação da desnaturação térmica Ea_d ($KJ.mol^{-1}$) **60**
4.9.5.8.4. Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_d ($KJ.mol^{-1}$) **60**
4.9.5.8.5. Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_d ($KJ.mol^{-1}$) **60**
4.9.5.8.6. Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_d ($J.mol^{-1}$) **60**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **61**
5.1. Teste de extração da enzima endoglucanase **61**
5.2. Análise eletroforética de endoglucanase na solução enzimática bruta **63**
5.3. Teste de clarificação da solução enzimática bruta **64**
5.4. Estratégia de purificação em ensaios em pequena escala **66**
5.5. Purificação da isoforma selecionada da enzima endoglucanase **69**
5.5.1. Cromatografia líquida por troca iônica – Troca aniônica **69**
5.5.2. Cromatografia líquida por exclusão molecular **72**
5.6. Definição de parâmetros apropriados para a determinação de atividade da endoglucanase purificada da amostra A **76**

5.6.1. Concentração (molaridade) adequada do tampão **76**
5.6.2. Avaliação do efeito do armazenamento em diferentes temperaturas sobre a atividade da enzima **77**
5.6.3. Avaliação do tempo de preservação da atividade da enzima quando mantida em temperatura ambiente **78**
5.6.4. Tempo de reação enzimática da endoglucanase **80**
5.7. Caracterização bioquímica da endoglucanase de *R. emersonii* S10 **81**
5.7.1. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima **81**
5.7.2. Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato **83**
5.8. Efeitos de íons, solvente, detergentes e quelantes sobre a atividade de endoglucanase **89**
5.9. Efeito de alguns compostos orgânicos derivados de biomassa lignocelulósica sobre a atividade da endoglucanase **91**
5.10. Especificidade da endoglucanase por substratos e parâmetros cinéticos **93**
5.11. Estudos termodinâmicos coma enzima purificada **96**
6. CONCLUSÕES **102**
Referências Bibliográficas **103**

1. INTRODUÇÃO

Um dos interesses biotecnológicos e econômicos da atualidade é otimizar o emprego da biomassa em processos industriais para obtenção de produtos com alto valor agregado utilizando biocatalisadores. Áreas como de alimentos, farmacêutica, energia e plataformas de produtos químicos estão intensificando cada vez mais o uso desse processo. Entretanto, é no setor energético que o aproveitamento da biomassa tem sido mais representativo, em substituição aos materiais de origem fóssil.

As questões políticas regionais e internacionais tornaram o comércio e oferta desses produtos não renováveis em pontos de conflito, gerando insegurança aos países que concentram dependência energética nesses produtos.

Outro aspecto é a natureza recalcitrante desse tipo de produto e seus derivados no meio ambiente gerando problemas de poluição dos solos, água, chuvas ácidas e outros problemas à saúde humana e do ambiente, além de não se tratar de um agente cíclico no ambiente.

Em função desses fatos, a fonte de energia fóssil está sendo gradativamente substituída por outras de origem renovável, como a biomassa e os bioprodutos.

Um meio encontrado para aproveitamento total dos recursos das fontes renováveis é a biorrefinaria, que integra processos de conversão da biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e energia.

A biorrefinaria é entendida como um sistema de processos associados que converte um produto inicial em outros de maior valor agregado de forma a enriquecer e agregar valor a cada fração do material primordial. Enquanto que na refinaria tradicional o produto inicial (petróleo) é líquido, homogêneo e possui baixo teor de oxigênio, na biorrefinaria a biomassa é, na maioria das vezes, sólida, heterogênea e composta por moléculas oxigenadas. Assim, o custo de separação dos componentes da biomassa é o principal desafio, necessitando de

metodologias específicas que muitas vezes não estão disponíveis ou não estão ainda numa forma otimizada.

Uma estratégia investigada para viabilizar a separação dos componentes da biomassa por um método bioquímico é a aplicação de catalisadores biológicos, estes representados pelas enzimas microbianas. A fase de hidrólise, feita principalmente por enzimas fúngicas termofílicas, vem se tornando cada vez mais aceita e aplicável no cenário industrial. Entretanto, as enzimas comercializadas no Brasil são produzidas por grandes empresas multinacionais e, por serem originadas de cepas microbianas mesofílicas, não têm estabilidade necessária para o uso nas condições de temperatura de plantas industriais.

Com base no que foi apontado acima, o grupo de pesquisa, ao qual está vinculado este projeto, tem isolado cepas fúngicas termofílicas do ambiente e caracterizado suas enzimas, buscando encontrar exemplares com características que confiram tolerância às condições de aplicação, além de alta atividade. Uma dessas características é a tolerância a temperaturas acima de 40 ºC e a ampla faixa de pH. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a purificação e caracterização de uma endoglucanase termoestável produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* S10, o qual apresenta como diferenciador a capacidade de crescer a 55 ºC.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica representa o material orgânico de origem vegetal, sendo abundante e disponível nos resíduos agrícolas e agroindustriais. Esse material é constituído por celulose (38 – 50%), hemicelulose (23 – 32%), lignina (15 – 25%) e frações minerais (MAMMAN et al., 2008). A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos que podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis, enquanto que a lignina é um composto polifenólico (WANG et al., 2009). A lignina é um polímero amorfo, reticulado e tridimensional que se associa estreitamente com a celulose e a hemicelulose na constituição das paredes das células vegetais (MUSSATTO et al., 2008).

Todos os componentes da biomassa são fortemente entrelaçados e unidos através de ligações covalentes e não covalentes que constituem a matriz lignocelulósica. Dessa forma, a estrutura dessa matriz possui uma característica recalcitrante o que significa baixa degradação por enzimas (SUN et al., 2015).

A possibilidade do aproveitamento da biomassa lignocelulósica visando à obtenção de bioprodutos, principalmente etanol, exige um entendimento total da estrutura e organização, além das enzimas que degradam esse material.

2.1.1. Celulose

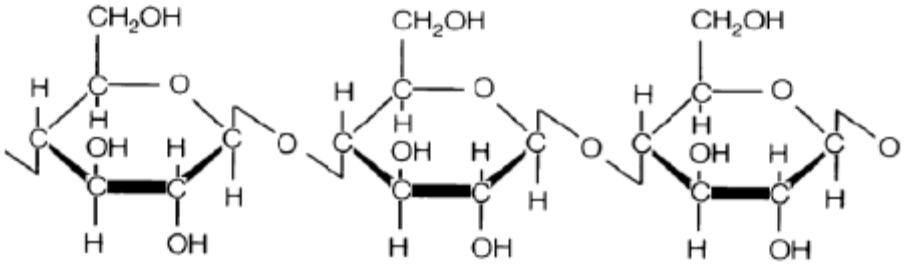
Por sua característica renovável e ser composta por glicose, a celulose vem sendo muito estudada focando aplicações nas áreas médicas, alimentícias e outras biotecnológicas (CIOLACU et al., 2011; BHAT, S.; BHAT, 1997).

A celulose é um polímero de cadeia linear, altamente ordenado e de alta massa molecular constituida por unidades repetidas de β–D–glucopiranoses, as quais se ligam covalentemente por ligações β-1,4 entre o grupo OH no átomo de carbono 4 (C4) e o átomo de carbono 1

(C1), por isso a nomeação β-1,4-glucano (Figura 1). Dessa forma, a celulose apresenta-se na forma de um extenso polímero de cadeia linear (MELO, 2007).

O grau de polimerização da celulose nativa, dependendo da sua fonte, pode chegar a mais de 5000 unidades de glicose (FENGEL; WEGENER, 1989). As ligações de hidrogênio intermoleculares frequentes no interior da matriz de celulose resultam numa orientação semelhante na maioria das moléculas, formando as microfibrilas. Dependendo do grau de organização da sua estrutura, a celulose pode apresentar regiões cristalinas (altamente ordenadas) ou amorfas (distribuídas aleatoriamente) (SHEN; GU, 2009).

Figura 1: Estrutura molecular da celulose.



Fonte: ACHARYA e CHAUDHARY (2012)

2.1.2. Hemicelulose

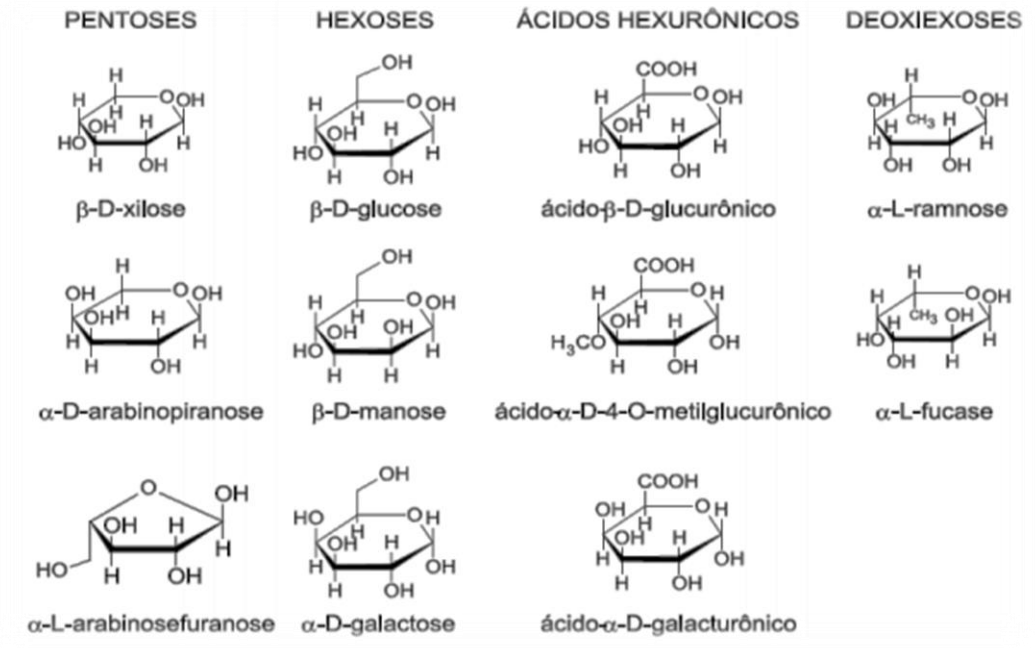
As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados responsáveis por 15-30% da biomassa lignocelulósica dependendo do tipo, origem e ambiente de cultivo da planta (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As hemiceluloses são polissacarídeos caracterizados como polissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos (FENGEL; WEGENER, 1989).

Esse grupo de polissacarídeos pode ser formado por uma vasta variedade de constituintes como pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glucose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-o-metilglucurônico e galacturônico) (Figura 2).

A heterogeneidade química e estrutural da hemicelulose leva a numerosas interações com outros componentes da parede celular. Modelos estruturais atuais de paredes celulares secundárias de células maduras mostram hemicelulose, lignina e proteínas estruturais formando uma matriz circundante das macrofibrilas de celulose com diâmetros de 10-20 nm. As hemiceluloses aderem às macrofibrilas através de ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. A xilana é o principal constituinte da hemicelulose, e corresponde a um polímero de D-xilose unidas por ligações β-1,4 (ALTANER; JARVIS, 2008; DAMMSTRÖM et al., 2009; COSGROVE; JARVIS, 2012; LANGAN et al., 2014).

A deposição da hemicelulose na parede celular antecede à lignificação e estabiliza sua interação com a celulose devido a suas ramificações e cadeias laterais (PEREIRA RAMOS, 2003). As cadeias laterais na hemicelulose, formadas por diversos açúcares, constituem a principal diferença entre essa classe de polissacarídeos e a celulose, visto que esta é composta por oligômeros hidrolisáveis (SÁNCHEZ, 2009).

Figura 2: Estrutura dos principais componentes moleculares da hemicelulose e da estrutura do polímero.



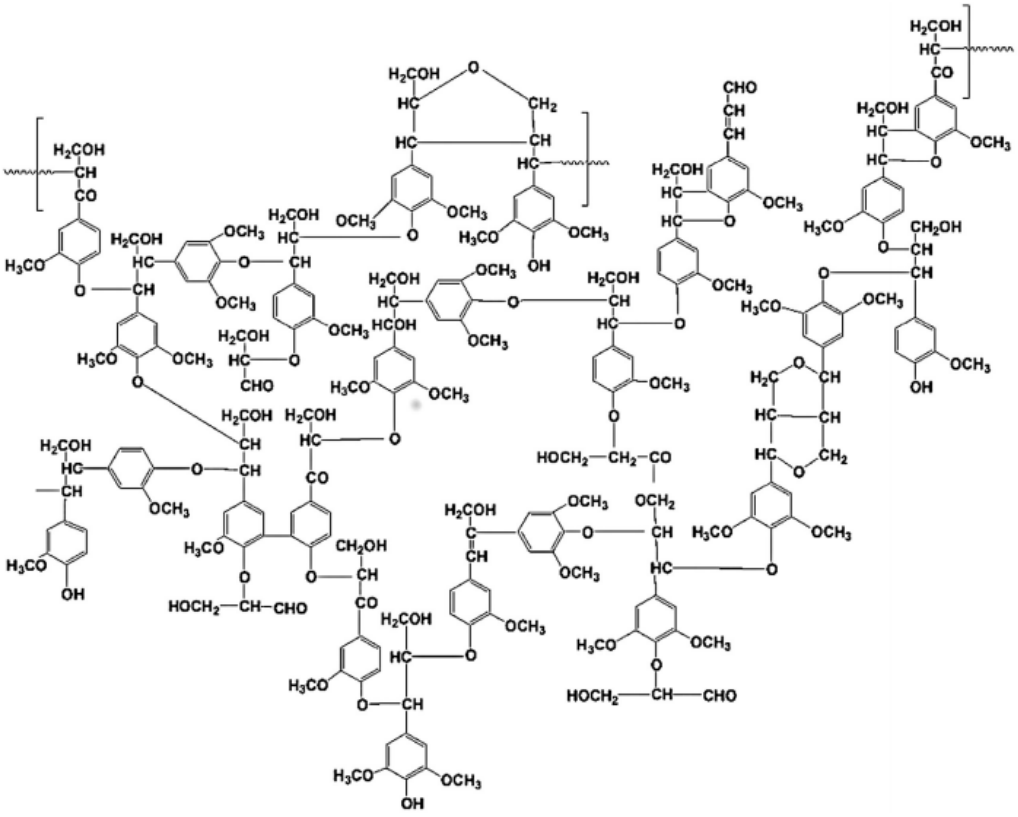
Fonte: RODRIGUES e CAMARGO (2008)

2.1.3. Lignina

A lignina é o componente não-carboidrato da matéria vegetal. É depositada juntamente com os compostos carboidratados da parede celular secundária nas plantas (SANDGREN et al., 2005).

A lignina é um polímero amorfo, complexo e tridimensional composto por três unidades de fenilpropano, o-p-hidroxifenil, guaiacil e siringil. As proporções das unidades monoméricas são altamente variáveis e dependem principalmente das espécies lignocelulósicas (NEUTELINGS, 2011). A lignina está associada à hemicelulose covalentemente por ligações éster, formando uma matriz que envolve as microfibrilas de celulose. Sua principal função é dar sustentação e resistência às plantas contra ataques de microrganismos e ao estresse oxidativo (Figura 3).

Figura 3: Representação molecular parcial da lignina.



Fonte: LE FLOCH et al.(2015)

2.2. Aproveitamento da biomassa lignocelulósica

A biomassa é considerada uma excelente fonte de açúcares e compostos fenólicos para produção de diversos produtos químicos, inclusive combustíveis. As características que favorecem sua utilização são, principalmente, a sua natureza renovável, baixo impacto ambiental na sua obtenção e utilização, versatilidade e disponibilidade (XIU; SHAHBAZI, 2013).

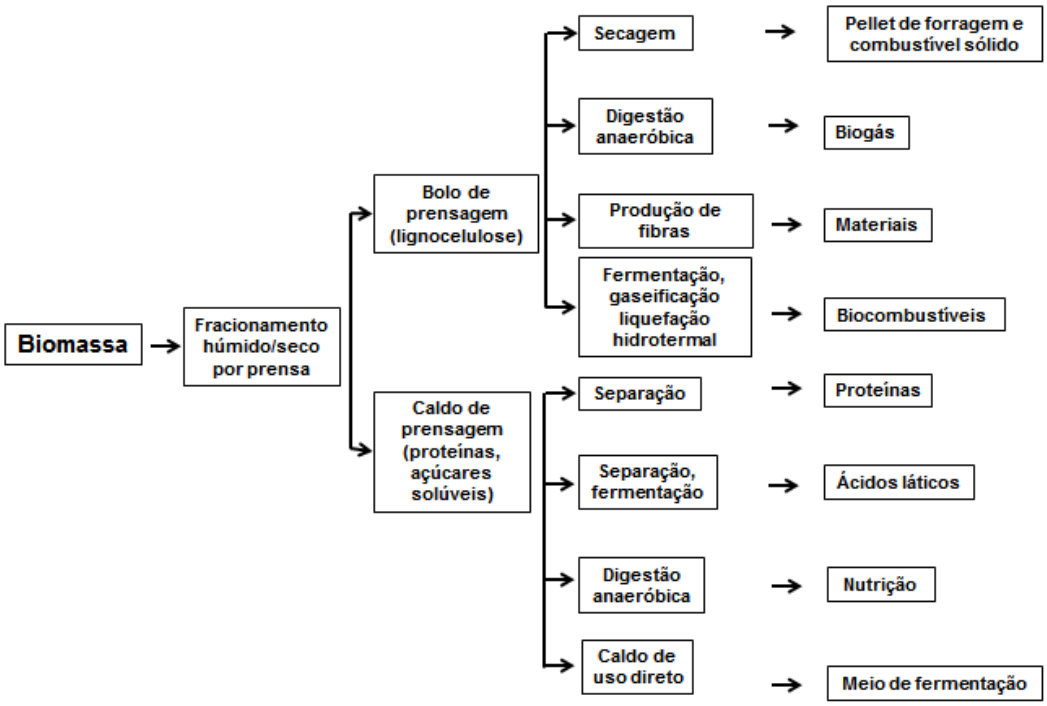
Em virtude dos aspectos mencionados, inicialmente a biomassa foi foco de interesse apenas para a produção de biocombustíveis (combustíveis produzidos a partir da biomassa) como o etanol de segunda geração. No entanto, apesar dos avanços tecnológicos, o processo de produção do etanol ainda apresenta-se onerosa considerando o preço do produto final. Deste modo, o meio encontrado para viabilizar a aplicação da biomassa foi a adoção do sistema de refinaria, ou neste caso, biorrefinaria (*green biorefinery*). O foco deste conceito é conceber uma variedade de produtos de maior valor, além de produtos de base, visando novas linhas de produção, como os biocombustíveis. A partir dessa estratégia, todo o processo garante um aumento da geração de receita e maior potencial competitivo (TAKARA; KHANAL, 2011).

A biorrefinaria utiliza, com maior frequência, gramíneas verdes como matéria-prima. Essas monocotiledôneas possuem uma composição bioquímica favorável ao processo, posto que possuem baixos níveis de constituintes não carboidratos. Na etapa de pré-tratamento, que visa principalmente a retirada de lignina para maior aproveitamento dos compostos carboidratos, as gramíneas superam outras variedades vegetais por necessitarem de pré-tratamentos menos drásticos (MANDL, 2010). Outras vantagens deste tipo de cultura são os elevados rendimentos de biomassa por hectare por ano, baixos requisitos de fertilização e pesticidas e adaptabilidade. Além disso, nessas culturas, a biomassa até então, era interpretada como resíduo, considerando que

seu desenvolvimento destinava-se apenas a produção de um produto principal, como cereais, o caldo da cana-de-açúcar, entre outros (WOODWARD, 2008).

Como visto na Figura 4, a biomassa passa por uma prensagem no início do processo, visando a separação dos compostos em duas frações. Esse evento desagrega as fibras (lignocelulose) da porção solúvel (caldo) e é executado com o objetivo de facilitar a separação dos produtos. Na biorrefinaria, tanto a porção fibrosa quanto a porção solúvel, são precursores de produtos finais (XIU; SHAHBAZI, 2015).

Figura 4. Sistema de funcionamento de uma biorrefinaria.



Fonte: XIU; SHAHBAZI (2015) - modificado

Inicialmente, o maior interesse nos processos de biorrefinarias era em componentes principais da biomassa, ou seja, celulose, hemicelulose e lignina. Contudo, após o estudo detalhado desses materiais evidenciou-se a existência substancial de produtos biológicos finos, como proteínas e ácidos orgânicos, os quais, pelo preço do produto final, proporcionam maior rentabilidade (HASAN et al., 2013).

Entre os procedimentos utilizados na biorrefinaria, a bioconversão de produtos através de microrganismos e suas enzimas mostram-se vantajosos em relação a tecnologias de conversões térmicas e químicas. As condições de temperatura e pressão apresentadas pela primeira são mais amenas que as encontradas nos mecanismos de combustão direta, pirólise, gaseificação e liquefação (KUNDU et al., 2015). Por essas razões, o desenvolvimento e investimento em pesquisas para compreender todas as rotas bioquímicas do processo e implementação dos melhores e mais rentáveis métodos para a obtenção desses bioprodutos. Nesse contexto, pesquisas em processos fermentativos diretos, com microrganismos ou com o uso de suas enzimas em várias etapas, podem levar ao desenvolvimento de processos com rentabilidade compatível às necessidades do mercado.

2.3. Cultivo de microrganismo em substrato sólido

Dois tipos de cultivos são utilizados para o crescimento microbiano dentro de plantas industriais: o cultivo submerso e o cultivo em estado sólido. A fermentação submersa (SmF) é a técnica mais utilizada em escalas industriais, no qual as fontes de carbono e de nutrientes minerais estão disponíveis em meio aquoso. O cultivo em estado sólido (FES) consiste em um processo no qual o substrato sólido é utilizado pelo microrganismo como fonte de carbono e energia ou apenas como suporte, porém a atividade de água do meio é baixa (PANDEY et al., 2000).

Fungos são considerados os microrganismos mais adaptados à FES, pois suas hifas crescem na superfície entre ou dentro das partículas, em função do crescimento apical e da intensa secreção de enzimas extracelulares (GRAMINHA et al., 2008; RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005).

A baixa atividade de água no processo sólido implica em particularidades fisiológicas dos microrganismos relacionadas ao seu

crescimento vegetativo, reprodutivo (esporos mais resistentes) e a taxa de germinação de esporos. A aeração é outro fator importante no processo, pois determina a oxigenação, remoção de gás carbônico, regulação de temperatura, umidade e distribuição de compostos voláteis no meio (HÖLKER; LENZ, 2005).

Quando os parâmetros definidos para o processo fermentativo em estado sólido estão adequados à linhagem, muitas vantagens são contabilizadas, como alta produtividade, menor necessidade de espaço e energia e baixo custo do meio de cultivo. O cultivo em estado sólido tem sido usado para a obtenção de celulases (KANG, 2004; GAO et al., 2008), xilanases (KANG, 2004), pectinases (RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005), ligninases (PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007) e várias outras enzimas e bioprodutos.

2.4. Microrganismos termofílicos

Embora a maioria das espécies de microrganismos descrita seja mesofílica, vivendo em temperaturas entre 20 e 35 ºC, algumas espécies são termotolerantes ou termofílicas, ou seja, toleram e/ou requerem temperaturas acima de 40 ºC (Tabela 1) (MADIGAN et al., 2010).

Tabela 1. Classificação dos microrganismos de acordo com sua temperatura ótima de crescimento.

Classificação dos microrganismos	Temperatura ótima (ºC)
Psicrófilos	2 - 12
Mesófilos	30 – 45
Termófilos	45 - 65
Hipertermófilos	>80

Fonte: MADIGAN et al.2010; TAYLOR; VAISMAN, 2010

A termofilia pode ser uma propriedade de Bacteria, Archaea ou fungos, enquanto que hipertermofilia é encontrada principalmente em procariotos. Dentre os organismos termofílicos, gêneros como *Sufolobus*, *Thermoplasma*, *Thermoproteus*, *Methanobacterium*, *Pyrococcus* e *Thermococcus* são representantes do domínio Archaea (UZAWA et al., 2002). Representando o domínio Bacteria, os principais organismos termofílicos pertencem ao gênero *Bacillus*, *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thiobacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobacteroides* e *Methanobacterium* (MADIGAN; OREN, 1999).

Nos domínios Archaea e Bacteria podem ser encontradas espécies crescendo em temperaturas acima de 100 ºC como o gênero *Pyrodictium* (Archaea), capaz de crescer a 121 ºC (MADIGAN et al., 2010).

Poucas espécies fúngicas termofílicas foram descritas até o momento, comparado com o número de mesofílicas, e nenhum exemplar hipertermófilo foi descrito, assim como não foi relatada a existência de microrganismos eucarióticos com crescimento acima de 62 ºC (MORA et al., 2011). O sistema de membrana dos organismos eucarióticos parece ser o fator limitante da adaptação ao crescimento em temperaturas acima de 60 ºC. Ainda não são entendidas as diferenças entre a composição dos lipídios e de proteínas ligadas às membranas e a composição de suas cadeias respiratórias quando esses microrganismos crescem em condições mesofílicas e termofílicas (GOMES et al., 2007).

Sabe-se que os grandes poros existentes nessas membranas são incompatíveis com a estabilidade térmica. Ainda, a estabilização térmica das membranas por sistema de saturação dos ácidos graxos como ocorre nos procariotos, dificultaria principalmente, a atividade da membrana nuclear (TANSEY; BROCK, 1972). A maioria dos fungos termofílicos descritos fazem parte das ordens *Sordariales*, *Eurotiales* e *Mucorales* (BERKA et al., 2011).

Esses microrganismos são de grande interesse em processos de conversão da biomassa, pois são fontes de enzimas termoestáveis. As vantagens de hidrólise em altas temperaturas são reações mais rápidas, viscosidade do meio reduzida e menor risco de contaminação (VIIKARI et al., 2007).

2.4.1. Fungo termofílico *Rasamsonia emersonii*

O fungo *R. emersonii* pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*. É um fungo termofílico e foi uma das espécies que passaram pela exclusão de dupla nomenclatura pelo Código de Nomenclatura Internacional para Algas, Fungos e Plantas (NORVELL, 2011).

A partir de 2011, para uma melhor coerência do código, ficou estabelecido que fungos deveriam ter apenas uma nomeação. Anterior a essa normatização, formas anamorfas (fase assexuada) e teleomorfas (fase sexuada) de mesmas espécies eram descritas como espécies diferentes. Conforme essa nova regra o nome da espécie deve ser aquele de divulgação mais antiga, legítima e mais amplamente usada (NORVELL, 2011; BRAUN, 2012). *R. emersonii*, usado no presente trabalho, é um exemplo de dupla nomenclatura e sua sinonímia era *Talaromyces emersonii* (HOUBRAKEN et al., 2014).

R. emersonii possui similaridades fenotípicas com gêneros chamados "*Penicillium-like*", ou seja, apresenta similaridades morfológicas com o gênero *Penicillium*, como os conidióforos em forma de pequenas escovas. Alguns fungos anteriormente classificados dentro do gênero *Rasamsonia* foram reclassificados com base em dados moleculares e, considerando a introdução da nomenclatura de único nome, passaram a ser *Hamigera*, *Paecilomyces*, *Rasamsonia*, *Sagenomella*, *Talaromyces* e *Trichocoma* (HOUBRAKEN et al., 2014).

O gênero *Rasamsonia* foi proposto para receber as espécies "*Penicillium-like*" *Geosmithia argillacea*, *Talaromyces emersonii* e

Talaromyces byssochlamydoides fundamentado em características fenotípicas, fisiológicas e moleculares. Essas espécies tem a forma de seus conidióforos parecidas com *Penicillium*, porém se diferenciam por possuírem em suas fiálides uma formação cilíndrica, diminuindo gradualmente em direção aos ápices, pedúnculos com paredes rígidas e conídios e ascomas de coloração marrom esverdeados. Além disso, espécies de *Rasamsonia* são termofílicas ou termotolerantes enquanto que espécies de *Penicillium* são geralmente mesofílicas (HOUBRAKEN et al., 2014).

2.5. Hidrólise enzimática

A biomassa residual pode ser utilizada como fonte de açúcares para obtenção de produtos com valor agregado. Entretanto, é necessário que haja a despolimerização dessa biomassa, liberando os monômeros para a posterior fermentação microbiana (JUTURU; WU, 2012).

Há duas formas de converter os polissacarídeos em estruturas menores, capazes de serem utilizadas pelos microrganismos, sendo elas por via química ou por hidrólise enzimática. Na hidrólise química utiliza-se ácidos inorgânicos e o produto obtido contém, além dos açúcares fermentescíveis, produtos de degradação e transformação química dos próprios açúcares e da lignina que podem ser tóxicos para os microrganismos empregados nas fermentações sub-sequentes (JUTURU; WU, 2012). O emprego de enzimas para a hidrólise, além de não gerar produtos tóxicos, é específica e ambientalmente segura (KUHAD et al., 2011; KARMAKAR; RAY, 2011) (Tabela 2).

O obstáculo encontrado no processo de hidrólise enzimática refere-se à recalcitrância da celulose gerada pela estrutura altamente organizada envolvendo a hemicelulose e lignina. Desse modo, o coquetel enzimático deve possuir uma variedade de enzimas hidrolíticas dos complexos celulolítico, xilanolítico, pectinolítico, além de enzimas de oxi-

redução do complexo ligninolítico e outras acessórias (PINTO et al., 2010).

Tabela 2: Principais diferenças entre as hidrólises ácida e enzimática.

Tecnologia	Consumíveis	Temperatura (ºC)	Tempo (min)	Sacarificação (%)
Ác. diluído	~1% H_2SO_4	180	45	82
Ác. conc.	70% H_2SO_4	50	60	88
Enzimática	Celulase	50	60	95

Ác. diluído – Ácido diluído; Ác. conc. – Ácido concentrado.
Fonte: NETO (2009).

2.6. Enzimas do complexo celulolítico

Para que a celulose possa ser convertida completamente em glicose há a necessidade de atuação de um combinado enzimático com diferentes especificidades a substratos, onde três celulases principais atuam: endoglucanases, celobiohidrolases e β-glicosidases (SARANRAJ et al., 2012).

Especificamente, essa enzimas são chamadas de hidrolases de glicosídeos (GH), pois catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre polímeros de glicose ou entre uma glicose e outra molécula não polissacarídica. Essas enzimas podem ser agrupadas com base em suas especificidades pelo substrato e também pela sequência de seus aminoácidos (HILDÉN; JOHANSSON, 2004).

Entre as GH estão incluídas as celulases que fazem parte da família 12 (GH12) que compreende endo-β-1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) fúngicas e bacterianas, tais como *Gloeophyllum trabeum* Cel12A, *Trichoderma reesei* Cel12A e *Bacillus Licheniformis* Cel12A; *endo*-β-1,3-1,4-glucanase (EC 3.2.1.73) de *Chrysosporium lucknowense* Cel12A, *Rhodothermus marinus* Cel12A e *Pyrococcus furiosus* Cel12A; e, endo-β-1,4-glucanase (3.2.1.151) de *Aspergillus aculeatus* XEG2 (GRISHUTIN et al., 2006; GILBERT, 2010).

A hidrólise primária ocorre nas superfícies de substratos sólidos, com um grau elevado de polimerização. Essa fase de despolimerização é

realizada por endoglucanases e celobiohidrolases e, é um fator limitante na velocidade de todo o processo de hidrólise da celulose. A segunda etapa de hidrólise envolve primeiramente a hidrólise da celobiose à glicose por β-glicosidases (Figura 5) (ZHANG; LYND, 2004; PERCIVAL ZHANG et al., 2006).

Além dos três principais grupos de celulases, recentemente, outra forma de celulase, chamada celulase do tipo oxidativa foi identificada. Essa enzima despolimeriza a celulose por meio de reações de radicais livres.

Existem ainda enzimas acessórias como oxidases líticas que atuam junto com as endoglucanases liberando oligômeros com terminais redutores (FUKUDA et al., 2009).

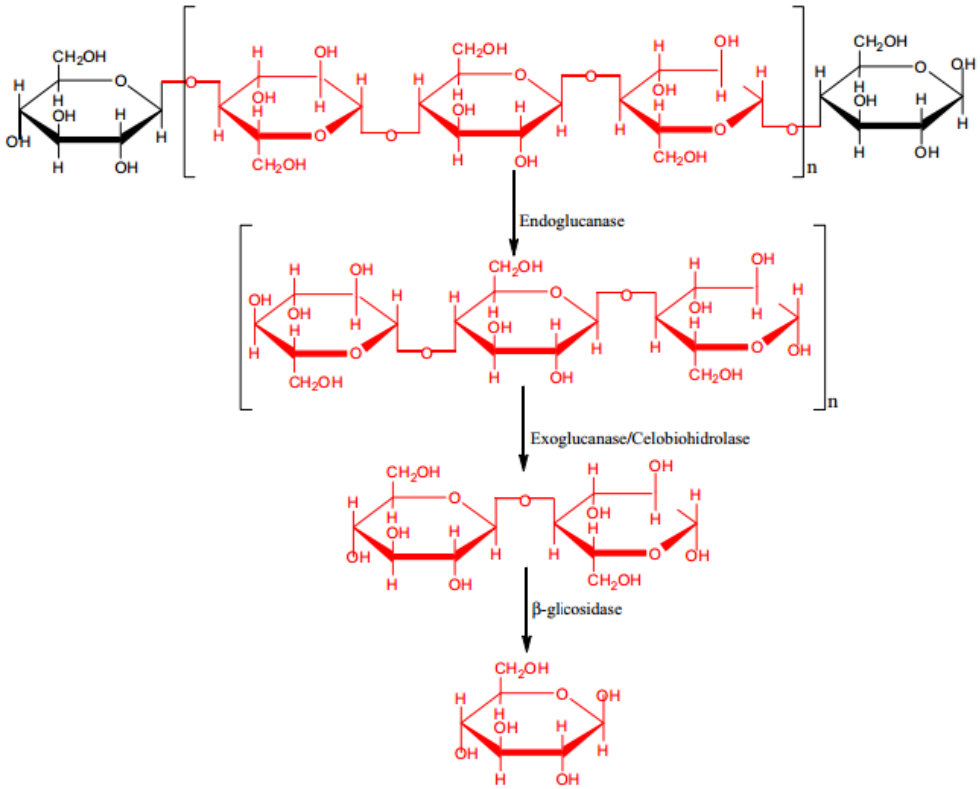
2.6.1. Endoglucanases

As primeiras enzimas a entrar em ação são as do grupo endo-1,4-β-D-glucanases. A sua função é hidrolisar ligações internas (β-1,4), nas regiões amorfas, que são mais suscetíveis, reduzindo o grau de polimerização do substrato, produzindo terminações redutoras e não redutoras. Após a sua atuação, as microfibrilas são expostas ao ataque seguinte de outras enzimas, além de elevar o número de oligossacarídeos com terminais suscetíveis ao ataque das celobiohidrolases (MARTINS et al., 2008; FUKUDA et al., 2009; SARANRAJ et al., 2012).

A maioria das endoglucanases não é glicosilada, porém algumas apresentam até 12% de glicosilação em sua cadeia (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008) e possuem tamanho médio de 22 a 45 kDa, podendo algumas apresentarem 90 kDa, como endoglucanases de alguns fungos (SADANA et al., 1984).

A maioria das endoglucanases fúngicas apresenta maior atividade entre as temperaturas de 50 e 70 ºC e valores entre 4 e 5 em relação ao pH (VALÁSKOVÁ; BALDRIAN, 2006; DING et al., 2006).

Figura 5: Esquema representando a atuação de celulases sobre o polímero de celulose liberando monômeros de glicose.



Fonte: JUTURU; WU (2012).

2.6.2. Celobiohidrolases

Após a atuação das endoglucanases, as exo-1,4-β-D-glucanases (celobiohidrolase, exocelulase, celulase microcristalina ou avicelase) atuam removendo monômeros ou dímeros de porções terminais das cadeias. Existem dois tipos de exoglucanases. O primeiro grupo atua em extremidades não redutoras enquanto que o segundo grupo atua em extremidades redutoras, mas ambas tem o mesmo produto que é a celobiose que, por sua vez, serão hidrolisadas a glicose pela β-glicosidase.

Dois tipos distintos de avicelases são descritos. A avicelase I que é mais rara e que combina as atividades de exoglucanase e endoglucanase e a avicelase II que exibe atividade celodextrinohidrolase (BRONNENMEIER et al., 1991).

As celobiohidrolases representam de 40 a 70% do total de enzimas que compõem o complexo celulolítico, e são capazes de hidrolisar a celulose cristalina (QUIROZ-CASTAÑEDA et al., 2010).

2.6.3. β-glicosidases

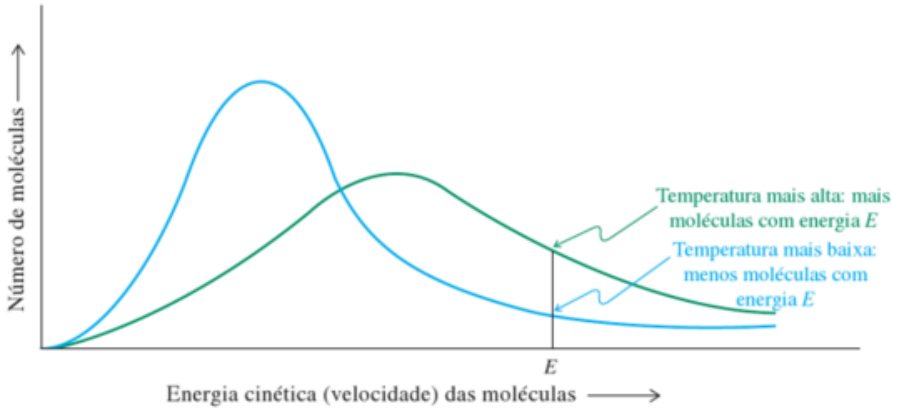
As β-glicosidades (ou celobiases) hidrolisam moléculas de celobiose ou até em alguns casos, outros oligossacarídeos curtos até glicose evitando o efeito inibitório da celobiose sobre algumas enzimas, como as celobiohidrolases (MAHESHWARI et al., 2000; ZHANG; LYND, 2004; MARTINS et al., 2008; FUKUDA et al., 2009). A maioria das β-glicosidases são glicosiladas e, em alguns casos, a glicosilação pode ser superior a 90% (ZHANG; LYND, 2004).

2.7. Enzimas termofílicas

Dentre os fatores ao qual um organismo está exposto durante seu ciclo de vida, o mais dominante é a temperatura, e ela constitui um dos principais agentes na determinação de certas características orgânicas. A adaptação a diferentes temperaturas direcionou estratégias, sobrepondo assim os desafios encontrados no meio, garantindo a permanência de seu material genético naquele dado ecossistema (GOMES et al., 2007). A partir dessa adaptação, entende-se que as proteínas desses organismos estejam aptas a suportar o aumento da energia cinética em suas moléculas à medida que estas são aquecidas.

Esse aumento de temperatura, em reações não enzimáticas, confere energia suficiente para superar barreiras de energia de ativação. Isso pode ser visto na Figura 6, através da curva de distribuição de Boltzmann. (VOLLHARD; SCHORE, 2013).

Figura 6. Curvas de Boltzmann. Na temperatura mais alta (em verde) há mais moléculas com energia cinética *E* do que na temperatura mais baixa (em azul).



Fonte: VOLLHARD; SCHORE, 2013

Em temperaturas mais altas, a média da energia cinética aumenta e a curva achata-se e desloca-se para energias mais elevadas, dessa forma, mais moléculas têm energia maior do que a necessária para superar o estado de transição e a velocidade da reação aumenta. Ao contrário, em temperaturas mais baixas a velocidade da reação diminui (VOLLHARD; SCHORE, 2013).

Além das curvas de Boltzmann, a equação de Arrhenius (1) descreve como as constantes de velocidade de reações com diferentes energias de ativação variam com a temperatura.

$$k = Ae^{-\frac{Ea}{RT}} \rightarrow A = \frac{Kb.T}{h} \quad (1)$$

É possível notar que quanto maior a energia de ativação (*Ea*), mais lenta será a reação. Por outro lado, quanto maior for a temperatura (*T*), mais rápida será a reação (VOLLHARD; SCHORE, 2013), na equação os termos Kb e h são a constante de Boltzmann (1,38 x 10^{-23} J.K^{-1}) e constante de Planck (6,63 x 10^{-34} J.s), respectivamente.

A partir disso, pode-se concluir que a influência da temperatura sobre a energia cinética nessas biomoléculas altera taxas de reação e colisão, intensidade de suas forças moleculares, entre outras propriedades físico-químicas. Essas modificações sensibilizam a

estabilidade das proteínas, acarretando, em situações extremas, o seu desdobramento irreversível (perda de estruturas 3D). Em enzimas, altas temperaturas induzem vibrações comprometendo a configuração catalítica do sítio ativo, acarretando à perda de função (VIEILLE; ZEIKUS, 2001; LI et al., 2005).

De acordo com sua termoestabilidade, enzimas termofílicas exibem um maior grau de empacotamento estrutural e menor flexibilidade quando comparadas a enzimas mesofílicas. Considerando energia cinética de biomoléculas, num ambiente com enzimas adaptadas a temperaturas amenas, para que esta realize sua função, é necessário um menor grau de energia para a sua ativação em vista daquelas estabelecidas em locais com temperaturas mais elevadas, apresentando assim, maior flexibilidade. Já as termoenzimas possuem maior rigidez do que as anteriores e necessitam de maiores aportes de energia cinética. Isto ocorre porque se lhes fossem atribuída grande flexibilidade, a alta energia cinética provinda da temperatura colapsaria a molécula, desnaturando-a. Uma vez que as termoenzimas oferecem certa resistência à ação da energia cinética, como maior grau de empacotamento e maior rigidez, ela acaba sendo ativada e tendo seu ótimo de atividade em temperaturas mais elevadas (LAM et al, 2011).

Desse modo, alguns fatores estabilizam essas biomoléculas de maneira intrínseca, como suas estruturas primárias e secundárias, e de maneira extrínseca, tais como alguns solutos, ligantes, chaperonas moleculares e o próprio substrato (GOMES et al., 2007).

Dentre os fatores intrínsecos, o efeito de hidrofobicidade exibido pelas termoenzimas é considerado o principal mecanismo de termoestabilidade. Ele direciona o enovelamento das proteínas e proporciona a estrutura nativa da molécula, impedindo o seu desdobramento e que regiões elementares à função tenham contato com ambientes externos hidrofílicos. A preferência pelo ambiente e constituição hidrofóbicos da proteína está associada à sua condutividade

térmica. Enquanto ambientes aquosos e polares apresentam aproximadamente condutividade térmica de 0,61 W/mK, porções hidrofóbicas possuem uma média de 0,23 W/mK (BROCK et al., 2008).

Comprovando a real ação de maiores porções hidrofóbicas ocultas na proteína, longe dos ambientes aquosos, Sammond et al. (2015) realizaram um teste intitulado SASA (Solvent-Acessible Surface Area). Este experimento mensura a área (Å) de superfície de uma biomolécula quando exposta a um solvente com acessibilidade para forças de van der Waals. Os dados apresentam valores negativos de SASA para a maioria das enzimas termofílicas, indicando grande superfície interna abstrusa. Suas porções hidrofóbicas ficam ocultas, por estarem geralmente em ambientes aquosos, formando micelas.

Em relação à composição de aminoácidos de proteínas termoestáveis, quando comparadas às suas homólogas mesofílicas, estudos apontam maior tendência da constituição por isoleucina (Ile), valina (Val), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), cisteína (Cys) e metionina (Met) que são caracterizados como hidrofóbicos além de também apresentarem maiores quantidades de resíduos aromáticos (VOET et al., 2002). Além da composição, essas proteínas também podem apresentar modificações em suas sequências.

Algumas alterações exibem estabilização de estrutura secundária, como por exemplo, quando há substituição de um resíduo de Gly, o qual apresenta maior entropia conformacional, pela Ala, que desenvolve melhor formação para α-hélices (BORGO e HAVRANEK, 2012). Da mesma forma, resíduos de lisina (Lys) são substituídos por argininas (Arg). A Arg ostenta melhor adaptação à termofilia dentre os resíduos carregados por possuir um grupo guanidina, o qual reduz a reatividade química da molécula devido ao seu alto valor de *pKa* e ressonância (DI GIULIO, 2000).

Do mesmo modo, taxas reduzidas de resíduos de ácido aspárgico (Asp) conseguem aumentar a termoestabilidade em enzimas, devido à

sua presença permitir maior susceptibilidade à desamidação da molécula, ocasionando assim, desdobramento térmico (WU et al., 2010).

Outros aspectos característicos da composição de aminoácidos em proteínas termoestáveis são taxas mais elevadas de resíduos de prolina (Pro), o qual é composto por um anel pirrolidínico apto a assumir limitadas conformações, diminuindo, assim, a entropia de desenovelamento, estabilizando a proteína (KULAKOVA et al., 2004). Da mesma forma, a redução de resíduos β-ramificados, como valina (Val) e tirosina (Tyr) podem incrementar sua estabilidade, pelo fato de não serem tolerantes à conformação de α-hélice, em função de suas ramificações nos C β (MAHANTA et al., 2015).

Outro fator termoestabilizador é o posicionamento dos resíduos de cisteína (Cys) em termofílicos aeróbios. Esse resíduo é vulnerável à oxidação quando exposto a solventes em condições oxidativas. Porém, exerce função importante na termoestabilização através de ligações dissulfeto. À vista disso, em termofílicos aeróbios, a Cys encontra-se envolvida em interações estabilizadas específicas (ligações dissulfeto ou ligadas a metais) e/ou inacessíveis ao solvente. Essas pontes dissulfeto estabilizam a proteína por reduzirem a entropia do estado desenovelado da molécula (YIN et al., 2015).

Ainda sob o ponto de vista sequencial e anatômico da proteína, encurtamentos do C e N terminais e ancoramento da terminação livre afetam de forma positiva as enzimas termofílicas. O melhor ancoramento ou o encurtamento das porções citadas é realizado por pareamento de íons, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Essas manobras estabilizam C e N terminais mantendo a enzima em equilíbrio em altas temperaturas (MADRICH et al., 2005).

Todas essas interações geram estruturas secundárias típicas para termozimas, caracterizadas por apresentarem maiores conteúdos de α-hélices e folhas β-pregueadas e taxas muitos menores de regiões irregulares. Tanto α-hélices quanto folhas β-pregueadas exibem

conformações uniformes, tornando a proteína menos vulnerável ao desenovelamento térmico, quando comparadas à regiões irregulares de proteínas lábeis. Essas estruturas são estabilizadas por interações, como as ligações de hidrogênio (CHEN et al., 2013).

As interações iônicas são outro artifício que a molécula utiliza como recurso para manter a sua estabilidade a altas temperaturas. Essas interações formam uma rede que atravessa a superfície da proteína e as interfaces das subunidades. Esses pareamentos aparecem em pequenos números na proteína, não direcionam o seu dobramento, tampouco são conservados. Porém, segundo Castillo et al. (2006) essas interações aumentam de forma diretamente proporcional ao aumento de temperatura ao qual a proteína resiste.

Todas essas interações citadas são dependentes de outras condições ambientais ao qual a proteína estudada está inserida. Por exemplo, suas propriedades microscópicas, como hidratação iônica, efeito de íons na hidratação da proteína e interações diretas entre íons e proteínas podem ser afetadas por fatores macroscópicos, como viscosidade do meio, basicidade, nucleofilicidade e hidrofobicidade (ZHAO, 2016).

Dados relacionados ao coeficiente térmico Q_{10} de enzimas (medida da elevação da velocidade inicial ao aumento da temperatura em 10 ºC) mostram que as três classes de enzimas (psicrofílicas, mesofílicas e termofílicas) apresentam valores de Q_{10} próximos, em torno de 1,8, mas as representantes termofílicas possuem os valores mais elevados e as psicrofílicas os mais inferiores desta média, demonstrando assim que as primeiras apresentam atividade confortável em maiores faixas de temperatura (COLLINS et al., 2003).

Essa tendência de atividade em temperaturas elevadas mostra necessidade de uma configuração proteica precisa e catálise rigidamente executada. Os resíduos catalíticos chave dessas proteínas estão entre os resíduos menos móveis na composição cristalina da enzima, além de

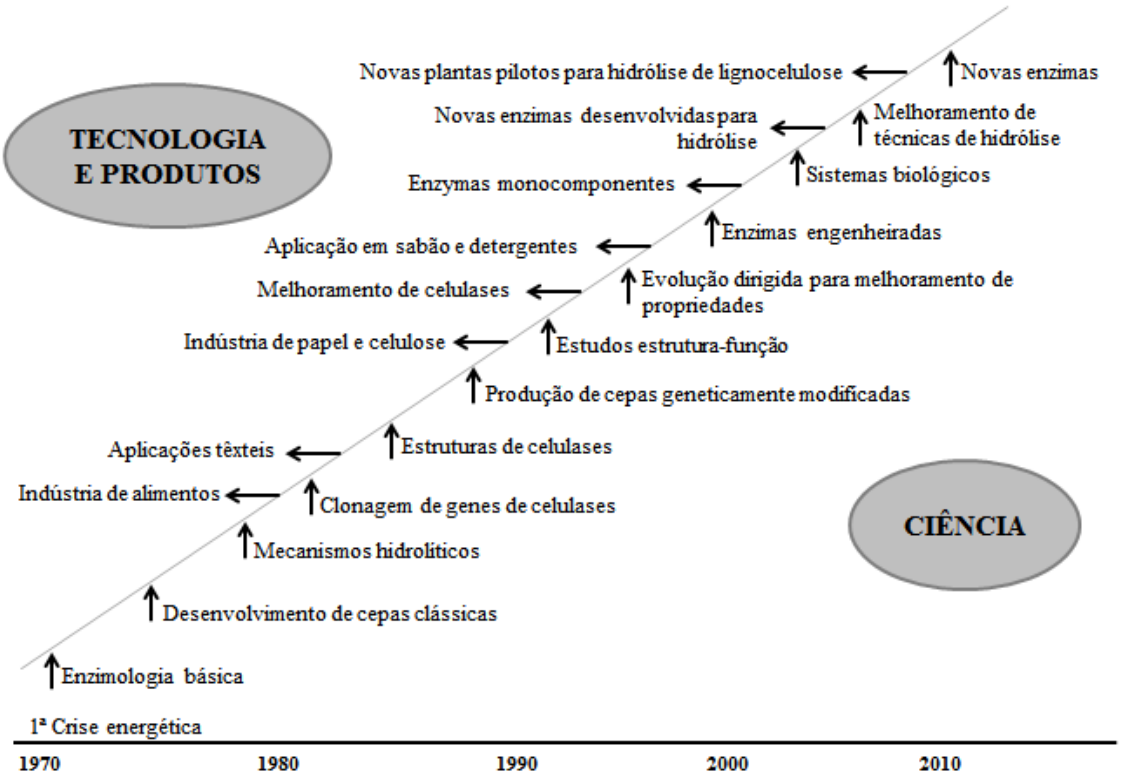
possuírem maior número de interações e mais resistentes para manter a integridade global de toda a enzima, mas principalmente do sítio-ativo (PISLIAKOV et al., 2009).

Por fim, algumas enzimas termofílicas possuem a característica de serem termoativadas por temperaturas elevadas. A termoativação pode ser mediada por glicosilações, como pela adição de trealose, um dissacarídeo também responsável por proteger células de fungos, plantas e invertebrados contra a dessecação, às enzimas (SOLA-PENNA e MEYER-FERNANDES, 1998). As trealoses podem ser classificadas em três tipos: a primeira possui efeito termoprotetor, sendo responsável pela recuperação da atividade enzimática original após de curta exposição a altas temperaturas (HOTTIGER et al., 1994), a segunda tem papel termoestabilizador e por útimo termoativador (CARNINCI et al., 1998). Segundo Carninci et al. (1998) enzimas termolábeis na presença de 0,6 M de trealose (valor próximo à máxima concentração de trealose em células de levedura) mostram atividade enzimática quase normal em faixas de temperatura entre 50 e 60 ºC.

2.8. Aplicação de celulases

Celulases microbianas têm recebido especial atenção no decorrer dos últimos anos. Inicialmente, sua utilização visava apenas indústrias têxteis na década de 80, contudo, após um tempo, seu emprego ganhou muitas vertentes, e têm tornado processos industriais mais amenos e menos agressivo ao meio ambiente (SHARMA et al., 2016). Uma síntese sobre o desenvolvimento e aplicação das celulases pode ser vista na Figura 7.

Figura 7. Desenvolvimento de celulases na ciência e tecnologia.



FONTE: VIIKARI et al., 2012

Dentre todas as enzimas empregadas em bioprocessos industriais, cerca de 85% são hidrolases, grupo no qual estão inseridas as celulases (SHARADA et al., 2013). E para que uma proteína dessa classe seja suficientemente ativa, capaz de suportar ambientes hostis e que apresente uma relação custo/benefício positiva à organização, é necessário que passe por algumas etapas até que seja utilizada em escalas maiores.

Primeiramente, busca-se a seleção de uma cepa microbiana produtora de celulase e que produza essa enzima a baixos custos. Resíduos lignocelulósicos têm sido um substrato alternativo para esse fim. A mudança da escala de produção de bancadas de laboratório à escalas industriais é um caminho longo e requer, além da adaptação do microrganismo ao sistema de fermentação, o desenvolvimento de fermentadores apropriados, o que ainda é um desafio tecnológico. A extração, recuperação, purificação (se necessária) e aplicação da enzima

também são passos tecnológicos a serem adaptados (SHARADA et al., 2013).

A produção da celulase em larga escala e em sistema de baixo custo permitiria sua aplicação em várias áreas e em diversos processos. Uma das áreas em que há mais focos de pesquisa atualmente é a gestão de resíduos. Como descrito anteriormente, resíduos agrícolas, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha e sabugo de milho, podem ser utilizados para essa finalidade. Dessa forma, além de diminuir a quantidade desses resíduos no ambiente, agregar-se-ia valores aos mesmos (BAYER et al., 2007).

A sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos por enzimas microbianas visando à produção de bioetanol tem sido intensamente estudada, porém o custo das enzimas ainda limita o processo. (KUHAD et al., 2011). Desse modo, as tecnologias devem ser melhoradas para que o custo do produto seja compatível e competitivo com produtos já existentes no mercado. Por outro lado, a eficiência da celulase pode ser um fator limitante na execução do processo e os principais motivos são a recalcitrância do substrato, inibição pelo produto final, desativação térmica da proteína, ligação de maneira inespecífica à lignina e adsorção irreversível da enzima ao substrato heterogêneo (GUPTA et al., 2011).

Também é encontrada atuação desta enzima na indústria agrícola, mais precisamente nas áreas de controle biológico e fertilização de solos. As celulases estão entre as enzimas capazes de degradar paredes celulares de alguns patógenos (HARMAN e KUBICEK, 1998).

Além disso, hidrolases microbianas podem ser usadas na produção de protoplastos vegetais, sendo utilizados para o desenvolvimento de estirpes híbridas com propriedades desejáveis. Alguns fungos celulolíticos têm papel fundamental na agricultura ao facilitar a germinação, proporcionar o rápido crescimento e floração da planta, melhor o sistema radicular e aumentar a produtividade das culturas (HAN e HE, 2010).

Uma das primeiras aplicações de celulases na indústria foi voltada para a área têxtil, na década de 80. As celulases são as enzimas utilizadas mais bem sucedidas no processamento úmido têxtil, especialmente no acabamento em tecidos a base de celulose. Tratamentos atuais envolvem a remoção do amido por amilases e celulases, substituindo a pedra-pomes no processo de tratamento do jeans (*biostoning* e *biopolishing*). Durante o processo de *biostoning* as celulases agem sobre o tecido de algodão e rompem as extremidades das fibras, liberando o corante, facilmente removido no posterior ciclo de lavagem. Dessa forma, há menor dano às fibras, maior rendimento do processo e sem resíduos nocivos ao meio ambiente (HEBEISH e IBRAHIM, 2007).

Outra vantagem do emprego de celulases na indústria têxtil está relacionada à maciez. Devido às repetidas lavagens, as roupas de algodão se tornam sem brilho, principalmente devido à presença de microfibrilas isoladas na superfície das peças. As celulases melhoram sua maciez e absorção de água pelas fibras e reduzem a formação de penugens. A ação das celulases remove fibras curtas, superfícies com irregularidades e cria uma aparência lisa e brilhante. Preparações de celulases ricas em endoglucanases são mais adequadas para o processo (CAPARRÓS et al., 2012). Por esse cenário, as celulases também foram agregadas aos sabões e aos detergentes na indústria de lavanderia. Sua ação promove um acabamento apropriado sem a geração de resíduos nocivos ao meio ambiente (JUTURU e WU, 2014).

Mudando para a esfera de processamento de alimentos, as celulases possuem grande aplicação nas etapas de extração, clarificação, estabilização e maceração de vegetais, gerando melhor rendimento e menor viscosidade (REED, 1993).

Um exemplo dessa aplicação é sua utilização na extração de azeites. Devido a maior demanda desses produtos no mercado por seus benefícios à saúde, as extrações a frio estavam sendo prejudicadas, e a

qualidade dos azeites diminuiu. Porém, um preparado enzimático constituído de pectinase, celulase e hemicelulase, aumentou o rendimento do processo anterior, apresentou maior fracionamento centrífugo de mosto oleoso, aumentou as taxas de antioxidantes e vitamina E, apresentou indução lenta de ranço e diminuiu a quantidade de óleo nos resíduos industriais (CHIACCHIERINI et al., 2007).

O processo de extração de carotenoides também passou a ser realizado com o auxílio das enzimas. Por se tratar de um corante natural, um método sem aditivos químicos também é desejável no processo de produção. A ação de celulases e pectinases rompe a parede celular das células dos vegetais e libera os carotenoides dos cloroplastos e dos fluidos celulares. O pigmento permanece em seu estado natural ainda vinculado a proteínas. Essa estrutura aderente impede a oxidação do pigmento, mantendo-o estável (ARVAYO-ENRÍQUEZ, 2013).

Ainda dentro do ramo alimentício, indústrias de vinhos e cervejas aplicam enzimas para melhorar a qualidade e produtividade de seus produtos fermentados. Enzimas como pectinases, celulases e hemicelulases atuam na melhor extração de compostos de cor, ajudam na maceração de cascas de uvas para vinhos, clarificação, filtração e melhora da qualidade e estabilidade dessas bebidas. Para cervejas, as enzimas são ativadas durante o processo de maltagem, que é a etapa de germinação das sementes de cevada. Nessa etapa, as enzimas impulsionam o processo de hidrólise das reservas desses grãos, dessa forma agregando sabor ao produto. Em específico, as endoglucanases diminuem a viscosidade do mosto, melhorando a capacidade de filtração da solução (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2013; KHATTAK et al., 2013).

Outro domínio cada vez mais adepto dos benefícios das enzimas microbianas é o da nutrição animal. Sua incorporação às rações, durante pré-tratamentos de silagens e cereais, melhora o valor nutricional do produto e consequentemente o desempenho dos animais. Também eliminam fatores antinutricionais, degradam componentes para que se

tornem mais nutritivos, fornecem enzimas digestivas suplementares (proteases, glucanases e amilases). Também fornecem melhoria do produto final, pois a incorporação de celulases e xilanases diminuem a viscosidade das fibras de carnes suínas e aviárias, também proporcionando ganho de peso por esses animais, já que melhoram a digestão e a absorção de nutrientes (GRAHAM e BALNAVEL, 1995).

A baixa digestibilidade de alguns tipos provoca a formação de uma placa que se desloca até o intestino grosso, e pode ser usado como substrato por algumas bactérias, proporcionando a proliferação de alguns patógenos. O emprego de celulases nessas rações têm efeitos positivos sobre o processo de fermentação cecal, aumentando a produção de ácido piônico, que atua como bacteriostático, diminuindo a colonização de bactérias patogênicas e melhorando as condições de bem-estar animal nas produção agropecuária (HASHEMI e DAVOODI, 2011).

Concluindo o cenário de pesquisa e desenvolvimento, o emprego de celulases em áreas como engenharia genética, análise de alimentos, diagnóstico e tratamento de doenças já é desenvolvido há décadas, melhorando a qualidade de vida da população, e ainda há muitos resultados promissores por vir (KANTELINEN et al., 1995; BAKER et al., 2005; FARIQ, 2016).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Purificar e caracterizar uma endoglucanase termoestável produzida pelo fungo *Rasamsonia emersonii* S10 visando entender as propriedades da tolerância a elevadas temperaturas.

Objetivos específicos

- Extração de endoglucanase produzida pelo fungo *R. emersonii* S10 a partir do cultivo em estado sólido, buscando otimizar o rendimento dessa extração variando-se as condições dessa extração como volume de eluente e tempo de agitação;
- purificação da isoforma de menor peso molecular de endoglucanase expressa pelo fungo;
- caracterização físico-química da endoglucanase (pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade, efeito de íons, reagentes e compostos orgânicos;
- caracterização a enzima quanto à sua especificidade sobre diferentes substratos glicídicos;
- cálculo de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível da endoglucanase.

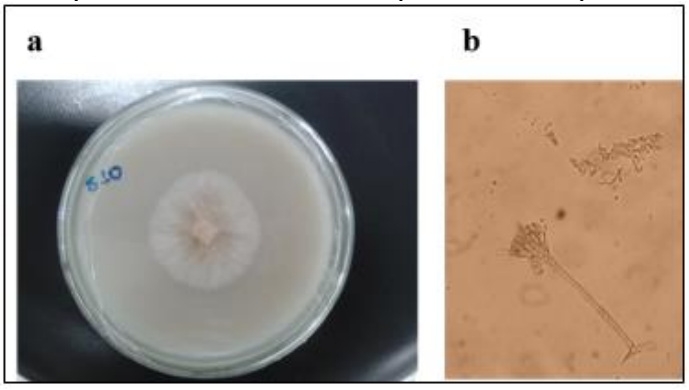
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e cultivo

O fungo utilizado foi uma linhagem de *Rasamsonia emersonii* S10, isolada de amostras de solo na Chácara Jataí, localizada na cidade de Adolfo – SP - e que demonstrou atividade de endoglucanase (Rosa, 2014).

A cultura foi mantida em meio ágar Saboroud (Himedia) contendo 20% de glicerol (Dinâmica) e preservadas em criotubos a -80 ºC. A Figura 8 mostra o isolado em placa de Petri (a) e em uma micrografia (b).

Figura 8. Representação do fungo *R. emersonii* S10: (a) em placa de Petri cultivado em meio de aveia e (b) por micrografia de esporângio e esporos em microscópio fotômico binocular (LeicaICC 50) – 40x.



Fonte: Autoria Própria

4.2. Produção da enzima por cultivo em estado sólido

O fungo termofílico *R. emersonii* S10 foi cultivado em estado sólido, conforme definido em trabalho anterior (ROSA, 2014). Foi utilizada como fonte de carbono, 5 g de mistura (1:1:1) de farelo de trigo (adquirido em lojas especializadas em produtos agrícolas), palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar (cedidos pela Usina Açucareira Virgulino Oliveira S/A – unidade de José Bonifácio). A umidade do substrato foi de 70% atingido pela adição de 20 mL de solução nutriente, composta por 3,5 $g.L^{-1}$ de

$(NH)_4SO_4$, 3 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 0,5 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 $g.L^{-1}$ de $CaCl_2$, 1% de Tween 80 e pH ajustado para 5,0.

O substrato foi esterilizado em embalagem de polipropileno (12 x 20 cm) e inoculado com suspensão micelial (0,5 g micélio/g de substrato) (MARTINS et al., 2011). A suspensão micelial foi obtida a partir de cultura miceliada em superfície do meio inclinado ágar Sabouraud, em Erlenmeyer, após cultivo por 72 h. O micélio foi suspenso em solução nutriente, a qual foi incorporada ao substrato sólido. A incubação ocorreu a 55 ºC por 240 h. A extração da amostra foi mediada por água deionizada depois homogeneizada, agitada em shaker a 100 rpm, filtrada em tecido de algodão e centrifugada a 10000 *x g*, por 15 min, a 10 ºC. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta

4.3. Dosagem da atividade de endoglucanase

A atividade de endoglucanase foi determinada em tubos de ensaio e em microplacas. Em tubos de ensaio, a atividade foi determinada em mistura de reação contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução com 4% de CMC (C5768 – Sigma-Aldrich) em solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. A reação foi conduzida a 80 ºC por 10 min e, então, interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Uma curva padrão de glicose foi utilizada para a determinação dos açúcares redutores liberados. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas e a reação controle foi conduzida para as mesmas condições ensaiadas.

Em microplacas, a atividade de endoglucanase foi determinada como descrito por Bailey et al. (1992). A quantidade de açúcar redutor liberada foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959), o qual foi preparado de acordo com Wood et al. (2012). A atividade total foi

expressa em $U.mL^{-1}$ e a atividade específica em $U.mg^{-1}$. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

O processo foi realizado em microplaca utilizando como mistura reacional 90 µL de solução de CMC a 4% e 10 µL de solução de enzima. As placas foram incubadas em MJ Rearch PTC200 *thermal cycler* (Bio-Rad) na temperatura inicial de 80 °C, por 10 min, seguida de resfriamento imediato a 4 °C. A reação foi paralisada após adição de 100 µL de solução de DNS e imediatamente aquecida a 95 °C por 10 min, seguida de resfriamento a 4 °C. A absorbância foi medida a 540 nm usando leitor de microplaca em espectrofotômetro UV-VIS. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de açúcar requerida para gerar 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio, usando curva padrão de glicose A reação controle foi conduzida para as mesmas condições.

4.4. Testes de extração da enzima endoglucanase

Após 240 h de cultivo em estado sólido, foram feitos testes para avaliar a eficiência da extração da enzima. Foi adicionada água deionizada ao material fermentado na proporção de 10:1 ou 30:1 ($mL.g^{-1}$), o qual foi homogeneizado, agitado por 30 ou 120 min em shaker a 100 rpm, durante três ciclos de extração (Tabela 3), filtrado e centrifugado a 10000 *x g*, por 15 min, a 10 ºC e o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta. O experimento foi realizado em três repetições.

Tabela 3. Dados explicativos do experimento de extração.

1º Ciclo de Extração			
	Água/Substrato (mL.g^{-1})	Volume água (mL)	Tempo de agitação (min)
Tratamento 1	10:1	50	30
Tratamento 2	10:1	50	120
Tratamento 3	30:1	150	30
Tratamento 4	30:1	150	120
2º Ciclo de Extração			
	Água/Substrato (mL.g^{-1})	Volume água (mL)	Tempo de agitação (min)
Tratamento 5	10:1	50	30
Tratamento 6	10:1	50	120
Tratamento 7	30:1	150	30
Tratamento 8	30:1	150	120
3º Ciclo de Extração			
	Água/Substrato (mL.g^{-1})	Volume água (mL)	Tempo de agitação (min)
Tratamento 9	10:1	50	30
Tratamento 10	10:1	50	120
Tratamento 11	30:1	150	30
Tratamento 12	30:1	160	120

Fonte: Autoria Própria

4.5. Teste de clarificação da solução enzimática bruta em pequena escala

Visando eliminar substâncias de cor da solução enzimática bruta, foram utilizados carvão ativado (Synth), caulim (Dinâmica) e polietilenoimina (Dinâmica) como clarificantes. Os ensaios de clarificação foram realizados de duas formas. Primeiramente, os reagentes carvão ativado (Synth), caulim (Dinâmica) e polietilenoimina (Dinâmica) foram adicionados na concentração de 1% em 5 mL de solução enzimática bruta, para carvão ativado e caulim, e a 10 mL para polietilenoimina, em tubos de 15 mL. Após a preparação desta mistura, os tubos contendo carvão ativado e caulim foram agitados em agitador de rolo MII (Biomixer) durante 30 min a 24 ºC, enquanto que o tubo contendo polietilenoimina foi agitado também durante 30 min mas a 4 ºC. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10000 *g*, por 15 min a 10 ºC.

A outra metodologia testada foi o empacotamento de coluna de vidro com a mesma concentração de carvão ativado (1%), ou seja, foi

depositado 0,05 g do reagente na coluna (10 x 100 mm) para uma eluição de 5 mL de solução enzimática bruta. O fluxo foi de 10 $mL.min^{-1}$.O material eluído foi posteriormente armazenado sob refrigeração.

Testes de atividade enzimática de endoglucanase e absorbância a 540 nm (LIMA et al., 2013) foram realizados para estipular a melhor metodologia de clarificação.

4.6. Ensaios de eletroforese

A solução enzimática bruta foi concentrada 10 vezes em concentrador rotativo série RVC 2-18 CD Plus (Christ) durante 1 h, a 1300 rpm e 60 ºC e, posteriormente foi adicionado ao tampão de amostra (0,1 M de tampão Tris-HCl pH 8,8 e azul de bromofenol). Um segundo método foi utilizado, sendo o material filtrado congelado e liofilizado em liofilizador FR-Drying Digital Unit (ThermoFisher) durante 16 h. O liofilizado foi solubilizado em aproximadamente 15 µL de água ultrapura.

A eletroforese foi realizada em gel poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, como descrito por Laemmli (1970). As bandas de proteína foram coradas com nitrato de prata.

Para a obtenção do zimograma de atividade da endoglucanase utilizou-se o método descrito por Lee et al. (2014). Uma alíquota de 15 µL de amostra da solução enzimática concentrada foi adicionada ao tampão de amostra contendo 0,1 M de solução Tris-HCl e azul de bromofenol, pH 8,8. Após a corrida de eletroforese, os géis foram incubados durante 30 min a 80 °C em soluções contendo 0,5% de CMC e 0,5% de agarose. Após incubação, os géis foram corados com 0,1% de solução de vermelho congo sob agitação suave durante 15 min a 25 °C. Subsequentemente, os géis foram imersos em solução de NaCl 1M até o aparecimento de bandas claras no fundo vermelho. Para melhor resolução das bandas, foi adicionada uma solução 0,1 M de HCl.

Para a estimativa da massa molecular das isoformas em condições desnaturantes, foi feita uma eletroforese em gel de

poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), usando gel de corrida a 10 % e gel de empilhamento a 5 %. O gel foi dividido em duas partes, a primeira corada com nitrato de prata e a outra corada pelo método de zimograma para endoglucanase. A estimativa das massas moleculares das isoformas foi determinada comparando as bandas do zimograma com os padrões de proteínas globulares de massa molecular conhecida.

4.7. Determinação dos teores de proteínas totais

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1959), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

4.8. Purificação da endoglucanase

4.8.1. Clarificação da solução enzimática bruta

A solução enzimática bruta foi filtrada em carvão vegetal ativado em pó (Synth). O experimento foi realizado em coluna de vidro (Aldrich – 240 x 30 mm), a qual foi empacotada com 10 g (1%) de carvão ativado e passados 200 mL da solução, a um fluxo de 10 $mL.min^{-1}$ em temperatura ambiente. Essas condições foram definidas a partir dos resultados do ensaio descrito no item 4.5.

4.8.2. Ultrafiltração tangencial da solução enzimática

Após etapa de clarificação 200 mL de solução foram passados em dialisador tangencial (GE Healthcare Life Sciences) acoplado ao cartucho de 10000 NMWC, com 650 cm^2 de área superficial (GE Healthcare Life Sciences). A solução enzimática foi concentrada até aproximadamente 20% do seu volume de partida. Em seguida, uma solução tampão Bis-Tris (Sigma-Aldrich) 20 mM pH 6 foi adicionada até completar o volume inicial de solução. Essa solução foi novamente concentrada, seguida de nova adição de tampão e concentração até 20% do seu volume inicial. Alíquota

da fração dialisada foi removida para ensaios de atividade de endoglucanase e a solução concentrada foi armazenada a -20 °C para ensaios cromatográficos.

4.8.3. Ensaios preliminares de purificação em pequena escala

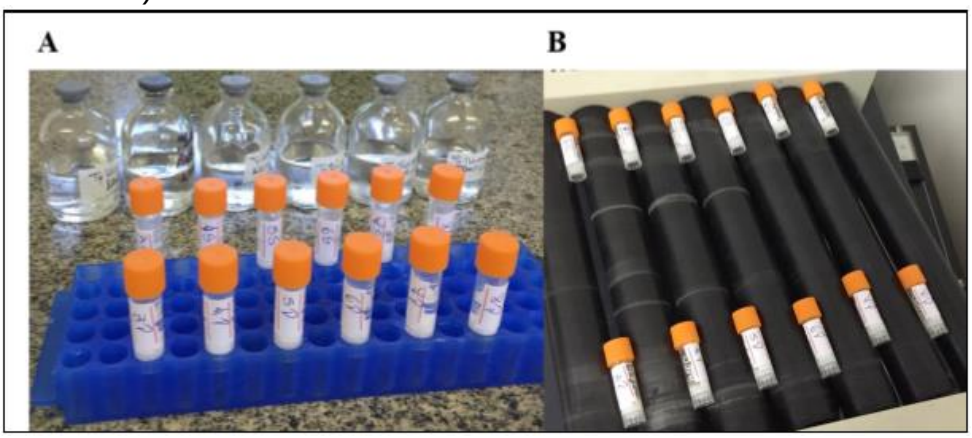
Esses testes foram realizados em tubos de 5 mL, simulando as condições da coluna de purificação (WILLIAMS e FRASCA, 2011). A estratégia baseia-se em duas etapas: (a) determinação do pH de melhor interação entre proteína e resina iônica; (b) determinação da concentração de sal para eluição da proteína por definição do gradiente salino. Para os ensaios, foi utilizada resina de troca aniônica Q-sepharose® Fast flow (Sigma-Aldrich) suspensa em água (50% p/v). Alíquotas de 1 mL dessa resina foram transferidas para criotubos de 5 mL. Após decantação da resina, os sobrenadantes foram removidos, água deionizada foi adicionada para volume inicial, os tubos foram agitados e mantidos estáticos até decantação total da resina (Figura 9).

Após esse processo de lavagem, todo o sobrenadante foi descartado e 2,5 mL de tampão 20 mM (acetato de sódio (Synth) pH 4, 4,5, 5 e 5,5; Bis-Tris pH 6, 6,5 e 7; e, Tris (Sigma-Aldrich): 7,5, 8 e 8,5) foram adicionados aos respectivos tubos. A solução foi agitada em vórtex e após decantação da resina o sobrenadante foi removido e esse procedimento repetido por mais duas vezes para garantir a troca total da solução do meio. Após essa etapa, todo o sobrenadante foi retirado e adicionado 0,5 mL do tampão e 0,5 mL da amostra (solução composta por 0,25 mL do respectivo tampão adicionados de 0,25 mL da solução enzimática). Cada uma das soluções foi mantida em agitação em agitação MII (Biomixer) durante 10 min e o sobrenadante utilizado para ensaio de atividade de endoglucanase e de avaliação das bandas de proteínas liberadas por meio de técnica de eletroforese SDS-PAGE 10% (4.6.1).

Foram testadas também, as eluições da proteína com soluções de NaCl a 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e 1

M. Avaliação das bandas de proteínas liberadas por meio de técnica de eletroforese SDS-PAGE (4.6).

Figura 9. Estratégia de purificação com as amostras de endoglucanase em tubos de 5 mL com resina de troca aniônica Q-Sepharose® Fast Flow (Sigma-Aldrich).



Fonte: Autoria Própria

4.8.4. Cromatografia líquida por troca aniônica

A etapa de purificação foi processada por cromatografia líquida de alta performance (FPLC) em sistema Äkta Purifier (GE Healthcare Life Science). Essa etapa de purificação foi realizada por troca aniônica, em coluna aberta 16/12 contendo resina Q-sepharose® Fast Flow (Sigma-Aldrich). Aproximadamente 10 mL de amostra pré-tratada e filtrada foi injetada na coluna com auxílio do *super loop* de 10 mL. O tampão de equilíbrio e carregamento utilizado foi Bis-Tris 20 mM pH 6, definido nos ensaios do item 4.8.3. Após a injeção a coluna foi lavada com cinco volumes de coluna com o mesmo tampão e iniciado o gradiente linear de sal, de 0 a 500 mM de NaCl (de acordo com a concentração selecionada no item 4.8.3), utilizando-se tampão de eluição Bis-Tris 20 mM, 500 mM de NaCl pH 6, usando vinte volumes de coluna, em fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$. As amostras eluídas foram coletadas em volume de 1 mL, usando detector de UV a 280 nm. Nas frações correspondentes aos picos visualizados no cromatograma foi avaliada a atividade de endoglucanase. As alíquotas com atividade foram liofilizadas e o grau de pureza analisado

em eletroforese SDS-PAGE 10% (4.6). Após purificação, as frações proteicas foram dialisadas para remoção do sal presente na amostra.

4.8.5. Diálise das frações da enzima

A diálise processou-se em solução tampão Bis-Tris 20 mM pH 6, a 4° C, utilizando-se membrana de policarbonato de 25 mm com tamanho de poro de 12 kDa (Sigma-Aldrich), sob agitação suave. Foram realizadas três trocas da solução tampão, a primeira após 2 h, a segunda após 6 h e a terceira após 16 h. Alíquotas das amostras foram utilizadas para detecção da atividade de endoglucanase e o volume restante armazenado a -20 °C para posteriores testes.

4.8.6. Cromatografia líquida por exclusão molecular– Gel filtração

As frações eluídas da coluna de troca iônica, após diálise, foram aplicadas em coluna de exclusão molecular HiPrep Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Sciences), com 320 mL, pré-empacotada, 26 x 600 mm, acoplada em sistema Äkta Purifier (GE Healthcare Life Science). Após o equilíbrio com três volumes de coluna e tampão Bis-Tris 20 mM pH 6, aproximadamente 10 mL de amostra foi injetada na coluna utilizando-se o *super loop* de 10 mL. A cromatografia processou-se com 1,5 volume de coluna em fluxo linear utilizado de 1,0 $mL.min^{-1}$. As frações eluídas foram coletadas em microtubos com alíquotas de 2 mL.

4.9. Caracterização da endoglucanase

4.9.1. Determinação da molaridade de tampão mais adequada para a dosagem de atividade da enzima

A solução de substrato com 4% de CMC foi preparada inicialmente em tampão acetato de sódio pH 5 a 25, 50 e 100 mM. A atividade de endoglucanase foi medida durante 10 min de reação a temperatura de 80 °C.

4.9.2. Determinação da melhor condição de armazenamento da enzima

Testes de armazenamento após a purificação da proteína foram realizados. Assim, a enzima pura foi estocada por 24 h em diferentes condições: refrigerador (5 °C), congelador (-20 °C), congelador (-80 ºC) e nitrogênio líquido (-196 ºC). Após esse período, a atividade de endoglucanase foi medida a 50 mM de acetato de sódio pH 5,0, usando como controle, a atividade da enzima antes do armazenamento. As atividades residuais foram apresentadas em valores percentuais.

4.9.3. Determinação do tempo apropriado para reação de endoglucanase

Tempos de reação de 0, 2, 5, 10 e 15 min foram testados para determinação do tempo adequado de reação, tomando por base os trabalhos com endoglucanases relatados por Dave et al. (2015), Kaur et al. (2007), Kaur et al. (2015) e Chuan Wei et al. (2015). A solução de CMC 4% foi preparada em 50 mM de acetato de sódio pH 5, e a incubação ocorreu a 80 °C.

4.9.4. Tempo de estabilidade em temperatura ambiente

Foram realizados ensaios visando dados sobre a estabilidade da enzima a temperatura ambiente. O volume de 1 mL foi deixado sobre a bancada durante 30 dias a temperatura ambiente (aproximadamente 24 ºC), a qual foi mensurada por termômetro a cada 3 dias. O ensaio controle foi realizado no dia ‘0’ e novo ensaio era realizado a cada 3 dias (72 h).

4.9.5. Caracterização bioquímica da endoglucanase de *R. emersonii* S10

4.9.5.1. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima

Os perfis de atividade em função da variação da temperatura de incubação e do pH da mistura reacional foram obtidos utilizando solução

de CMC 4% em soluções tampão de 50 mM, tempo de reação enzimática de 10 min. O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi ensaiado empregando-se quatro diferentes soluções tampão (pH 3 - 5: acetato de sódio; pH 6 e 6,5: MES (Sigma-Aldrich); pH 7 e 7,5: HEPES (Sigma-Aldrich); pH 8 - 9,5: glicina (Sigma-Aldrich); pH 10 e 10,5: CAPS(Sigma-Aldrich)) a 80 °C.

O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima foi avaliado incubando-se a mistura reacional entre 40 e 95 ºC. A mistura reacional constou de solução de 4% de CMC em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, por 10 min.

4.9.5.2. Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato

O efeito do pH sobre a estabilidade da endoglucanase foi estudado diluindo-se as enzimas nas soluções tampão de investigação a 100 mM, de tal modo que a concentração final do tampão fosse de 50 mM. Após diluição, as linhagens foram mantidas por 24 h à temperatura de bancada (24 ºC). Os valores de pH testados foram: pH 3 - 10,5, com meia unidade de variação (pH 3– 5,5: acetato de sódio; pH 6 e 6,5: MES; pH 7 – 7,5: HEPES; pH 8 – 9,5: glicina; pH 10 e 10,5: CAPS). Alíquotas da enzima foram removidas e ensaiadas nas condições ótimas da enzima e os valores de atividade residual (%) obtidos por comparação com a atividade da enzima antes do tratamento.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima foi avaliado incubando-se alíquotas da solução enzimática por 1 h em banho com temperatura entre 40 e 90 ºC, com variações de 5 ºC. A atividade remanescente foi quantificada a 60 e 85 ºC, em pH 4,0.

O mesmo ensaio foi repetido na presença de íons Hg na concentração de 1 mM, visando o estudo de uma possível desestabilização das ligações dissulfeto e expondo o sítio ativo da enzima. A atividade remanescente foi quantificada a 85 ºC e pH 4,0. A

atividade remanescente foi expressa como percentagem da atividade da enzima antes do tratamento térmico.

4.9.5.3. Efeito de íons, solventes, detergentes e quelantes sobre a atividade de endoglucanase

O efeito dos íons K^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} (Dinâmica), Cu^{2+}, Mn^{2+} (Merck), Fe^{3+}, Cd^{2+}, Hg^{2+} e Ag^{3+} (Sigma-Aldrich) apresentados como cloretos, foram avaliados nas concentrações de 1 mM e 5 mM no meio reacional. Os efeitos do agente quelante EDTA (Merck), detergentes Tween 20, DMSO (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), SDS (Synth) e o compostos β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) foram avaliados nas concentrações de 0,1% (v/v) e 0,25% (v/v) no meio reacional. A reação enzimática ocorreu a 24 ºC por 30 min. As atividades relativas foram obtidas por comparação com o controle, ou seja, na ausência dos químicos e convertidas em valores percentuais. Para o controle, a enzima foi diluída em água na mesma proporção que utilizada nos ensaios.

4.9.5.4. Efeito de compostos orgânicos sobre a atividade da enzima

O efeito inibitório dos compostos orgânicos foi avaliado em diferentes concentrações tomando por referência dados da literatura (100 µM, 200 µM e 1 mM/mg de proteína pura). Os compostos testados foram ácido tânico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido acético, ácido 4-hidroxibenzóico, 5-hidroximetilfurfural e furfural. A atividade de endoglucanase foi determinada imediatamente após a combinação desses compostos com as enzimas e o substrato, sem exposição prévia. O controle foi realizado pela determinação da atividade enzimática na ausência de inibidores, porém nas mesmas condições de diluição, temperatura e pressão, e será usado como referência para calcular a perda da atividade ou não da enzima na presença dos compostos (XIMENES et al., 2010; KIM et al., 2011).

4.9.5.5. Especificidade pelo substrato e parâmetros cinéticos

A especificidade de substrato foi determinada utilizando-se CMC, xilana (Sigma-Aldrich), Avicel® (Merck), celobiose (Sigma-Aldrich), pNPG e pNPX (Sigma-Aldrich) em concentrações de 1,0%.

Os parâmetros cinéticos *Km* e *Vmax* foram determinados em mistura de reação composta por 90 µL de tampão acetato de sódio 50 mM contendo 5 – 23 mg/mL de CMC a pH 4,0 e 10 µL da solução enzimática, incubada a 85 ºC durante 10 min. A variação da velocidade inicial em função da concentração de substrato foi representada graficamente de acordo com o método de Michaelis-Menten (1913). O cálculo dos parâmetros *Km* e *Vmax* foi realizado por ajuste não linear de parâmetros no programa OriginPro 9.0 (OriginLab).

4.9.5.6. Termodinâmica da termoinativação irreversível

A análise termodinâmica da endoglucanase pura seguiu o protocolo proposto por Saquib et al. (2010), por meio da determinação da atividade enzimática utilizando CMC. Assume-se que, no esquema abaixo, “N” represente a conformação nativa e “D” a desnaturada, ou inativada, de acordo com o modelo de Daniel e Danson (2013), passível de reversão, seja medida a desnaturação irreversível, representada por “I”:

$$N \leftrightarrow D \rightarrow I \qquad (3)$$

4.9.5.7. Caracterização quanto à temperatura ótima, cálculo de Ea e Q_{10}

Os experimentos para determinação da temperatura ótima de atividade foram executados como no descrito no item 4.3.1. Os resultados foram apresentados em um gráfico de Arrhenius: logaritmo natural (ln) da atividade em U/mL vs. 1000/T, na qual T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin. A energia de ativação (Ea) em $kJ.mol^{-1}$ foi calculada a

partir do gráfico acima descrito pela equação 4, na qual R corresponde à constante geral dos gases, 8,314 $J.K^{-1}.mol^{-1}$:

$$Ea = -(inclinação.R) \quad (4)$$

Por outro lado, o coeficiente de temperatura (Q_{10}) foi calculado pela equação 5.

$$lnQ10 = \frac{Ea.10}{R.T^2} \quad (5)$$

A temperatura ótima em graus Celsius foi calculada pela equação 6, na qual 'x' é o ponto de inserção das retas ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius.

$$\text{T ótima} = \left(\frac{100}{\text{x}}\right) - 273 \quad (6)$$

4.9.5.8. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível

A enzima foi incubada em diversas temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, e 90 ºC) por diferentes períodos (10 até 200 min). Depois de transcorrido o tempo, a amostra foi colocada em banho de gelo e posteriormente mantida *overnight* a 4 ºC para que as estruturas secundária e terciária se estabilizassem e qualquer dobramento reversível fosse refeito (SAQUIB et al., 2012). Os cálculos dos parâmetros foram realizados como descrito abaixo:

4.9.5.8.1. Determinação do k_d

Para o cálculo da constante de primeira ordem da taxa de desnaturação k_d foi feito um gráfico de ln da atividade residual vs tempo (min) para cada temperatura de incubação. Realizou-se o ajuste linear de cada curva para o cálculo do valor de inclinação, simbolizado por k_d (min^{-1}).

4.9.5.8.2. Tempo de meia-vida t½

O tempo de meia-vida, em minutos, foi estimado conforme descrito na equação 7:

$$\frac{t1}{2} = \frac{\ln 2}{kd} = 0{,}693/kd \quad (7)$$

4.9.5.8.3. Energia de ativação da desnaturação térmica Ea_d (J.mol^{-1})

Foi construído um gráfico de ln k_d vs. 1000/T, sendo a Ea_d calculada pela equação 8:

$$Ea(d) = -(inclinação.R) \quad (8)$$

4.9.5.8.4. Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_d (J.mol^{-1})

A entalpia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 9:

$$\Delta H(d) = Ea(d) - RT \quad (9)$$

4.9.5.8.5. Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_d (kJ.mol^{-1})

A energia livre de ativação de desnaturação térmica irreversível foi estimada pela equação 10, na qual k_b é a constante de Boltzmann (1,38 x 10^{-23}) e h a constante de Planck (6,63 x 10^{-34} J.s):

$$\Delta G(d) = -RT.\ln\left(\frac{kd.h}{kb.T}\right) \quad (10)$$

4.9.5.8.6. Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_d(J.mol^{-1})

A entropia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 11:

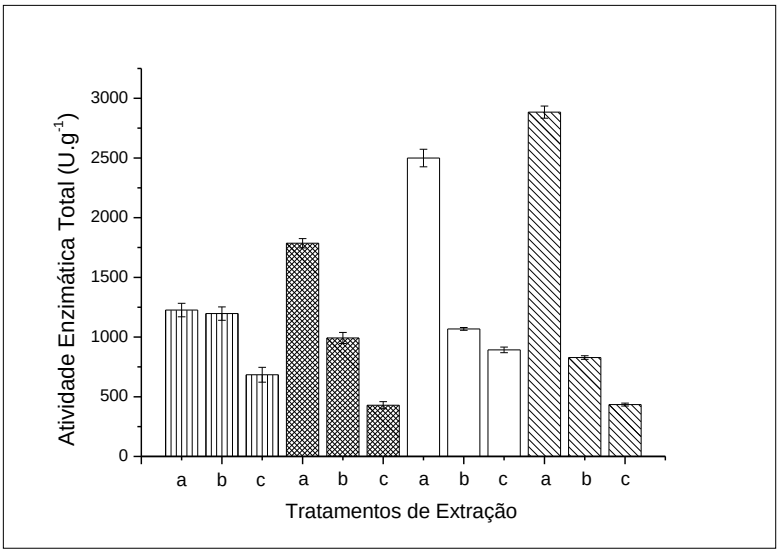
$$\Delta S(d) = \frac{\Delta Hd - \Delta Gd}{T} \quad (11)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de extração da enzima endoglucanase

Os perfis de extração da endoglucanase indicaram para um aumento do volume de água empregada como eluente para aumento da atividade enzimática total de enzima extraída (U/mL x volume eluente). O aumento no tempo de extração de 30 para 120 min não mostrou um aumento proporcional na enzima extraída (Figura 10).

Figura 10. Atividade enzimática total das soluções enzimáticas obtidas por diferentes condições de extração. 10:1 água/material fermentado (mL.g^{-1}) e 30 min de agitação; 10:1 água/ material fermentado (mL.g^{-1}) e 120 min de agitação; 30:1 água/ material fermentado (mL.g^{-1}) e 30 min de agitação; 30:1 água/ material fermentado (mL.g^{-1}) e 120 min de agitação; a – primeiro ciclo de extração; b – segundo ciclo; c – terceiro ciclo.



Fonte: Autoria Própria

A melhor resposta individual do teste mencionado foi observada pela primeira extração (a) do tratamento com proporções de 30:1 água/substrato (mL.g^{-1}) durante 120 min a 100 rpm. Nesta alíquota foi observado uma atividade total de 2884,4 U.g^{-1}, o qual não foi muito

diferente daquele obtido com 30:1 água/ material fermentado (mL.g^{-1}) e 30 min de agitação cuja atividade total foi de 2499,3 U.g^{-1}.

O experimento aponta que uma maior proporção de água/material fermentado apresentou maior capacidade de arraste das endoglucanases aumentando em mais de 100% a quantidade de enzima extraída no tratamento em relação a proporção de 10:1. Por outro lado, o aumento do tempo de 30 para 120 minutos, embora tenha levado também ao aumento da proteína extraída, não resultou em aumento suficiente para ser compensador, considerando custo/benefício do processo.

Em estudo realizado por Chen et al. (2011), com o objetivo de recuperação de uma inulinase, os autores relataram melhores resultados em condições de 20:1 líquido/sólido (g.mL^{-1}), utilizando como solvente o tampão acetato (0,1 M e pH 4,5) e agitação de 207 rpm durante 40 min. Para Pal e Khanum (2010), em condições otimizadas, a melhor recuperação de xilanase obtida foi utilizando água deionizada (10:1 água/substrato - g.mL^{-1}) a 200 rpm durante 60 min.

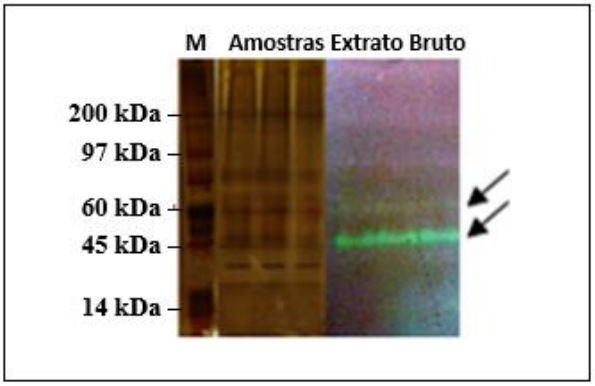
Na tentativa de otimizar a extração de proteases, Tunga et al. (1999) constatou que sua máxima recuperação ocorria a proporções de 5:1 solvente/sólido (mL.g^{-1}). O solvente utilizado foi uma mistura aquosa de etanol 10%. Neste caso, o maior tempo de incubação no solvente foi de 120 min, o qual exibiu atividade de 307 U.g^{-1}. Testando o número de lavagens para a recuperação completa da enzima, observou-se que as duas primeiras lavagens foram suficientes para a recuperação máxima das proteases.

Com base nos resultados, o tratamento escolhido para dar continuidade ao estudo foi composto pelas duas primeiras extrações do teste caracterizado pela proporção de 10:1 água/substrato (mL.g^{-1}) e 30 min de agitação.

5.2. Análise eletroforética de endoglucanases na solução enzimática bruta

A amostra previamente extraída, nas condições definidas nos ensaios descritos, foi analisada em gel SDS-PAGE 10% para visualização do perfil de bandas de proteínas e investigou-se também a presença de possíveis isoformas de endoglucanase por meio de zimograma (Figura 11), este, por sua vez, tratado pelo software *Photos* (Microsoft Corporation) para que as isoformas ficassem mais evidentes.

Figura 11. Perfis de bandas eletroforéticas referentes a endoglucanases presentes na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *R. emersonii* S10 em FES utilizando mistura (1:1:1) de farelo de trigo, palha de milho e bagaço de cana-de-açúcar por 240h. Esquerda: Gel SDS-PAGE 10% com visualização das bandas de proteínas reveladas pelo método de prata. Direita: Zimograma específico para detecção de atividade de endoglucanase em gel 10% mostrando duas isoformas da enzima de estudo (setas).



Fonte: Autoria Própria

O zimograma evidenciou duas bandas com atividade de CMCase, com massas moleculares estimadas em 45 e 60 kDa.

Muitos microrganismos produzem diferentes formas de uma única enzima, chamadas isoformas. Essas isoformas em eucariotos podem ser resultados de processamentos pós-tradução realizado por quebra proteolítica ou por diferentes níveis de glicosilação. Muitas vezes, esse processamento da proteína segue mecanismos induzidos pelas condições de cultivo. Por outro lado, alguns genes podem aparecer duplicados ou

mesmo haver a presença de genes diferentes expressando proteínas com funções similares (HERRERA et al., 2007).

A isoforma que apresentou banda de atividade mais evidente foi escolhida para dar continuidade ao trabalho.

5.3. Teste de clarificação da solução enzimática bruta

Os resultados obtidos a partir dos tratamentos de clarificação da solução enzimática bruta foram agrupados e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Clarificação da solução enzimática bruta usando caulim, carvão ativado e PEI, em pH 7.

	Proporção de clarificante ($g.mL^{-1}$)	**%**	**Volume de enzima inicial (mL)**	**Volume de enzima recuperado (mL)**	**Atividade inicial ($U.mL^{-1}$)**	**Atividade final ($U.mL^{-1}$)**	**Rendimento na atividade enzimática (%)**	**Absorbância (540 nm)**
S.E.B.	-	-	-	-	1,9	1,9	-	0,559
C.A. – c*	0,05	1	5 mL	3,8	1,9	1,9	100	0,210
C.A. – co*	0,05	1	5 mL	4,8	1,9	1,8	95	0,088
Caulim	0,05	1	5 mL	4,2	1,9	0	0	0,410
PEI	100 µL*	1	10 mL	9,2	1,9	0	0	0,399

S.E.B. – Solução Enzimática Bruta; C.A. – Carvão Ativado; c* - em centrífuga; co* - em coluna; 100 µL* - ($\mu L.mL^{-1}$).

Fonte: Autoria Própria

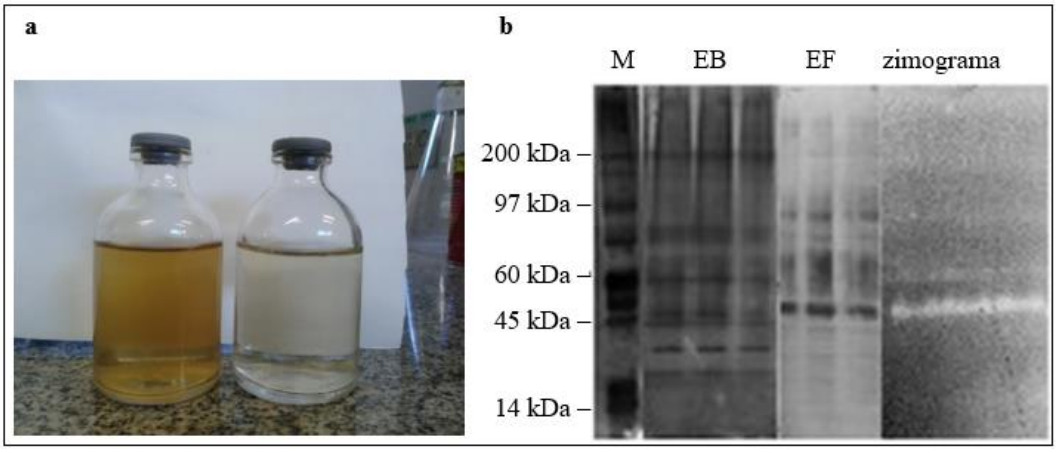
O melhor tratamento clarificante, considerando a recuperação da enzima e perda de cor da solução, foi com o carvão ativado. No pH usado (7,0) o carvão ativado encontra-se com carga zero, portanto, não houve interação iônica entre o material adsorvido e a matriz clarificante (JANKOWSKA et al., 1991). A retirada de compostos de cor e até inibidores de fermentação, por esse agente, é conhecida (CANILHA et al., 2008). A eficácia do tratamento com carvão ativado depende de diferentes variáveis durante o processo tais como pH, tempo de contato, temperatura e proporção de carvão ativado em relação ao volume de líquido e as interações que proporcionam essa adsorção são interações do tipo van der Waals (PRAKASHAM et al., 2009).

Para ambas metodologias testadas, tubo ou coluna, houve eficiência na clarificação. Deste modo, o tratamento com carvão ativado

em coluna foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. Ao passar por uma membrana no sistema de colunas, o produto final é recuperado livre de partículas contaminantes do próprio carvão ativado, diferentemente do processo por centrifugação. A segunda vantagem a ser destacada é o baixo custo desse agente clarificante, o que torna o método viável, não encarecendo a etapa de tratamento da solução enzimática. O resultado do tratamento é mostrado na Figura 12, onde é visualizada a diferença de coloração entre a amostra sem tratamento e a revelação do gel com as duas soluções.

Em relação aos outros agentes clarificantes testados, não foram detectadas atividades enzimáticas nos sobrenadantes recuperados após o tratamento com clarificantes caulim e PEI. O reagente caulim é derivado de silicatos de alumínio. A capacidade de troca catiônica de um aluminossilicato é a quantidade de íons, particularmente cátions, que este pode adsorver e trocar (CERQUEIRA, 1999). Portanto, em pH 7,0 a proteína de interesse deve ter apresentado carga negativa e interagiu com a matriz de carga positiva.

Figura 12. Efeito da clarificação da solução enzimática bruta**.** a) Diferença de coloração e turbidez entre a solução enzimática bruta não tratada (a esquerda) e a amostra tratada com carvão ativado em coluna (direita). b) Bandas eletroforéticas referentes a solução enzimática bruta (EB) e após o tratamento com carvão ativado em coluna (EF). M – marcador de peso molecular.



Fonte: Autoria Própria

O reagente polietilenoimina (PEI), um policátion em solução aquosa, também utilizado no tratamento de clarificação, assim como o caulim, reteve a enzima, confirmando que esta apresenta em sua superfície, resíduos de carga negativa. A presença de um aditivo aniônico pode inferir a adsorção da própria proteína, visto que em ensaios posteriores esta é adsorvida em resina de mesma natureza. Contudo, a carga líquida da proteína apenas será verificada em ensaios futuros, através da determinação de seu ponto isoelétrico.

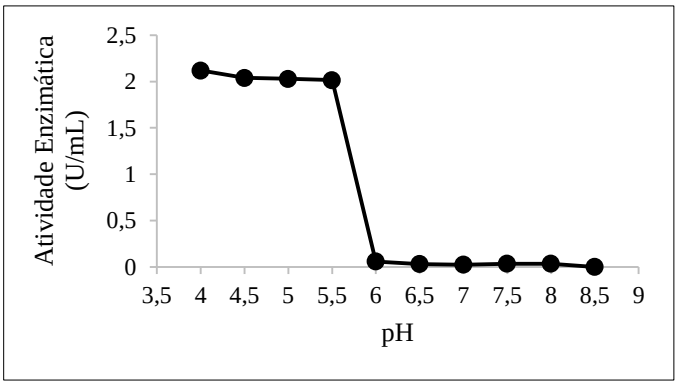
A diminuição de componentes de cor na solução enzimática facilita o processo de purificação subsequente. Outro zimograma foi realizado, dessa vez utilizando apenas amostras da solução filtrada, e foi confirmada a permanência das duas isoformas mesmo após o tratamento com carvão ativado.

5.4. Estratégia de purificação em ensaios em pequena escala

Nos ensaios de purificação em pequena escala, realizados para definir o percurso do processo de purificação da enzima, foi utilizada a resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow (Sigma-Aldrich). Essa resina possui grupos que formam trocadores de íons fortes (Q – Amônia Quaternária), que são completamente ionizados ao longo de um grande espectro de pH (WEISS, 2004).

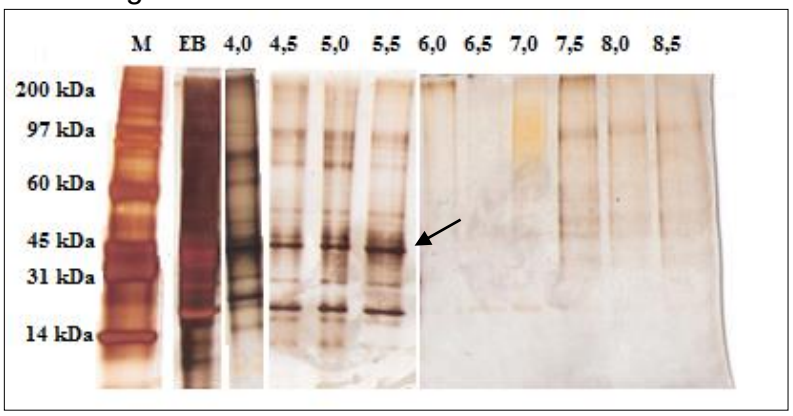
Após aclimatação da resina em diferentes valores de pH e adição de amostra proteica, como elucidado na seção 4.8, o sobrenadante foi retirado para testes de atividade enzimática e realização de géis, como mostrado nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Figura 13. Perfil de atividade enzimática dos eluatos obtidos de minicolunas de resina Q-Sepharose Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH.



Fonte: Autoria Própria

Figura 14. Perfis eletroforéticos dos eluatos obtidos de minicolunas de resina Q-Sepharose Fast Flow, equilibradas em diferentes valores de pH de testes. M – marcador de peso molecular; EB – solução enzimática bruta; seta – endoglucanase.



Fonte: Autoria Própria

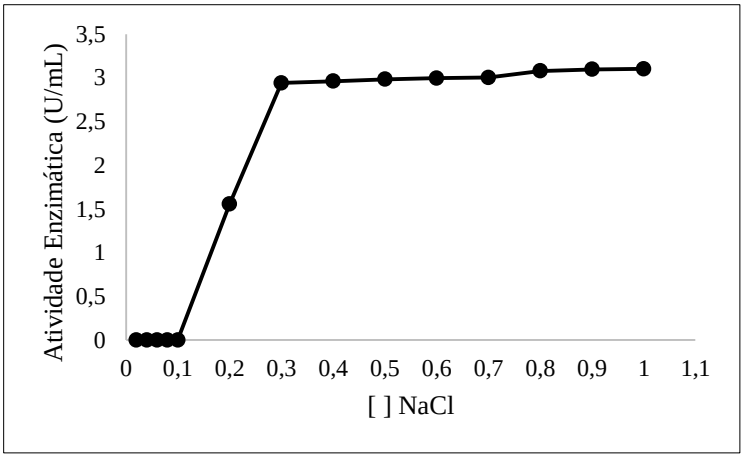
A partir do resultado visualizado, a região de pH em que houve maior ligação entre a enzima de interesse e a resina foi entre pH 6 e 8,5, dados estes corroborados pela análise em eletroforese SDS-PAGE e pela ausência de atividade enzimática da endoglucanase no ensaio em microplaca.

Considerando que, ao mesmo tempo em que a proteína é adsorvida, a maioria dos contaminantes também o são, a estratégia adotada a partir dessa etapa foi analisar qual era a concentração de NaCl

necessária para eluir seletivamente a proteína (Figura 13). Para tanto, a solução tampão selecionada para a próxima etapa foi reproduzida como no ensaio anterior, feita a partir de Bis-Tris em pH 6,0, o qual apresenta adsorção praticamente total da proteína, e adicionado de 500 mM de NaCl.

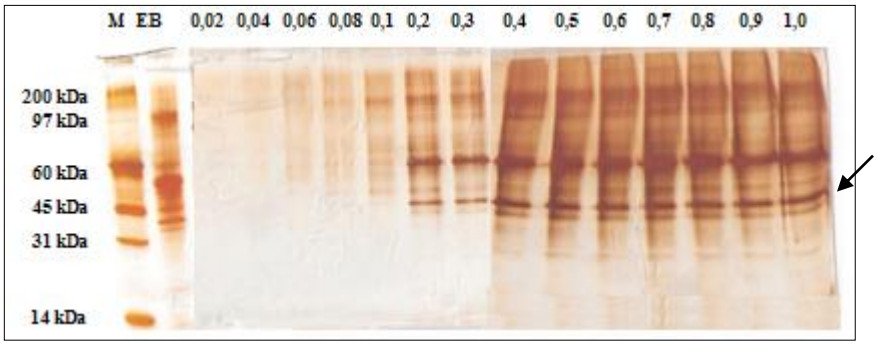
Para a finalização do teste piloto, foram preparados 14 tubos contendo a resina (devidamente ambientada nas condições citadas acima) e a amostra. Soluções com diferentes concentrações de NaCl (0,02 a 1 M) foram agregadas aos tubos e após agitação e decantação, o sobrenadante foi reservado para realização de atividades enzimáticas e análises em gel SDS-PAGE. Os dados estão expostos nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Figura 15. Perfil de atividade enzimática das alíquotas dos sobrenadantes frente ao gradiente salino com NaCl (0,02 a 1 M) usado para eluição da endoglucanase da coluna com resina Q-Sepharose Fast Flow.



Fonte: Autoria Própria

Figura 16. Gel SDS-PAGE ilustrando a etapa de eluição da proteína da resina Q-Sepharose Fast Flow no teste de purificação em pequena escala frente a simulação de gradiente salino linear com NaCl (0,02 a 1 M). M – marcador de peso molecular; EB – solução enzimática bruta; seta – edoglucanase.



Fonte: Autoria Própria

A enzima começou a ser eluída da resina a partir da concentração de 0,2 M de NaCl, como visualizado no gel e no perfil de atividade enzimática em microplaca ao mesmo tempo em que uma reduzida presença de contaminantes eluíram concomitantemente. Neste sentido, a concentração de 0,2 M foi escolhida para posterior cromatografia de troca aniônica em sistema FPLC (Äkta Purifier).

Assim, a partir dos resultados obtidos, foram estabelecidos os seguintes parâmetros para posterior protocolo de purificação: tampão Bis-Tris 0,02 M pH 6,0 - tampão de ligação ou tampão A; e tampão Bis-Tris 0,02 M pH 6,0 + 500 mM NaCl – tampão de eluição ou tampão B.

5.5. Purificação da isoforma selecionada da enzima endoglucanase

Após etapas de clarificação, ultrafiltração tangencial e filtração para a retirada de compostos indesejáveis, seguiu-se a purificação da enzima por meio de duas etapas cromatográficas e um processo de diálise intermediário para troca de solução tampão.

5.5.1. Cromatografia líquida por troca iônica – Troca aniônica

A purificação por troca aniônica da endoglucanase processou-se de forma muito semelhante ao teste em pequena escala. Foram injetados

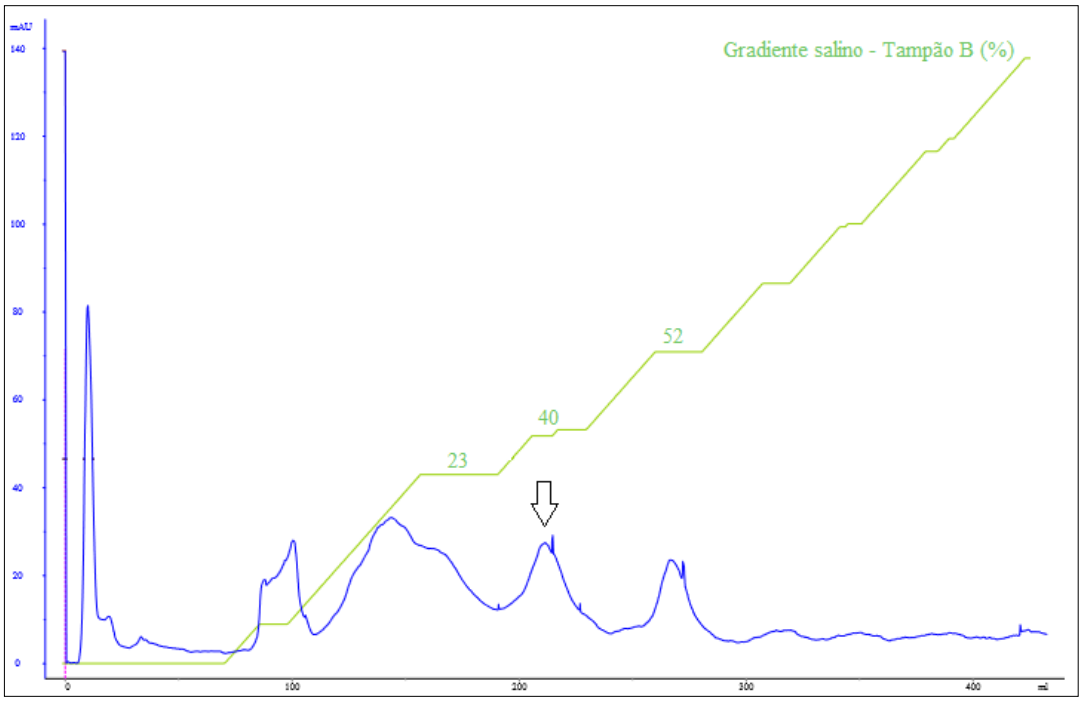
10 mL de amostra na coluna de troca aniônica, seguida de lavagem da coluna com 5 volumes de coluna (VC) com tampão A. Após isso, iniciou-se o gradiente linear de NaCl com o tampão B. O gradiente linear processou-se de 0% até 100% de tampão B e a cada novo pico a concentração de B era mantida pela ferramenta *Hold* (manter) do equipamento, até que o traço correspondente ao detector UV fosse estabilizada. A partir disso, a concentração de B voltava a aumentar gradativamente. A proteína foi eluída a partir de 0,2 M de NaCl, ou seja, 40% de B, como observado no teste em pequena escala. Todos os picos detectados pela UV, monitorada a 280 nm, foram coletados e as amostras foram devidamente armazenadas em banho de gelo para posteriores análises.

Ao todo, cinco picos foram observados no perfil cromatográfico obtido. A partir dos testes realizados, foi possível verificar que o pico contendo a proteína de interesse foi o terceiro a ser detectado (Figura 15), eluído a partir de 40% de B, após 200 mL de iniciado o processo. Dessa forma, assim como o esperado, a eluição da endoglucanase iniciou-se com 40% de B (Figura 17 – seta). Um total de oito tubos de 1 mL foram coletados no momento em que o referido pico foi detectado. Essas amostras também foram analisadas em gel SDS-PAGE para a identificação do perfil de contaminação da endoglucanase após a primeira etapa de purificação (Figura 17).

Como mostrado na Figura 17, a proteína investigada estava presente no pico identificado, o qual foi dividido em duas partes, identificadas como amostra A e B (Figura 18). Como verificado, a primeira metade do pico apresentou poucos contaminantes (amostra A). Nessa porção é possível visualizar que uma pequena porção da isoforma de 60 kDa ainda estava presente. Por outro lado, na segunda metade do pico (amostra B), a proteína de investigação foi eluída na ausência da isoforma de maior massa molecular, no entanto na companhia de um contaminante com massa molecular similar à isoforma de investigação. A partir desse

resultado, a estratégia foi separar essas amostras, da maneira especificada na Figura 17, para posterior etapa de diálise.

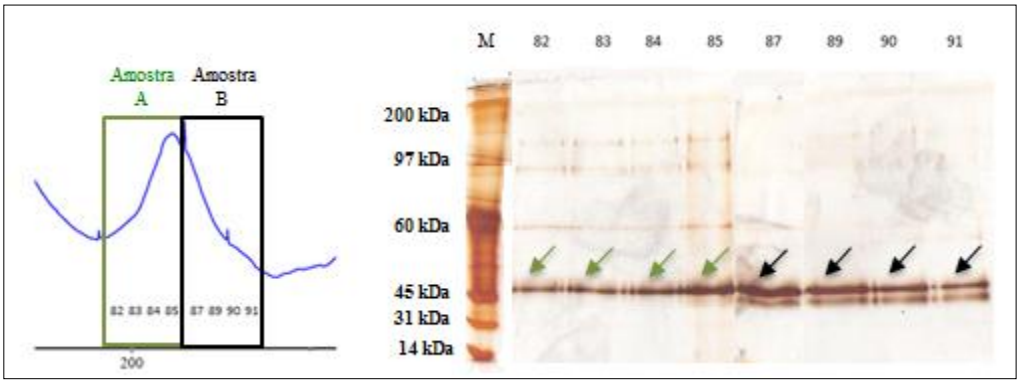
Figura 17. Cromatograma da purificação de uma isoforma da enzima endoglucanase de *R. emersonii* S10 por troca aniônica com resina Q-Sepharose Fast Flow realizada em sistema FPLC Äkta Purifier (GE Helthcare Life Sciences). Seta – representa o pico em que a proteína de interesse foi detectada.



Fonte: Autoria Própria

A solução contendo a proteína parcialmente purificada passou por processo de diálise em membrana de 12 kDa, devido à alta concentração de NaCl obtida pelo processo de cromatografia. As amostras A e B foram separadas como dito anteriormente e dialisadas em membranas distintas.

Figura 18. Gel SDS-PAGE das amostras provenientes das frações eluídas de coluna cromatográfica de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow com atividade detectadas. Setas e caixas verdes (A) e pretas (B) – apontam para a separação das amostras, as quais foram posteriormente dialisadas, separadamente, de acordo com o perfil de contaminação detectado.



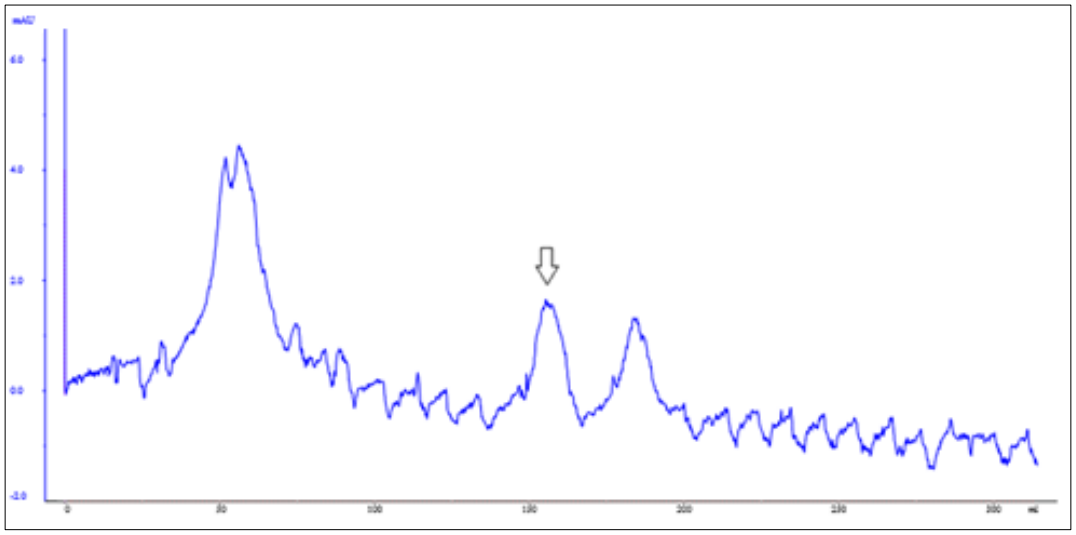
Fonte: Autoria Própria

5.5.2. Cromatografia líquida de exclusão molecular

Após o processo de diálise, as amostras A e B passaram por segunda etapa de purificação, sendo utilizada a técnica de exclusão molecular. A coluna utilizada foi a HiPrep Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Sciences), com poros entre 25 e 75 µm e potencial de separação por tamanho de 5 a 250 kDa de massa molecular) informações do fabricante).

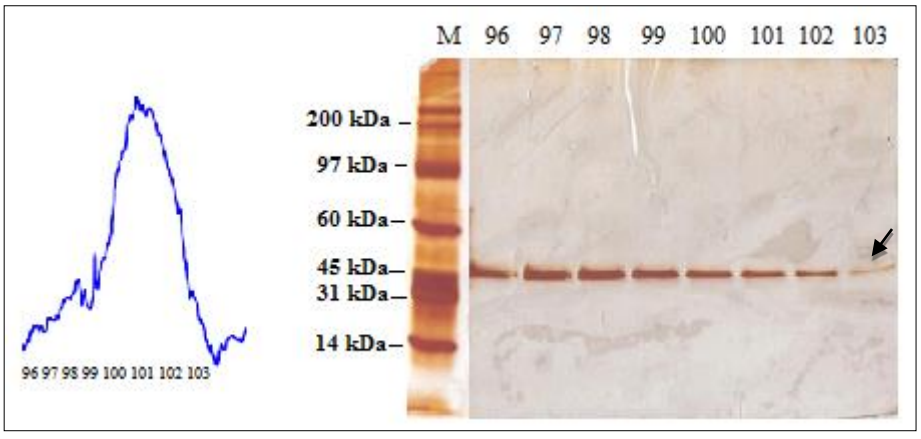
O processo de purificação por esse método foi executado separadamente para as amostras A e B. Após essa etapa, as frações eluídas foram devidamente armazenadas em banho de gelo e as atividades enzimáticas das frações determinadas, e também analisadas em gel SDS-PAGE 10%. O perfil cromatográfico de purificação da amostra A pode ser visualizado nas Figuras 19 e 20, e a seta na Figura 19 identifica o pico de eluição da endoglucanase de estudo.

Figura 19. Cromatograma obtido por cromatografia de exclusão molecular realizada em sistema FPLC Äkta Purifier (GE Helthcare Life Sciences) usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR da da amostra A, da isoforma da enzima endoglucanase de *R. emersonii* S10. Seta – representa o pico em que a proteína de interesse foi detectada.



Fonte: Autoria Própria

Figura 20. Pico cromatográfico e bandas eletroforéticas das frações com atividade de endoglucanase em cromatografia por exclusão molecular usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR - amostra A, e análise em gel SDS-PAGE das frações eluídas. Seta – indicando a proteína purificada; os números indicam os tubos em que as amostras foram coletadas.



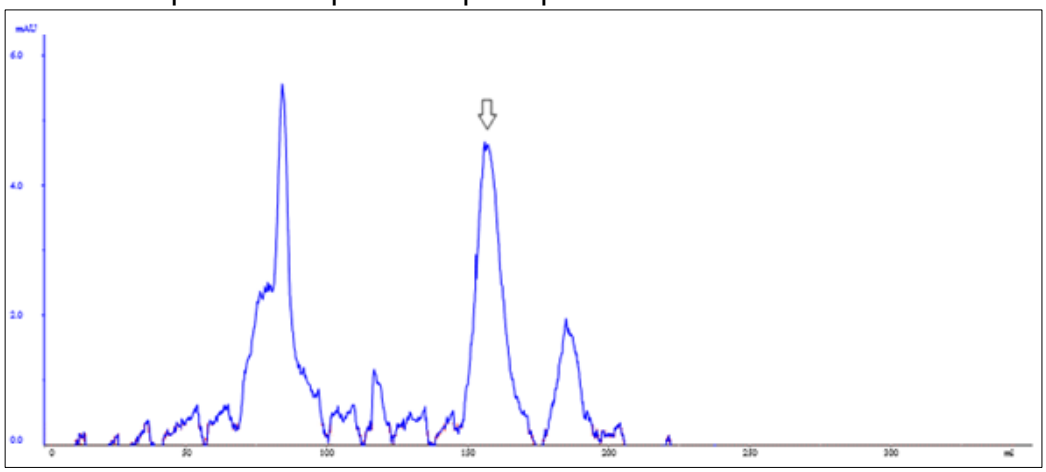
Fonte: Autoria Própria

Neste cromatograma foi possível distinguir três picos de proteínas sendo a atividade de endoglucanase apenas no segundo pico (Figura 19).

Por meio de do gel SDS-PAGE foi possível confirmar a existência de uma única banda proteica, em elevado grau de pureza, correspondente ao pico em que a enzima mostrou atividade (Figura 20).

Na etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular da amostra B, três picos também foram visualizados, assim como o cromatograma da amostra A, sendo determinada atividade de endoglucanase apenas no segundo pico como indicado pela seta na Figura 21. O gel representativo das frações eluídas no segundo pico está ilustrado na Figura 22.

Figura 21. Picos das frações em cromatografia de exclusão molecular em sistema FPLC, usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR – amostra B. Seta – representa o pico em que a proteína de interesse foi detectada.

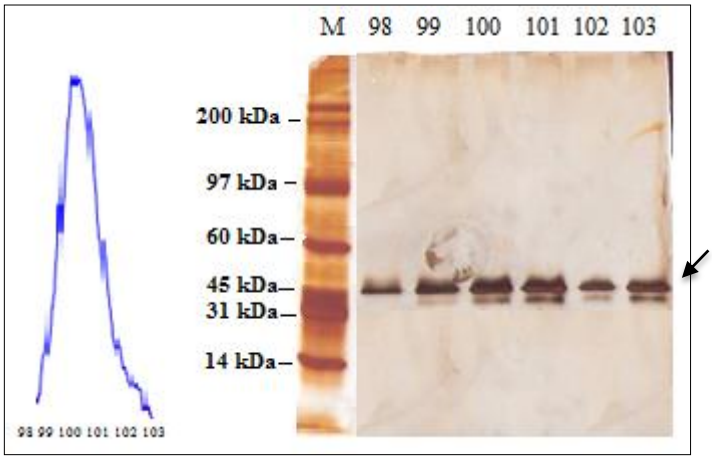


Fonte: Autoria Própria

O último gel revelou a não separação do contaminante, cuja massa molecular é muito próxima a da proteína de estudo. Devido ao fato de compartilharem essa característica, as mesmas foram co-eluídas. A coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Sciences) empregada neste método foi ineficaz ao separar as proteínas presentes na amostra B. Uma possível alternativa para aumentar o rendimento do método seria empregar uma coluna da mesma natureza porém com maior poder de separação. A porção de endoglucanase parcialmente purificada

da amostra B foi utilizada em ensaios que não demandavam altos níveis de pureza da proteína, como pH e temperatura ótimos e estabilidade.

Figura 22. Pico cromatográfico e bandas eletroforéticas das frações com atividade de endoglucanase, cromatografia por exclusão molecular usando coluna HiPrep Sephacryl S-200 HR - amostra B. Seta – indicando a proteína purificada; os números indicam os tubos em que as amostrasforam coletadas.



Fonte: Autoria Própria

A tabela de purificação foi construída revisando todas as etapas e os seus respectivos dados, como atividade enzimática, quantificação de proteína total, grau de pureza e rendimento do processo, considerando apenas enzima da amostra A (Tabela 5).

Tabela 5. Síntese do processo de purificação de uma isoforma de endoglucanase de *R. emersonii* S10.

Etapas	Volume (mL)	Proteina Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Especifica ($U.mg^{-1}$)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Solução enzimática bruta	206	252,6	600,3	2,4	1	100,0
Carvão Ativado	200	48	588	12,3	5,2	98
Ultrafiltração	41	16,4	225,5	13,8	5,8	37,6
Troca Iônica	24	10,8	106,8	9,9	4,2	17,8
Diálise	27	8,1	89,1	11	4,6	14,8
Exclusão Molecular	24	3,1	52,8	16,9	7,1	8,8

Fonte: Autoria Própria

Analisando a tabela de purificação, fica claro a grande diminuição dos valores de proteína total (de 252,6 para 3,1 mg) concomitante ao aumento da atividade específica (de 2,4 para 16,9 $U.mg^{-1}$), tomando como parâmetros a solução enzimática bruta como início e a enzima purificada como término. A metodologia aplicada mostrou um rendimento de 8,8% enquanto que o fator de purificação foi de 7,1.

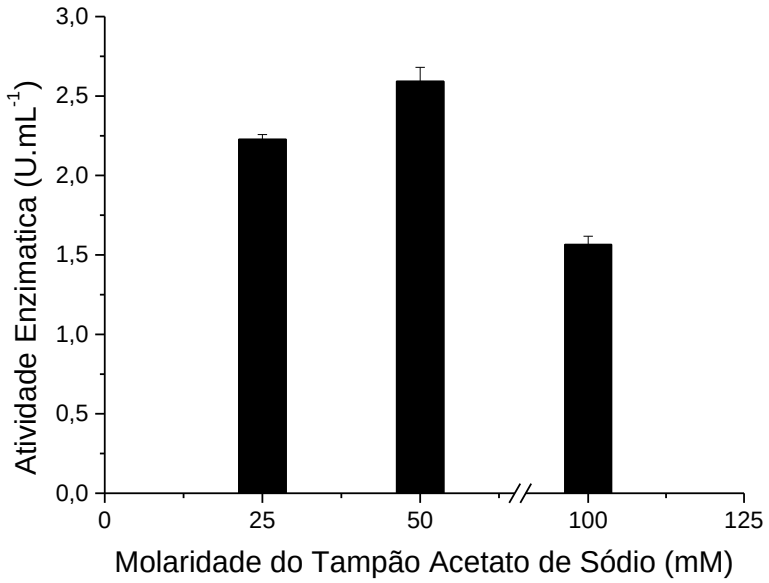
Considerando que o trabalho foi realizado a partir de expressão homóloga da proteína, ou seja, sem utilizar os mecanismos de clonagem e expressão em vetores, as poucas etapas necessárias para a purificação da enzima foi um resultado interessante. Trabalhos como o de Kaur et al. (2007), tendo como objetivo o mesmo do atual estudo, purificou uma endoglucanase a partir do fungo termofílico *Melanocarpus* sp. e encontrou valores de rendimento de 8,9% e um grau de purificação de 9, números próximos aos do presente trabalho, porém, utilizou maior numero de etapas no processo de purificação. Narra et al. (2014) também mostrou taxas semelhantes ao purificar uma endoglucanase de *Aspergillus terreus*, como rendimento de 13,71% e grau de purificação mais baixo, em torno de 3,49.

5.6. Definição de parâmetros apropriados para a determinação de atividade da endoglucanase purificada da amostra A

5.6.1. Concentração (molaridade) adequada do tampão

Visando à otimização das condições de reação de determinação da atividade enzimática da endoglucanase, primeiramente foi realizado um teste utilizando tampão acetato de sódio em diferentes molaridades para a composição do meio reacional (Figura 23).

Figura 23. Efeitos das diferentes concentrações de tampão (25, 50 e 100 mM) na atividade de endoglucanase purificada.



Fonte: Autoria Própria

Os dados da Figura 23 mostram que tampão acetato em concentração molar entre 25 e 50 mM foi mais adequado para a determinação da atividade. Por outro lado, a atividade quantificada a 100 mM de tampão foi de 1,55 $U.mL^{-1}$, mostrando um grande decréscimo em comparação à condição ótima do ensaio. Deste modo, todos os ensaios de atividade posteriores foram realizados na concentração de 50 mM do tampão acetato de sódio.

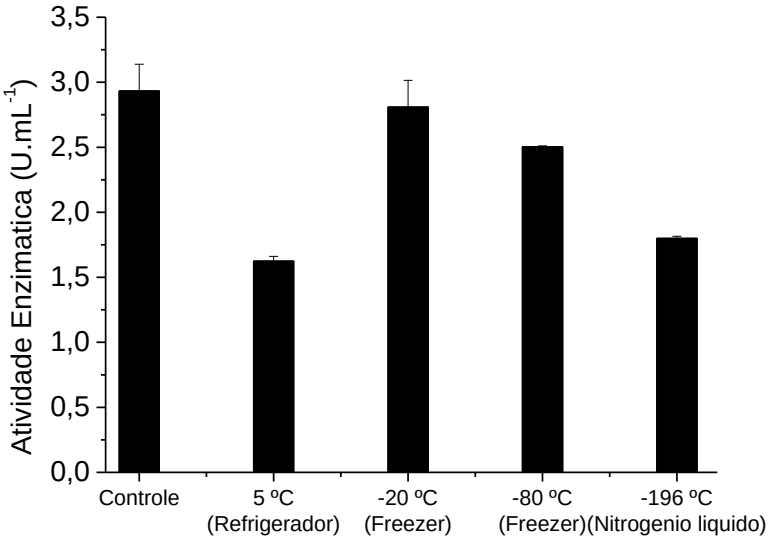
5.6.2. Avaliação do efeito do armazenamento em diferentes temperaturas sobre a atividade da enzima purificada

A estocagem da enzima sob condições que preservem melhor sua atividade é muito importante, tanto para a pesquisa em laboratório quanto numa possível aplicação tecnológica. Com o objetivo de estabelecer a melhor temperatura de armazenamento utilizou-se temperaturas de refrigeração (5 ºC) e de congelamento em freezer (-20 e

-80 ºC) e em nitrogênio líquido (-196 ºC) por 24 h. Todos os resultados foram comparados com a referência de atividade enzimática ‘Controle’, mensurada antes da armazenagem. Os resultados são mostrados na Figura 24.

A amostra armazenada em congelador -20 ºC mostrou a menor perda de atividade, apresentando aproximadamente 95% da atividade original. O armazenamento a -80 ºC preservou 85% e o Nitrogênio líquido (-126 ºC), 61% da atividade original. A estocagem sob refrigeração (5 ºC), mostrou-se ineficiente para a preservação da enzima, em perda de 45% de atividade. Com esses dados, a enzima purificada passou a ser estocada em congelador a -20 ºC, em tubos de 2 mL contendo alíquotas com 1 mL de amostra para evitar descongelamentos e recongelamentos.

Figura 24. Efeito da temperatura de armazenamento durante 24 h sobre a atividade da endoglucanase de *R. emersonii* S10 purificada.



Fonte: Autoria Própria

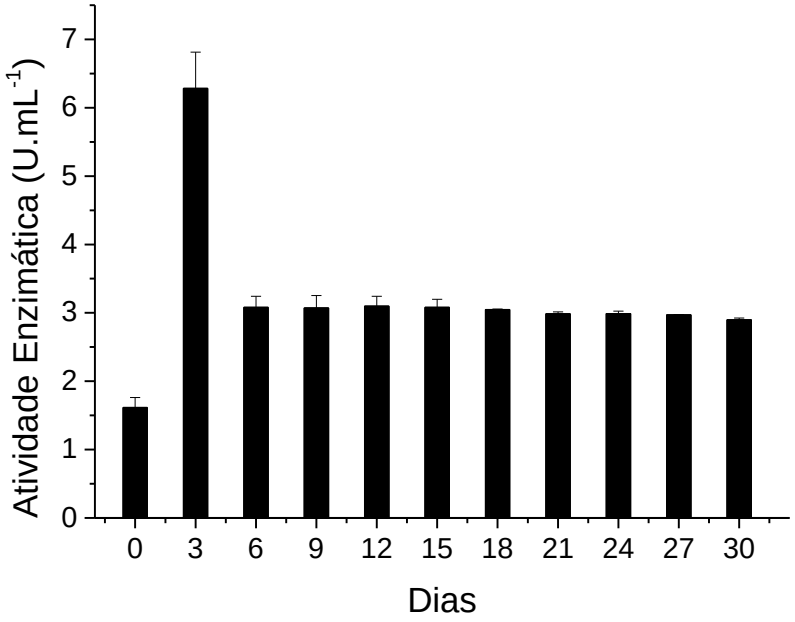
5.6.3. Avaliação do tempo de preservação da atividade da enzima purificada quando mantida em temperatura ambiente

A estabilidade de bioprodutos candidatos à produção em larga escala é elemento fundamental para que sejam submetidos a condições

de plantas industriais. Além de temperatura e pH, o intervalo de tempo em que a proteína consegue manter sua atividade sem a necessidade de refrigeração economiza espaço, energia, tempo e investimentos.

A grande maioria das proteínas, principalmente mesofílicas, necessita de refrigeração constante para manutenção de sua atividade. Contudo, algumas enzimas termofílicas, conforme discutido no presente trabalho, possuem maior estabilidade em temperaturas em torno de 24 ºC ou mais elevadas (STUTZENBERGER e LUPO, 2007), como é visto na Figura 25.

Figura 25. Efeito do tempo de estocagem da endoglucanase de *R. emersonii* S10 purificada em temperatura ambiente (aproximadamente 24 ºC).



Fonte: Autoria Própria

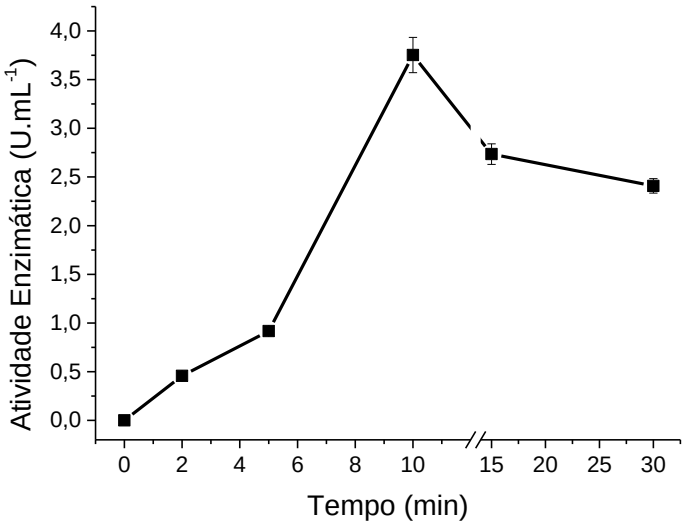
Conforme mostra a Figura 25, após 3 dias de manutenção da enzima em temperatura ambiente variando entre 23 e 25 ºC houve uma ativação de cerca de 4 vezes o valor dos ensaios controles, realizados no primeiro dia. Contudo, a partir do sexto dia, a atividade diminuiu em relação à ativação mensurada no dia 3, porém ainda duas vezes maior que a atividade verificada no dia 0. Essa estabilidade a temperatura

ambiente (aproximadamente 24 ºC) é um aspecto favorável ao emprego desta proteína em bioprocessos. Como mostra a figura, a partir do sexto dia até o trigésimo, sua atividade enzimática tornou-se invariável, caindo apenas cerca de 6%.

5.6.4. Tempo de reação enzimática da endoglucanase

O tempo ótimo para a reação de atividade enzimática de endoglucanase foi analisado. A Figura 26 mostra os resultados obtidos para este ensaio.

Figura 26. Influência do tempo de reação (0, 2, 5, 10 e 15 min) na atividade enzimática da endoglucanase purificada de *R. emersonii* S10.



Fonte: Autoria Própria

Ficou evidente que o tempo de reação de 10 min, como utilizado para a enzima em sua forma bruta (Rosa, 2014), é adequado também para a enzima purificada, realizado por quando a proteína ainda estava submetida à solução enzimática bruta. Wang et al. (2014) também determinou 10 min como o melhor tempo de reação para sua endoglucanase de purificada. Tempos de reação diferentes têm sido reportados na literatura, variando entre 10 e 30 min (MURRAY et al.,

2001; SAHA, 2004; OYEKOLA et al., 2007; ELVAN et al., 2010; DHAR et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

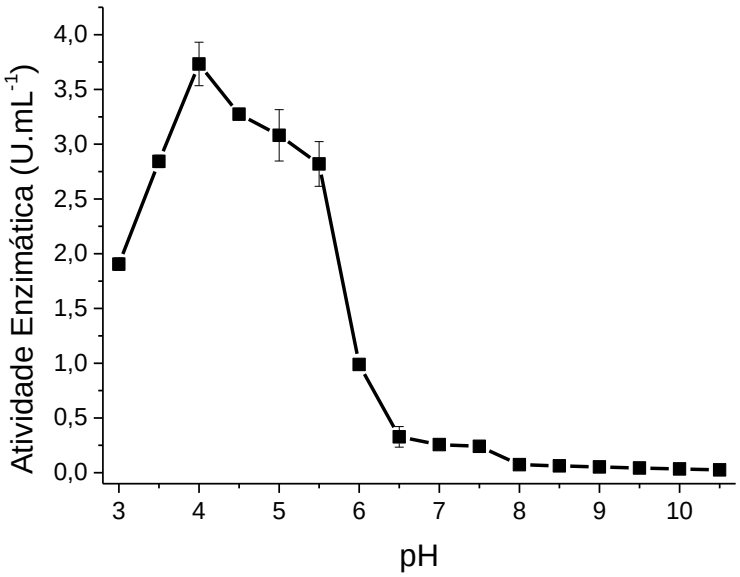
Esse resultado mostra mais uma vantagem da endoglucanase em estudo, com um tempo reacional menor que a maioria das endoglucanases estudadas.

5.7. Caracterização bioquímica da endoglucanase de *R. emersonii* S10

5.7.1. Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade da enzima

O pH em que a enzima se mostrou mais ativa foi 4 (Figura 27).

Figura 27. Efeito do pH (3 a 10,5) sobre a atividade da endoglucanase purificada, com reação enzimática realizada a 80 ºC, utilizando tampão acetato de sódio (pH 3 – 5,5), MES (pH 6 e 6,5), HEPES (pH 7 e 7,5), glicina (pH 8 – 9,5) e CAPS (pH 10 e 10,5) acrescido de CMC a 4%.



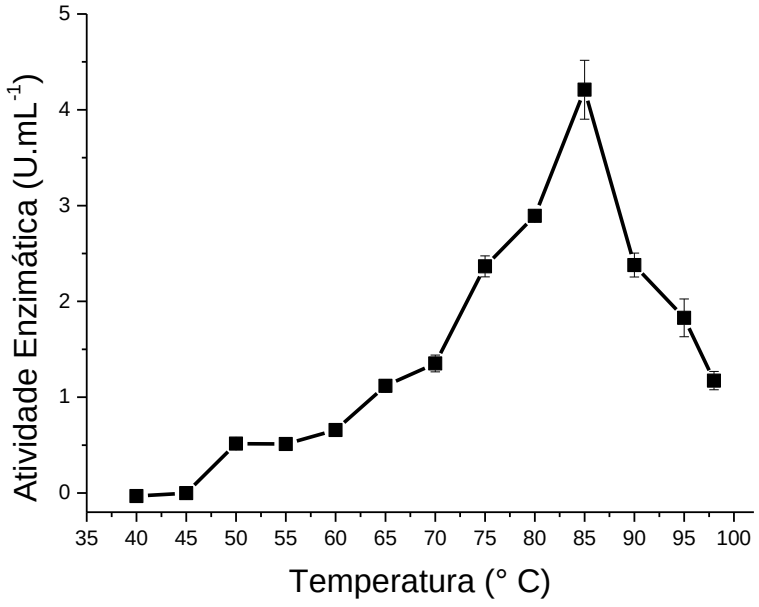
Fonte: Autoria Própria

O valor obtido acima mostrou conformidades com outros estudos com endoglucanases. Murray et al. (2001), determinaram pH de 4,8, para a maior atividade de endoglucanase produzida também por uma linhagem de *R. emersonii*. Wang et al. (2014), trabalhando com a expressão

heteróloga de endoglucanase de *T. emersonii* CBS394.64 encontrou o valor de pH ótimo em 4,5. Dave et al. (2015), purificando uma endoglucanase de *Thermoascus aurantiacus*, notaram que a proteína estudada apresentava melhor performance em pH 4. Na exposição de seus dados, Saha (2004), ao purificar uma endoglucanase do fungo *Mucor circinelloides*, obteve um valor de pH ótimo de 5,0, mas observaram atividade de 80%, tanto em pH ácido (3,0), como básico (8,0). Além disso, vários outros trabalhos apontam que fungos termofílicos apresentam enzimas extracelulares com atividades ótimas em meios ácidos (KHANDKE et al., 1989; GOMES et al., 2000; LEGGIO, LO; LARSEN, 2002).

Ensaios sobre o efeito da temperatura sobre a atividade da enzima confirmaram sua característica termofílica, que apresentou maior atividade a 85 ºC (Figura 28).

Figura 28. Efeito da temperatura de incubação sobre a atividade da endoglucanase da isoforma purificada. A reação ocorreu em pH 4,0, utilizando tampão acetato de sódio a 50 mM, contendo 4% de CMC, por 10 min.



Fonte: Autoria Própria

Em trabalho prévio, Rosa (2014) observou que a maior atividade de endoglucanase na solução enzimática bruta ocorria em 80 ºC. Entretanto, a solução enzimática bruta apresentava pelo menos duas endoglucanases diferentes, conforme mostrado no presente trabalho, o que poderia levar a essa diferença de temperatura ótima.

Também utilizando a espécie *T. emersonii*, (CBS 814.70), Murray et al. (2001) encontraram temperatura ótima para a endoglucanase estudada em 80 ºC. Em trabalho semelhante, porém utilizando o processo de expressão heteróloga, utilizando o fungo *T. emersonii* (sinonímia de *R. emersonii*), Wang et al. (2014) clonaram e expressaram a endoglucanase TeEgl5A em *Pichia pastoris* e encontraram valores de temperatura ótima em 90 ºC. Essas diferenças podem ser devido à purificação de diferentes isoformas, ou obtenção da enzima com diferentes níveis de glicosilação, o que poderia influenciar na resposta de reação da enzima à temperatura. Tem sido reportado que glicosilações aumentam a termofilia das enzimas e que o meio de cultura, o tipo de fermentação usado e o organismos que está expressando a proteína, podem influenciar no nível de glicosilações (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008).

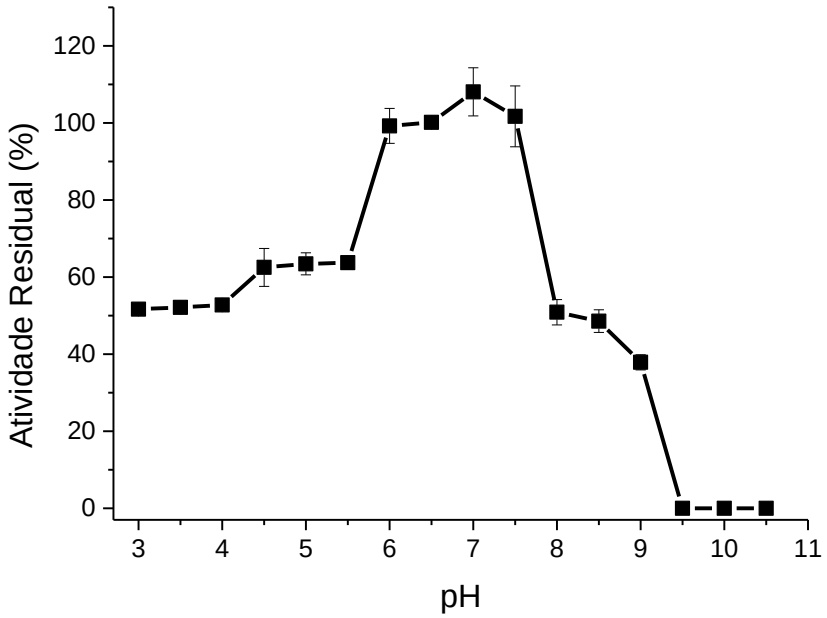
Resultados obtidos com uma endoglucanase produzida por *Aspergillus niger* demonstrou que a temperatura em que a mesma proteína se mostrou mais ativa foi a 55 ºC (PHAM et al., 2012), e, a celulase de *Aspergillus nidulans* mostrou temperatura ótima para a atividade enzimática a 70 ºC (KAUR et al., 2015).

5.7.2. Efeitos do pH e temperatura sobre a estabilidade da enzima quando em ausência de substrato

Enzimas estáveis em ausência de substrato são muito importantes, principalmente quando se visa à aplicação industrial, visto que o ambiente de aplicação pode variar, e quanto mais estável nessas condições, mais adequada será a enzima, ao processo ao qual se destina (DOBREV e ZHEKOVA, 2012). A Figura 29 ilustra o perfil de

estabilidade para da endoglucanase em estudo frente a diferentes valores de pH da solução em que está diluída.

Figura 29. Efeito do pH sobre a estabilidade da endoglucanase purificada quando em ausência de substrato.



Fonte: Autoria Própria

Os resultados acima mostraram que a enzima não foi estável em faixa ampla de pH, preservando função catalítica (100%) entre os valores 6 e 7,5. Na faixa de pH entre 4,5 e 5,5, a enzima apresentou atividade residual de 60%. Em outras faixas de pH ácido ou alcalinos (3 - 4 e 8 - 8,5) perdeu cerca de 50% da atividade inicial. Em pH 9,0 ainda manteve 40% da atividade, mas esta foi totalmente perdida em pH acima desse valor (Figura 29).

Dobrev e Zhekova (2012) reportaram que endoglucanase do fungo *A. niger* B03 apresentou-se estável em pH 3 enquanto que em pH 7 ela foi completamente inibida. Pol et al. (2012) estudando enzima de *A. poniphilum* MS 20 observaram preservação da atividade acima de 80% na faixa de pH entre 4 e 6.

Em trabalho recente de Wang et al. (2014), a endoglucanase do fungo *T. emersonii* expressa de maneira heteróloga mostrou preservação da atividade acima de 80% na faixa de pH entre 1 e 6, e acima de 60% entre 7 e 10

Por comparação com outros trabalhos, é possível classificar a presente enzima como potencial para ser empregada em bioprocessos, pois durante 24 h mostrou considerável atividade na faixa de pH entre 6 e 7,5 e perda de apenas 50% em valores como 5,5 e 8, enquanto que quando submetidas às mesmas situações, outras endoglucanases pesquisadas em diversos trabalhos, mostram-se menos estáveis. Por outro lado, quando comparada a estudos com foco em expressões heterólogas, a proteína aqui investigada mostra-se menos estável em relação a uma grande variação de valores pH. Isso pode ser explicado por possíveis alterações ocasionais ou induzido por bases nitrogenadas (manipulação do DNA) que podem ocorrer nesse tipo de expressão.

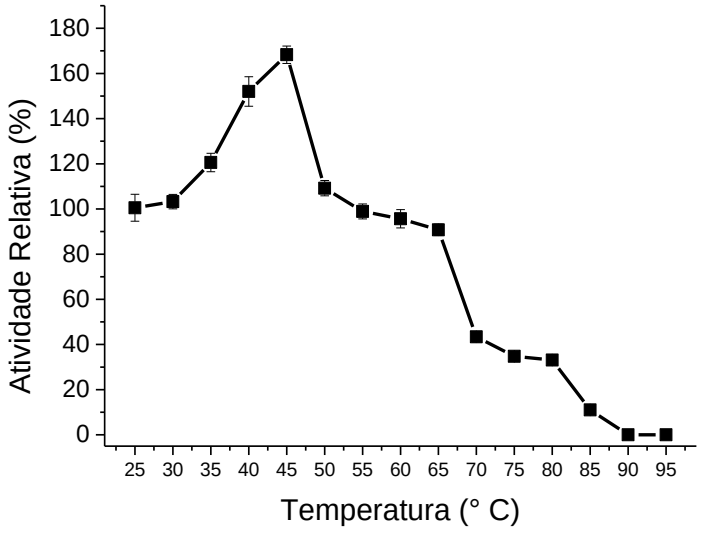
Após testes revelarem em quais valores de pH a proteína estudada mantém-se funcional, ensaios foram realizados com o objetivo de indicar sua estabilidade frente a diferentes temperaturas. As atividades enzimáticas remanescentes foram ensaiadas em temperaturas de 60 e 85 ºC buscando-se avaliar o nível de termoestabilidade da proteína. Figura 28 mostra os perfis de atividades residuais ensaiadas a 60 ºC (Figura 30 – a) e a 85 ºC (Figura 30 – b).

Os dados mostram que houve termoativação quando a enzima foi mantida durante 1 h a temperaturas entre 35 e 60 ºC. Quando a atividade residual da enzima foi determinada a 60 ºC nota-se uma maior ativação da enzima mantida a 45 ºC, aumentando a atividade da enzima em aproximadamente 70%, enquanto que, quando a atividade residual foi determinada a 80 ºC, a maior ativação foi a 40 ºC (58%). Entretanto, nota-se que a temperatura de reação de 85 ºC permitiu observar que a ativação ocorreu até 60 ºC. É provável que temperaturas entre 35 e 60 ºC alterem favoravelmente a conformação da proteína termofílica, a qual é

mantida no meio reacional incubado a 85 ºC, enquanto que o resfriamento a 60 ºC alteraria essa conformação, diminuindo a evidenciação da ativação térmica ocorrida na ausência do substrato.

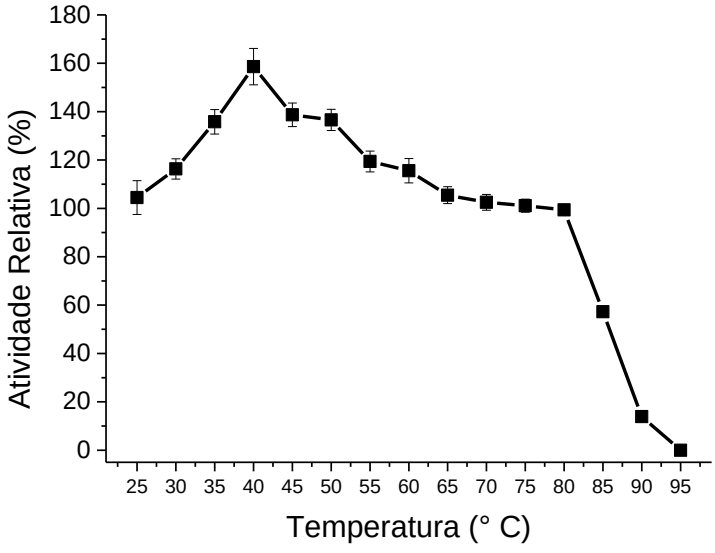
Figura 30. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da endoglucanase purificada quando em ausência de substrato com atividade enzimática determinada a 60 ºC (a) e 85 ºC (b) e mantida a diferentes temperaturas durante 1 h.

a)



Fonte: Autoria Própria

b)



Fonte: Autoria Própria

Uma endoglucanase de *R. emersonii* reportada por Murray et al. (2001) após submetida a 70 e 80 ºC durante uma hora perdeu sua atividade em 35% e 90%, respectivamente, sugerindo não se tratar da mesma enzima deste estudo, visto a diferença na termoestabilidade.

Segundo Immanuel et al. (2007), algumas celulases comerciais possuem ótima estabilidade térmica até 60 ºC, porém poucas proteínas comerciáveis se enquadram em condições de termoestabilidade tão específicas quanto a presente neste estudo. Nos dados apresentados por Narra et al. (2014), ao trabalhar com uma endoglucanase homóloga de *A. terreus*, mostram que a proteína exibiu 100% de atividade residual quando aquecida a 60 ºC durante 240 min.

Os dados aqui apresentados nos permite inferir que a endoglucanase em estudo é uma enzima altamente termoestável e que depende de ativação térmica. Enzimas ativadas após choque térmico têm sido descritas (SHEN et al., 2012).

Ao trabalhar com uma endoglucanase do actinomiceto *Thermomonospora curvata*, Stutzenberger e Lupo (2007) perceberam certa ativação de sua enzima ao submetê-la a 70 ºC durante 25 min. Sua atividade foi aumentada em 50%, o que foi significativo, porém não atingiu a estabilidade aos 60 minutos. Sua endoglucanase perdeu mais de 50% da atividade quando mantida durante 60 min a 70 ºC.

Neddersen e Elleuche (2015) submeteram uma enzima quimera constituída por uma endoglucanase de uma bactéria termofílica e uma β-glicosidase proveniente de uma representante arqueobactéria, as quais foram submetidas a diferentes temperaturas durante 60 min. Seus melhores resultados foram taxas de ativação próximas a 30%, em temperaturas entre 65 e 70 ºC.

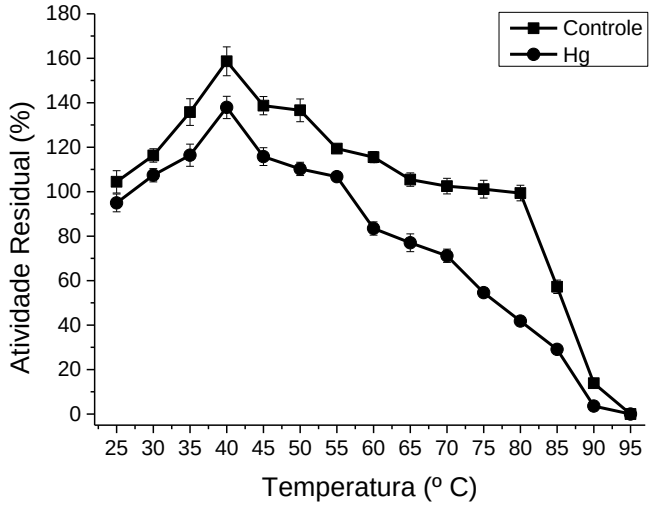
O perfil termoestável da endoglucanase aqui descrita é inédito e de muito interesse biotecnológico, visto que buscam-se enzimas potenciais para desenvolvimento de coquitéis enzimáticos para diversas aplicações,

principalmente na sacarificação de celulose para produção de bioetanol (DIAS, 2013).

Informações sobre a estrutura dessa enzima permitirão compreender melhor seu mecanismo catalítico e ou seus determinantes de estabilidade térmica. Essas informações serão obtidas em projeto em continuidade, a partir da clonagem e expressão heteróloga da sequência desta endoglucanase em *E. coli*, a cristalização e resolução da estrutura, além da modelagem computacional.

Devido ao seu perfil de termoestabilidade, termoativação e alguns resultados prévios apresentando melhor performance na presença de íons metálicos, um novo ensaio de termoestabilidade foi realizado mensurando seu desempenho na presença de Hg (Figura 31). A teoria proposta inicialmente foi que íons Hg^{+} pudessem desestabilzar ligações dissufelto da proteína, expondo mais facilmente seus sítios-ativos, proporcionando maiores valores de atividade enzimática (TORCHINSKII e DIXON, 1974).

Figura 31. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da endoglucanase purificada quando em ausência de substrato e em presença de íons Hg^{2+} (1 mM). A enzima foi mantida nas diferentes temperaturas por 1h e a atividade residual determinadas a 85 ºC.



Fonte: Autoria Própria

Os dois perfis são semelhantes para as amostras mantidas em temperaturas de até 55 ºC, porém, a partir dessa temperatura, a proteína mantida em presença de Hg^{2+} mostraram-se menos termoestável com perdas de até 60% da atividade entre 60 e 80 ºC, faixa de temperatura em que a enzima controle (em ausência de Hg^{2+}) manteve 100% da atividade inicial. Esses dados indicam que as pontes dissulfeto são um dos componentes importantes da temoestabilidade da enzima.

5.8. Efeito de íons, solvente, detergentes, e quelantes sobre a atividade de endoglucanase

As interferências de íons, solventes, detergentes e quelantes são mostradas na Tabela 6.

Os dados mostram que a enzima é ativada por cátions divalentes como Mn^{2+} e Mg^{2+}. Esse dado é corroborado pela inibição da enzima por EDTA a 5 mM. Observa-se também, ativação por K^{+}. Em estudos semelhantes, Tao et al. (2010) observaram também a ativação de 30% da endoglucanase quando em contato com 4 mM de $MnCl_2$ durante 30 min.

Por apresentar alta taxa de ativação, é possível que o íon manganês seja requisito para uma atividade enzimática (CHINEDU et al., 2011,CHAUVAUX et al., 1995).

Um resultado a ser destacado é a inibição da enzima por Ca^{2+}. Vários trabalhos têm reportado a dependência ou ativação de endoglucanases por ions cálcio. Hultin e Wanntorp (1966), ao estudarem uma celulase a partir de amostras de intestino de ouriço-do-mar, notaram grande ativação da enzima na presença desse íon. Shahriarinour et al. (2011) também aumentaram seu rendimento de celulases ao incrementar seu meio reacional com íons Ca^{2+}. Uma explicação para essa informação pode ser a existência de alguns sítios de ligação do íon na enzima, o que foi descrito por Chauvaux et al.

(1990). Ao se ligarem à enzima acarretam à diminuição de seu k_d, estabilizando sua conformação, assim aumentam a afinidade pelo substrato e sua termoestabilidade.

Tabela 6. Efeito de íons, detergentes, quelantes e agentes desnaturantes sobre a atividade da endoglucanase de *R. emersonii* S10. A atividade foi determinada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, a 85 ºC, por 10 min.

	Atividade relativa (%)			
Sem aditivo	**100,0** ±6,3			
	1 mM	DP	5 mM	DP
KCl	**103,0**	±8,5	**118,3**	±9,1
$MgCl_2$	**101,6**	±7,2	**149,8**	±2,2
$CuCl_2$	**84,9**	±0,6	**64,9**	±3,1
$MnCl_2$	**160,2**	±3,9	**168,9**	±2,0
$CaCl_2$	**48,1**	±0,7	**38,4**	±1,7
$FeCl_3$	**101,8**	±0,7	**60,2**	±1,3
$CdCl_2$	**71,0**	±3,4	**70,7**	±2,0
$HgCl_2$	**93,2**	±0,9	**-**	-
$AgNO_3$	**69,4**	±0,7	**-**	-
SDS	**53,1**	±3,8	**57,1**	±4,3
EDTA	**103,2**	±10,5	**35,4**	±2,6
	0,1%		0,25%	
Tween 20	**106,0**	±2,5	**102,7**	±1,3
Triton X-100	**104,5**	±1,4	**101,9**	±1,5
DMSO	**96,8**	±0,2	**63,6**	±3,1
B-mercaptoetanol	**104,6**	±1,6	**38,1**	±0,7

Fonte: Autoria Própria

Contudo, a inibição aqui observada mostra-se rara em outros trabalhos. Cunha (2012), ao testar efeito de íons cálcio sobre uma endoglucanase produzida a partir de *Streptomyces* sp., notou inibição de

aproximadamente 40%, e Silva (2008) ao caracterizar uma endoglucanase de *Aspergillus phoenicis* encontrou inibição de 30%.

Os metais pesados exerceram forte inibição à enzima. Inativação da enzima por 5 mM de Hg^{2+} corrobora dados de literatura que relatam que a maioria das celulases são inibidas por esse metal, como a endoglucanase investigada por Odeniyi et al. (2012), do fungo *T. virens*. Os metais pesados têm a capacidade de se ligar a grupamentos sulfidrilas de cisteínas ou glutationas, fazendo com que a proteína alvo perca parcial ou totalmente sua função (BLACKBURN et al., 1994). A presença de cisteína compondo o sítio ativo da proteína, ou em pontos estratégicos da definição da estrutura da molécula, justificaria esse efeito.

Os íons bivalentes de mercúrio oxidam grupos SH quebrando ligações dissulfeto e desestabilizam a proteína (JYOTSNA et al., 2015). Esse resultado confirma o apresentado anteriormente, e nossa hipótese de quebra de ligações dissulfeto pelo mercúrio aumentando a termolabilidade da proteína por facilitação do desdobramento da molécula.

Ao ser submetida a soluções contendo o detergente aniônico SDS, houve inibição de 43% da enzima. Este composto provoca alterações estruturais e conformacionais, rompendo as ligações não-covalentes das proteínas, causando sua desnaturação (BAJAJ et al., 2009).

5.9. Efeito de alguns compostos orgânicos derivados de biomassa lignocelulósica sobre a atividade da endoglucanase

Uma das aplicações mais visadas para as celulases está na sacarificação da biomassa vegetal para produção de etanol de segunda geração. Devido aos pré-tratamentos aplicados para a desconstrução da biomassa lignocelulósica, visando torná-la mais acessível às enzimas, alguns compostos orgânicos derivados dessa biomassa, principalmente

da degradação da hemicelulose e lignina, podem ser liberados e provocar inibição das enzimas na fase da sacarificação enzimática (JUNG et al., 2015). O principal derivado da decomposição da hemicelulose é o furfural, pela degradação das pentoses, e o 5-hidroximetilfurfural pela degradação das hexoses. O ácido acético é formado pela hidrólise de grupos acetil ligados aos açúcares.

A lignina é responsável pela formação de vários compostos fenólicos, tais como o ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferrúlico, ácido tânico, ácido levulínico, ácido fórmico, ácido gálico, entre outros (MAICHE e HUBER, 2010).

Desse modo, os efeitos de alguns desses compostos orgânicos, sobre a atividade da enzima foram avaliados (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito de compostos orgânicos sobre a atividade da endoglucanase de *R. emersonii* S10. A atividade foi determinada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, a 85 ºC, por 10 min.

	Atividade relativa (%)					
Sem aditivo	**100,0** ±4,1					
	100 µM	DP	200 µM	DP	1 mM	DP
Ácido Acético	**102,9**	±1,1	**106,2**	-	**107,8**	±2,9
Ácido Ferrúlico	**38,4**	±0,9	**32,7**	±1,1	**13,2**	±0,2
Ácido Tânico	**102,0**	-	**-**	-	**-**	-
Furfural	**103,0**	±2,1	**65,9**	±2,3	**-**	-
Ácido Fórmico	**98,6**	-	**108,3**	±1,4	**139**	±1,7
Ácido Levulínico	**96,1**	-	**97,0**	±1,8	**98,7**	±0,8
Ácido Gálico	**27,1**	±0,4	**-**	**-**	**-**	**-**
Ácido 4-hidroxibenzóico	**3,8**	-	**-**	-	**-**	-
5-Hidroximetilfurfural	**-**	-	**-**	-	**-**	-

Fonte: Autoria Própria

A atividade da endoglucanase não foi afetada pela presença dos ácidos levulínico, fórmico e ácido tânico (100 µM) no meio reacional. Quando em presença de furfural, houve ativação a 100 µM mas progressiva inibição em concentrações acima desta. Outros

componentes, como o ácido acético e o ácido fórmico afetaram a enzima de modo positivo, ativando-a.

Todos os outros reagentes inibiram a enzima mesmo em baixas concentrações. Ximenes et al. (2010) apresentam valores concordantes com o presente estudo, com exceção do ácido 4-hidroxibenzóico. Em seu estudo, esse composto diminuiu em 25% da atividade enzimática de endoglucanases comerciais. A endoglucanase do presente estudo mostrou-se muito mais sensível aos derivados da lignina do que as celulases utilizadas pelo autor citado.

5.10. Especificidade da endoglucanase por substratos e parâmetros cinéticos

A endoglucanase purificada foi submetida a ensaios para a detecção da especificidade pelo substrato. Foram testados CMC, avicel, celobiose, pNPG e pNPX a 1% e atividade determinada a 85 ºC e pH 4,0, Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Especificidade da isoforma purificada em relação aos substratos.

Substrato	Atividade relativa (%)	DP
CMC	**100**	±0,7
Xilana	**9,1**	±0,4
Avicel	**77,9**	±0,5
Celobiose	**1,8**	**-**
pNPG	**0,5**	**-**
pNPX	**0,5**	**-**

Fonte: Autoria Própria

A enzima apresentou atividade predominante na presença do substrato CMC (celulose amorfa). No entanto, a mesma também exibiu alto poder de hidrólise, na ordem de 78%, para o substrato Avicel®, o qual é formado por celulose microcristalina e também possui ligações β-1,4, porém em diferente conformação. Pelo fato de a porção cristalina da celulose ser altamente recalcitrante devido à ligação β-1,4 resultar de uma

rotação de 180º no momento de sua formação, as celobiohidrolases têm maior poder de clivagem, pois as ligações externas são mais acessíveis nesse substrato (KLOCK, 2013). Segundo Saranraj et al. (2012) enzimas com características de endoglucanase e celobiohidrolase são denominadas avicelase tipo I, porém mais dados são necessários para essa informação ser confirmada. Resultados semelhantes de degradação de celulose microcristalina foram obtidos por Rawat et al. (2015), porém em menores intensidades que as aqui apresentadas.

A enzima demonstrou atividade também sobre a xilana, podendo também identificar as ligações β-1,4 entre xilose. Celobiose, pNPG e pNPX foram hidrolisados em proporções mínimas (2,9%, 1,8%, 0,5% e 0,5%, respectivamente) indicando que a enzima além da ligação β-1,4 , reconhece a cadeia longa do substrato.

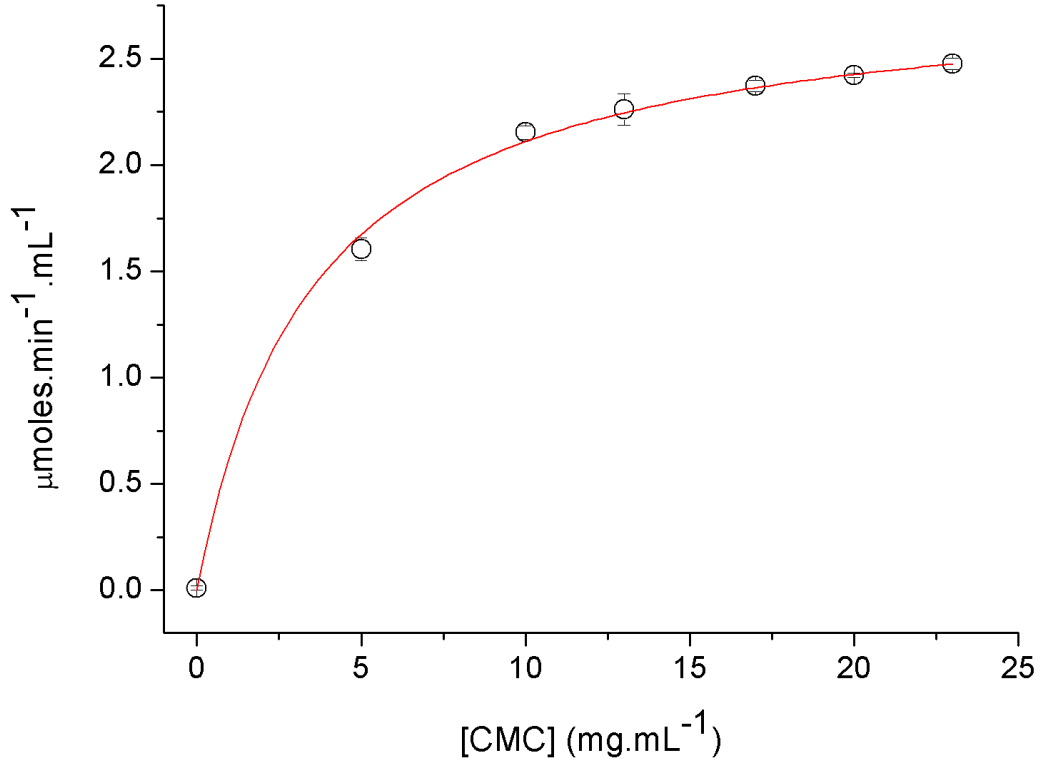
Por apresentar maior atividade frente à CMC, um substrato amorfo, porém com capacidade de atuar consideravelmente sobre regiões cristalinas da celulose, faz dessa enzima uma forte ferramenta a aplicação na sacarificação da lignocelulose.

Os parâmetros cinéticos foram obtidos a partir da mensuração das taxas de hidrólise de CMC em várias concentrações no momento da atividade enzimática. Anteriormente ao presente ensaio a concentração de substrato utilizada para todos os experimentos era de 40 mg/mL. Porém, ao realizar o teste de cinética e escolher valores diferentes de concentração de substrato, o resultado mostrou que a concentração utilizada não era o ótimo para a enzima (Figura 32).

Como indicado na Figura 32, a concentração adequada de substrato para as reações enzimáticas é de 23 $mg.mL^{-1}$. Essa concentração favorece as condições de trabalho, visto que o substrato CMC apresenta maior viscosidade em concentrações mais elevadas, além de apresentar valores de reação próximos ao escolhido. Outros trabalhos mostram que a concentração ideal de trabalho também fica por volta deste valor, como Huy et al. (2015) que utilizaram 20 $mg.mL^{-1}$, assim

como Dave et al. (2015) e Narra et al. (2014) que trabalharam na mesma concentração. Por isso, ficou estipulado a partir deste experimento que a concentração utilizada para a realização dos próximos experimentos será de 23 mg.mL^{-1}.

Figura 32. Curva de Michaelis-Menten da enfoglucanase purificada utilizando como substrato a CMC.



Fonte: Autoria Própria

Após a seleção da quantidade de substrato no meio reacional, a metodologia de Michaelis-Menten foi empregada para obtenção dos dados cinéticos. A constante *Km* e o *Vmax* foram determinados e dados obtidos em concentrações do substrato acima de 23 mg.mL^{-1} foram excluídos por não apresentarem confiabilidade devido à elevada viscosidade do meio reacional.

A isoforma de endoglucanase de *R. emersonii* S10 exibiu um *Km* de 3,53 ±0,32 mg.mL^{-1} e um *Vmax* de 2,86 ±0,04 µmol/min.mL^{-1}. Em investigações feitas por Kaur et al. (2007), a endoglucanase purificada,

expressa de maneira homóloga pelo fungo *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, apresentou valor de *Km* de 20 $mg.mL^{-1}$, ou seja, necessita de maior concentração de substrato para atingir seu melhor desempenho. Porém existem proteínas mais eficientes descritas na literatura, como a endoglucanase de *M. verrucaria*, que apresentou valor de *Km* de 0,5 $mg.mL^{-1}$ (HALLIWELL, 1965). Pol et al. (2012) ao purificar também uma endoglucanase, exibe um valor de *Vmax* de 72,5 µmol/min.mL.

5.11. Estudos termodinâmicos com a enzima purificada

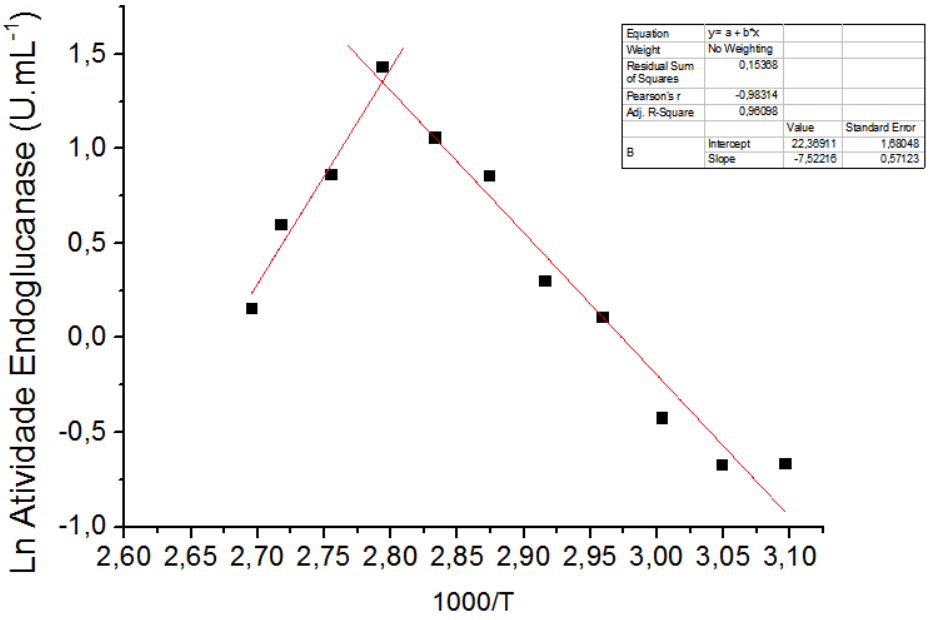
As análises e os cálculos dos parâmetros termodinâmicos de ativação descrevem as diferenças termodinâmicas entre o estado fundamental e o de transição fornecendo informações sobre a natureza do estado de transição, os requisitos de energia para o estado de transição e os mecanismos envolvidos nesse processo (GOLDBERG et al., 1993).

A partir da realização de testes de termodinâmica e sua desnaturação térmica irreversível, e por meio da curva de Arrhenius, representada na Figura 33, foi possível apontar a temperatura ótima de 85,3 ºC e sua energia de ativação 62,55 $kJ.mol^{-1}$. A energia de ativação corresponde à energia mínima necessária para a formação do complexo ativado, ou seja, da estrutura intermediária entre os reagentes e os produtos.

Outras endoglucanases, como a analisada no trabalho de Javed et al. (2009) requerem energias de ativação mais baixas, como 3,32 $kJ.mol^{-1}$, um valor bem abaixo do que o apresentado aqui, indicando que a endoglucanase purificada deve superar uma barreira energética muito maior para hidrolisar o substrato. Porém, quando comparada a endoglucanases como a investigada por Rajoka et al. (2003), que exibiu energia de ativação de 73,3 $kJ.mol^{-1}$, apresenta energia de ativação inferior.

O coeficiente de temperatura Q_{10}, que representa o aumento da velocidade a cada 10 graus da elevação da temperatura, também foi estimada em diferentes temperaturas, como visto na Tabela 9.

Figura 33. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (Ea) e temperatura ótima da endoglucanase purificada.



Fonte: Autoria Própria

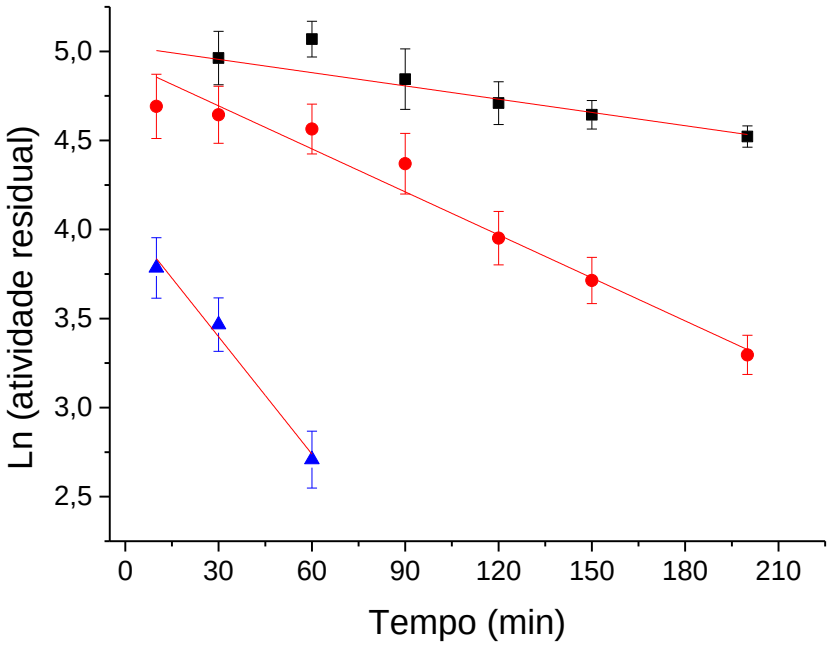
Tabela 9. Coeficiente de temperatura (Q_{10}) estimado com base no Gráfico de Arrhenius.

Temperatura (ºC)	Temperatura (K)	Q_{10}
40	313	1,56
50	323	1,44
60	333	1,36
70	343	1,31
80	353	1,27

Fonte: Autoria Própria

Os valores de Q_{10} apresentam um decréscimo das taxas conforme ocorre aumento de temperatura, decorrente de desnaturação térmica. A Figura 34 exibe faixa ampla de temperatura durante a transição irreversível entre o estado nativo e desnaturado.

Figura 34. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da endoglucanase purificada: 40 ºC (■), 80 ºC (●) e 90 ºC (▲).



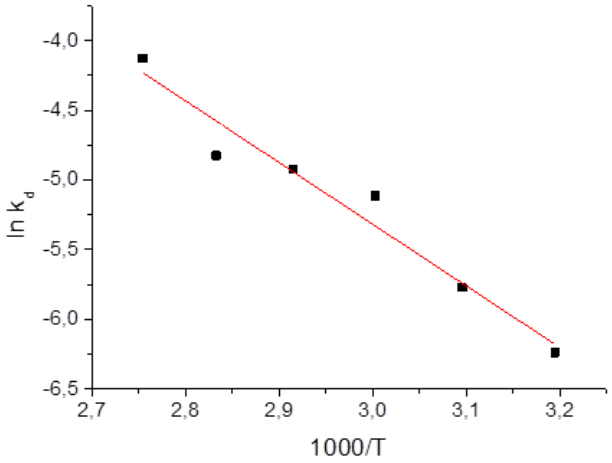
Fonte: Autoria Própria

A partir do gráfico de Arrhenius de primeira ordem (Figura 35) foi possível calcular os valores da energia de ativação da desnaturação térmica (Ea_d) da endoglucanase purificada: 36,75 $kJ.mol^{-1}$. Os demais parâmetros termodinâmicos encontram-se na Tabela 10.

De acordo com os dados apresentados na tabela, o tempo de meia vida mostra-se alto a 70 ºC, com 95,3 minutos, indicando possuir alta estabilidade estrutural quando mantida a essa temperatura. Quando comparada a endoglucanases termofílicas como a apresentada em Liu et al. (2006), a qual exibiu tempo de meia vida de apenas 15 minutos na mesmas condições de temperatura. Contudo, a endoglucanase purificada

por Jalal et al. (2014) mostrou-se superior, apresentando tempo de meia vida de 102 minutos a 85 ºC, enquanto que a presente enzima apresentou apenas 86,3 minutos a 80 ºC.

Figura 35. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (Ead) da endoglucanase purificada.



Fonte: Autoria Própria

Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos da termoinativação irreversível da endoglucanase purificada.

Temp (ºC)	Temp (K)	k_d (min^{-1})	t½ (min)	ΔH_d ($kJ.mol^{-1}$)	ΔG_d ($kJ.mol^{-1}$)	ΔS_d ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)
40	313	0,00114	355,4	34,14	94,41	-225,7
50	323	0,00148	222,8	34,07	96,81	-223,8
60	333	0,00287	115,1	33,98	98,06	-218,6
70	343	0,00539	95,3	33,90	99,29	-213,6
80	353	0,00776	86,3	33,82	100,20	-210,8
90	363	0,02318	43,0	33,73	100,85	-204,0

Fonte: Autoria Própria

Seguinte aos valores de tempo de meia vida, despontam os valores de ΔH_d, representando a quantidade de ligações não covalentes quebradas durante o processo de desnaturação da enzima. Quanto mais elevados os valores de ΔH_d, maior será o número de ligações não

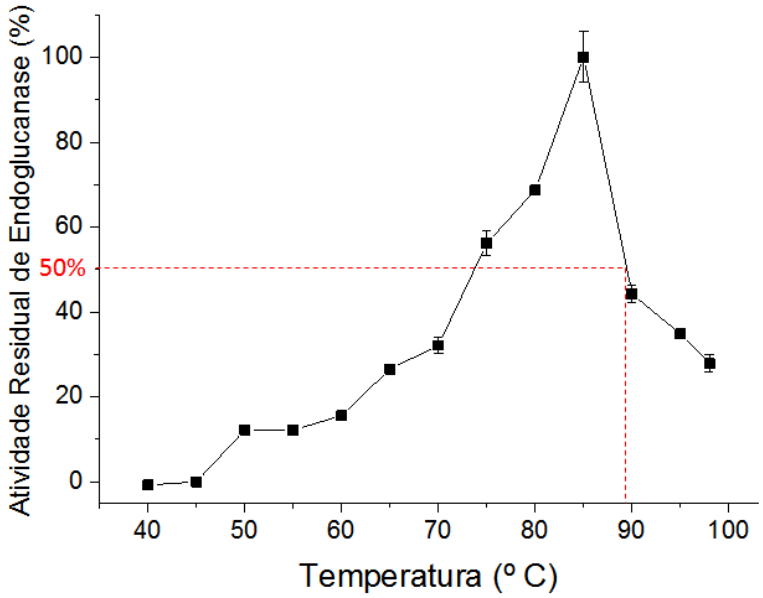
covalentes presentes na proteína. No atual estudo, os valores para este parâmetro estão na ordem de 33,98 kJ.mol^{-1} a 60 ºC, indicando alto índice de ligações não covalentes, representadas por o ligações de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e forças de van der Walls, todas elas conceituadas na estabilização de proteínas termoestáveis (ANFINSEN, 1973). A endoglucanase purificada por Javed et al. (2008), com ótimo de temperatura em 55 ºC, exibiu valor de ΔH_d em 0,59 kJ.mol^{-1}, enquanto que em mesma temperatura ótima, a proteína investigada por Jabbar et al. (2008) exibiu valor de entalpia de 33,5 kJ.mol^{-1}.

A energia livre de Gibbs (ΔG_d) é um parâmetro da termodinâmica associado diretamente à estabilidade da proteína, quanto maior o valor de ΔG_d, maior a estabilidade da enzima em função da temperatura (LONGO e COMBES, 1999). A endoglucanase purificada apresenta maior valor de ΔG_d na temperatura de 90º C, indicando maior estabilidade em maiores temperaturas. A partir deste resultado é possível identificar termoativação da enzima investigada.

Valores negativos para a entropia de ativação da desnaturação térmica (ΔS_d) indicam exposição de cadeias laterais apolares, causando ordenamento das moléculas de água na forma de clatratos (SIDDIQUI et al. ,1997). Proporcionalmente ao aumento da temperatura, os valores de entropia aumentam, indicando diminuição da organização da proteína por desnaturação, ao expor suas cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento da proteína (COBOS e ESTRADA, 2003). A partir dos valores encontrados, é possível inferir, ao comparar a presente enzima a outras endoglucanases termofílicas, a presença de um maior número de cadeias hidrofóbicas e consequentemente maior estabilidade estrutural. Jabbar et al. (2008), por exemplo, apresentou valores de entropia de -114 em 55º C, e Javed et al. (2008) -195 também a 55º C.

O perfil apresentando a temperatura de fusão Tm (*melting temperature*) da endoglucanase purificada pode ser visto na Figura 36.

Figura 36. Gráfico apresentando a temperatura de fusão Tm (*melting temperature*) da endoglucanase purificada.



Fonte: Autoria Própria

A temperatura de fusão Tm corresponde à temperatura na qual a atividade cai à metade de seu maior desempenho. Como pode ser visto no gráfico acima, a temperatura de fusão da endoglucanase purificada é de 89 ºC, ou seja, a essa temperatura a enzima possui 50% da sua função em condições ótimas. O valor mencionado representa um dado promissor frente a outras endoglucanases termofílicas, indicando maiores taxas de atividade (> 50%) que a endoglucanase purificada por Arpan et al. (2013), por exemplo, que possui uma temperatura de fusão de 73,5 ºC, e também outra endoglucanase investigada no trabalho de Sohail et al. (2014) que apresenta valores entre 64 e 65º C.

6. CONCLUSÕES

- Uma isoforma termoestável da enzima endoglucanase de *R. emersonii* S10 foi purificada pelas etapas de filtração em carvão ativado, ultrafiltração, cromatografia de troca aniônica, diálise e cromatografia de exclusão molecular.

- A maior atividade da enzima foi obtida em pH 4,0, 85,3 ºC e apresentou alta termoestabilidade e termoativação de até 60%.

- A enzima foi ativada por Mn^{2+}, Mg^{2+} e K^{+} e fortemente inibida por Hg^{2+} e Ag^{+}. O mercúrio reduziu a termoestabilidade da enzima.

- A enzima foi inibida totalmente por 5-hidroximetilfurfural, e com menos intensidade por ácido 4-hidroxibenzóico e ácido gálico.

- Em teste de especificidade, a enzima mostrou grande afinidade pelo substrato carboximetilcelulose em comparação com os outros substratos testados. Seus valores de *Km* e *Vmax* foram determinados, sendo eles 3,53 ±0,32 $mg.mL^{-1}$ e 2,86 ±0,04 $\mu mol/min.mL^{-1}$, respectivamente.

- A interpretação dos parâmetros termodinâmicos mostrou que a endoglucanase purificada apresenta maior estabilidade com o aumento da temperatura a partir do aumento dos valores de energia livre de Gibbs.

Referências

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerohlus* WBS2 from hot spring, India. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 6(26) pp. 5453-5458. 2012.

ALTANER, C. M.; JARVIS, M. C. Modelling polymer interactions of the “molecular Velcro” type in wood under mechanical stress. **Journal of Theoretical Biology**, v. 253, n. 3, p. 434–445, 2008.

ANFINSEN, C. B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. **Science**. v. 181, n. 4096. 1973.

ARPAN, D.; ARIJIT, J.; TANMAY, P.; SUMAN, K. H.; KUNTAL, G.; CHIRANJIT, M.; PRADEEP, K. D. M.; BIKAS, R. P.; KESHAB, C. M. Thermodynamics and kinetic properties of halostable endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* ABK9. Journal of Basic Microbiology, v. 54, n. S1, p. S142–S151, 2014.

ARVAYO-ENRÍQUEZ, H.; MONDACA-FERNÁNDEZ, I.; GORTÁREZ-MOROYOQUI, P.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, R. Carotenoids extraction and quantification: a review. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2916-2924, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BAJAJ, B. K.; PANGOTRA, H.; WANI, M. A.; SHARMA, P.; SHARMA, A. Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. **Indian Journal of Chemical Technology**. 16, 382-387. 2009.

BAKER, J. O.; MCCARLEY, J. R.; LOVETT, R. Catalytically enhanced endocellulase Cel5A from Acidothermuscellulolyticus. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 121(1–3):129–148. 2005.

BALDRIAN, P.; VALÁŠKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 501–521, 2008.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; JIMENÉZ-PASCUAL, E.; BUSSE-VALVERDE, N.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; ROS-GARCÍA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. Effect of wine maceration enzymes on the extraction of grape seed proanthocyanidins. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 8, p. 2207-2212, 2012.

BAYER, E. A.; LAMED, R.; HIMMEL, M. E. The Potential of Cellulases and Cellulosomes for Cellulosic Waste Management. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 237-245, 2007.

BERKA, R. M.; GRIGORIEV, I. V; OTILLAR, R.; et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi Myceliophthora thermophila and Thielavia terrestris. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922–927, Nature Publishing Group. 2011.

BHAT, S. BHAT, K. M. Food Macromolecular Science Department, Institute of Food Research Reading Laboratory, Earley Gate, Whiteknights Road, Reading, RG6 6BZ, United Kingdom. **Biotechnology advances**, v. 15, p. 583–620, 1997.

BLACKBURN, N. J.; BARR, M. E.; WOODRUFF, W. H.; VAN DER OOOST, J.; DE VRIES, S. Metal-Metal Bonding in Biology: EXAFS Evidence for a 2.5 .ANG. Cooper-Cooper Bond in the CuA Center of Cytochrome Oxidase. **Biochemistry**, v. 33(34), p. 10401-10407, 1994.

BORGO, B.; HAVRANEK, J. J. Automated selection of stabilizing mutations in design and natural proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 5, p. 1494-1499, 2012.

BRAUN, U. The impacts of the discontinuation of dual nomenclature of pleomorphic fungi: the trivial facts, problems, and strategies. **IMA Fungus**, v. 3, n. 1, p. 81–86, 2012.

BROCK, J.; NOGUEIRA, M. R.; ZAKRZEVSKI, C.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Experimental measurements of viscosity and thermal conductivity of vegetable oils. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28(3): 564-570, 2008

BRONNENMEIER, K.; RÜCKNAGEL, K. P.; STAUDENBAUER, W. L. Puri- fication and properties of a novel type of exo-1,4--glucanase (Avicelase II) from the cellulolytic thermophile Clostridium stercorarium. **European Journal of Biochemistry**, 200:379–385. 1991.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. D. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. DE. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 39, n. 2, p. 333–6, 2008.

CAPARRÓS, C.; LANT, N.; SMETS, J.; CAVACO-PAULO A. Effects of adsorption properties and mechanical agitation of two detergent cellulases towards cotton cellulose. **Biocatalysis and Biotransformation**, Early Online: 1-12. DOI: 10.3109/10242422.2012.666840. 2012.

CARNINCI, P.; NISHIYAMA, Y.; WESTOVER, A.; ITOH, M.; NAGAOKA, S.; SASAKI, N.; OKAZAKI, Y.; MURAMATSU, M.; HAYASHIZAKI, Y. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length Cdna. **Proceedings of the National Academy Sciences**. 20; 95(2): 520–524. 1998.

CARVALHO, J. F. Combustíveis Fósseis e Insustentabilidade. **Ciência e Cultura**, Vol. 60, no. 3, 2008

CASTILLO B.; MENDEZ, J.; AL-AZZAM, W.; BARLETTA, G.; GRIEBENOW, K. On the relationship between the activity and structure of PEG-chymotrypsin conjugates in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**. 94:565–74. 2006.

CERQUEIRA, A. A. **A utilização de argilas na remoção de íons cromo presentes em efluentes industriais**. Monografia (Especialização em Química Ambiental) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

CHAUVAUX, S.; BEGUIN, P.; AUBERT, J. P.; BHAT, K. M.; GOW, L. A.; WOOD, T. M.; BAIROCH, A. Calcium-binding affinity and calcium-enhanced activity of Clostridium thermocellum endoglucanase D. **Biochemical Journal**, 265:261– 265, 1990.

CHAUVAUX, S.; SOUCHON, H.; ALZARI, P. M.; CHARIOT, P.; BEGUIN, P. Structural and functional analysis of the metal-binding sites of Clostridium thermocellum endoglucanase CelD. **The Jounal of Biological Chemistry.** 270, 9757–9762. 1995.

CHEN, H.-Q.; CHEN, X.-M.; CHEN, T.-X.; XU, X.-M.; JIN, Z.-Y. Extraction optimization of inulinase obtained by solid state fermentation of Aspergillus ficuum JNSP5-06. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 2, p. 446–451, 2011. Elsevier Ltd.

CHEN, Z.; ZHANG, H.; WANG, J.; TANG, C.; WU, J.; WU, M. Engineering the thermostability of a xylanase from Aspergillus oryzae by an enhancement of the interactions between the N-terminus extension and the b-sheet A2 of the enzyme. **Biotechnology Letters**. 35:2073–2079 DOI 10.1007/s10529-013-1298-z. 2013.

CHIACCHIERINI, E.; MELE, G.; RESTUCCIA, D.; VINCI, G. Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. **Trends in Food Science and Technology**. 18(6):299–305. 2007.

CHINEDU, S. N.; OBINNA, N. C.; UZOMA, A. O.; OKOCHI, V. I. Kinetic study and characterization of 1,4-β-endoglucanase of *Aspergillus niger* ANL301. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology anf Molecular Biology**. 5(2) 41-46. 2011.

CHUAN WEI, K. S.; TEOH, T. C.; KOSHY, P.; SALMAH, I.; ZAINUDIN, A. Cloning, expression and characterization of the endoglucanase gene from Bacillus subtilis UMC7 isolated from the gut of the indigenous termite Macrotermes malaccensis in Escherichia coli. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 103–109, 2015.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. Amorphous cellulose—structure and characterization. **Cellulose chemistry and Technology** v. 45, p. 13–

21, 2011.

COLLINS, T.; MEUWIS, M. A.; GERDAY, C.; FELLER, G. Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. Journal of Molecular Biology. 328, 419–428. 2003.

COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 2, p. 107–114, 2011.

COSGROVE, D. J.; JARVIS, M. C. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. August, p. 1–7, 2012.

CUNHA, C. C. Q. B. **Caracterização de celulases e xilanases produzidas por *Streptomyces* sp. cultivado em resíduos lignocelulósicos.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pó-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás. 2012.

DAMMSTRÖM, S.; SALMÉN, L.; GATENHOLM, P. On the interactions between cellulose and xylan, a biomimetic simulation of the hardwood cell wall. **BioResources**, v. 4, n. 1, p. 3–14, 2009.

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, Elsevier B.V. 2015.

DHAR, H.; KASANA, R. C.; DUTT, S.; GULATI, A. Cloning and expression of low temperature active endoglucanase EG5C from Paenibacillus sp. IHB B 3084. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 259–266, Elsevier B.V. 2015.

DIAS, B. A. **Caracterização funcional e estrutural de uma β-glucanase GH12 de *Aspergillus terreus***. Tese de doutorado apresentada 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. 2013.

DING, S.; GE, W.; BUSWELL, J. A. Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 263, n. 2, p. 207–213, 2006.

DOBREV, G. T.; ZHEKOVA, B. Y. Biosynthesis, purification and characterization od endoglucanase from a xylanase producing strain *Aspergillus niger* B03. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 43, n. 1, p. 70-77, 2012.

ELVAN, H.; ERTUNGA, N. S.; YILDIRIM, M.; COLAK, A. Partial purification and characterisation of endoglucanase from an edible mushroom, Lepista flaccida. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p. 291–295, 2010. Elsevier Ltd.

FARIQ, A. Microbial Cellulases: Production and Applications. **Journal of Biotechnology Science Research,** 3(1):122-127, 2016.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. Disseração de Mestrado apresentada ao curso Interunidades ESALQ/CENA-USP em Ecologia de Agroecossistemas. 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G.; GREUNE, A. Studies on the delignification of spruce wood by organosolv pulping using SEM-EDXA and TEM. **Wood Science and Technology**. 23(2) 123-130. 1989.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 2–12, 2009.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal Aspergillus terreus M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623–7629, 2008.

GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; , AGATHOS, S.; , FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation, New Biotechnology, 32, 147–156, 2015.

GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 444–455, 2010.

GOLDBERG, R. N.; TEWARI, Y. B.; BELL, D.; FAZIO, K.; ANDERSON, E. Thermodynamics of Enzyme-Catalyzed Reactions: Part 1. Oxidoredutases. **The Journal of Physical Chemistry**, p. 22:515. 1993.

GOMES, I.; GOMES, J.; GOMES, D. J.; STEINER, W. Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and beta-glucosidase by the wild thermophilic fungus Thermoascus aurantiacus. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 461–8, 2000.

GOMES, J.; STEINER, W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 223–235, 2007.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Química Nova**, vol.30, n.1, 2007

GRAHAM, H.; BALNAVE, D. Dietary enzymes for increasing energy availability. **Biotechnology in animal feeds and animal feeding**, pp 296–309, DOI: 10.1002/9783527615353.ch15. 1995.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1-2, p. 1–22,

2008.

GRISHUTIN, S. G.; GUSAKOV, A. V.; DZEDZYULYA, E. I.; SINITSYN, A. P. A lichenase-like family 12 endo-(1→4)-β-glucanase from Aspergillus japonicus: study of the substrate specificity and mode of action on β-glucans in comparison with other glycoside hydrolases. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 2, p. 218–229, 2006.

GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Carbohydrate Polymers**. 84: 1103–1109. 2011.

HALLIWELL, G. Hydrolysis of fibrous cotton and reprecipitated cellulose by cellulolytic enzymes from soil microorganisms. **Biochemical Journal** 95: 270−275, 1965.

HAN, W.; HE, M. The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition. **Bioresource Technology**. 101(10): 3724–3731. 2010.

HASAN, R.; ZHANG, B.; WANG, L. Microalgae for Biodiesel Production and Waste Water Treatment. In: Biomass Processing, Conversion and Biorefinery, B. Zhang, and Y. Wang, eds., **Nova Science Publishers**, Inc., Hauppauge NY, 277-288. 2013.

HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition Review Article **Veterinary Research Communications**, V. 35, n. 3, pp 169-180, 2011.

HEBEISH, A.; IBRAHIM, N. A. The impact of fronteir sciences on textile industry. **Colourage**. 54:41–55. 2007.

HERRERA, L. M. S.; VALDIVIA, A. C. R.; TORRE, M.; SALGADO, L. M.; NOYOLA, T. P. Differential expression of cellulases and xylanases by *Cellulomonas flavigena* grown on different carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 77: 589-595. 2007.

HILDÉN, L.; JOHANSSON, G. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 22, p. 1683–1693, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

HOTTIGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Correlation of trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the RAS/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant? **FEBS Letters**, 220:113–115, 1987.

HOUBRAKEN, J.; DE VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of Biotechnoologically Important *Aspergillusn* and *Penicillium* Species. **Advances in Applied Microbiology**, 86 pp. 199–249. 2014.

HULTIN, E.; WANNTROP, J. Viscosimetric determination of cellulase activity in the intestine of the sea urchin: Reaction mechanism and equilibrium constant for cullulase stabilization with calcium. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 20, p. 2667, 1966.

HUY, N. D.; NGUYEN, C. LE; PARK, H.-S.; et al. Characterization of a novel manganese dependent endoglucanase belongs in GH family 5 from Phanerochaete chrysosporium. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. xx, n. xx, p. 1–6, 2015.

IMMANUEL, G.; BHAGAVATH, C. M. A.; RAJ, P. I.; ESAKKIRAJ, P.; PALAVESAM, A. Production and partial purification of cellulase by Aspergillus niger and Aspergillus fumigatus fermented in coir waste and saw dust. **The Internet Journal of Microbiology**. 3 (1). 2007.

JABBAR, A.; RASHID, M. H.; JAVED, M. R.; PERVEEN, R.; MALANA, M. A. Kinetics and thermodynamics of a novel endoglucanase (CMCase) from *Gymnoascella citrina* produced under solid-state condition. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 515-524, 2008.

JALAL, F.; IBRAHIM, R. M.; IMRAN, Q. M.; IBRAHIM, Z.; BUKHARI, A. S.; LATIF, F. Purification and Characterization of an Endoglucanase of Scytalidium thermophilum Possessing Novel Catalytic and Thermodynamic Properties. **Current Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 189-196(8), 2014.

JANKOWSKA, H.; SWIATKOWSKI, A.; CHOMA, J. Active Carbon. **Alche Journal**, v. 38, n. 12, p. 1998. Ellis Harwood Ltd., Chichester, UK. 1992.

JAVED, M. R.; RASHID, M. H.; NADEEM, H.; RIAZ, M.; PERVEEN, R. Catalytic and Thermodynamic Characterization of Endoglucanase (CMCase) from Aspergillus oryzae cmc-1 Applied. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 3, p. 483-497, 2009.

JUNG, K. A.; WOO, S. H.; LIM, S.; PARK, J. M. Pyrolitic production of phenolic compounds from the lignin residues of bioethanol processes. **Chemical Engineering Journal**, 259, 107-116, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2012.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 33:188-203, 2014.

JYOTSNA, K. P.; RAO, A. R.; DEVAKI, K. Effect of nutritional factors on cellulase production by *Lyscinibacillus sphaericus* from the gut of earthworm, *Eisenia foetida*. **Current Biotica**, 9(2):145-152, 2015.

KANG, S. Production of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 2,

p. 153–156, 2004.

KANTELINEN, A.; JOKINEN, O.; SARKKI, M. L. Effects of enzymes on the stability of colloidal pitch. InProceedings of the 8th International Symposium on **Wood and Pulping Chemistry**, 1:605– 612, 1995.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology** 6(1) 41-53. 2011.

KHATTAK, W. A.; KANG, M.; UL-ISLAM, M.; PARK, J. K. Partial purification of saccharifying and cell wall-hydrolyzing enzymes from malt in waste from beer fermentation broth. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 36:737–47, 2013.

KAUR, B.; CHADHA, B.; OBEROI, H. Comparative analysis of two catalytically distinct endoglucanases from Aspergillus nidulans. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 02, p. 022–029, 2015.

KAUR, J.; CHADHA, B.; KUMAR, B.; SAINI, H. Purification and characterization of two endoglucanases from Melanocarpus sp. MTCC 3922. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 74–81, 2007.

KHANDKE, K. M.; VITHAYATHIL, P. J.; MURTHY, S. K. Purification of xylanase β-glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 274(2). 491-500. 1989.

KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, 48 408–415. 2011.

KLOCK, U. Celulose. Disciplina Química da Madeira. Universidade Federal do Paraná - Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. 2013.

KOSEKI, T.; MESE, Y.; FUSHINOBU, S.; MASAKI, K.; FUJII, T.; ITO, K.; SHIONO, Y.; MURAYAMA, T.; IEFUJI, H. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 77, 6, p. 1279-1285. 2007.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

KULAKOVA, L.; GALKIN, A.; NAKAYAMA, T.; NISHINO, T.; ESAKI, N. Cold-active esterase from Psychrobacter sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly → Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Proteomics,** 1696(1):59–65. 2004.

KUNDU, S.; SINGH, S.; OJHA, S.; KUNDU, K. Role of biorefining and biomass utilization in environmental control. **International Journal of**

Environmental, Chemical, Ecological, Geological and Geophysical Engineering, v. 9, no. 1, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structure Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 227-5259, 680-685. 1970.

LAM, S. Y.; YEUNG, R. C. Y.; YU, T. H.; SZE, K. H.; WONG, K. B. A Rigidifying Salt-Bridge Favors the Activity of Thermophilic Enzyme at High Temperatures at the Expense of Low-Temperature Activity. **Plos Biology**, v. 9, n. 3, 2011.

LANGAN, P.; PETRIDIS, L.; O'NEILL, H. M.; et al. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 63–68, 2014.

LE FLOCH, A.; JOURDES, M.; TEISSEDRE, P. L. Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. **Carbohydrate Research**, 417 94–102, 2015.

LEE, C. M.; LEE, Y. S.; SEO, S. H.; YOON, S. H.; KIM, S. J.; HAHN, B. S.; SIM, J. S.; KOO, B. S. Screening and Characterization of a Novel Cellulase Gene from the Gut Microflora of Hermetia illucens Using Metagenomic Library. **Jounal of Microbiology and Biotechnology** 24(9) 1196-1206. 2014.

LEGGIO, L.; LO; LARSEN, S. The 1.62 ?? structure of Thermoascus aurantiacus endoglucanase: Completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. **FEBS Letters**, v. 523, p. 103–108, 2002.

LI, W. F.; ZHOU, X. X.; LU, P. Structural features of thermozymes. **Biotechnology Advances**. 23, 271-281. 2005.

LIMA, E. R. N.; SANTOS, L. A.; FILHO, D. F.; BARRETO, P. K. C.; NOVAIS, C. S.; CARVALHO, A.; SILVA, N. M. C.; SILVA, M. V.; SANTANA, D. A. **Estudo de Potenciais floculantes para clarificação de amostras escuras analisadas por espectrofotometria**. 53º Congresso Brasileiro de Quimica. Rio de Janeiro. 2013.

LIU, S. Y.; DUAN, X. Y.; LU, X. M.; GAO, P. J. A novel thermophilic endoglucanase from a mesophilic fungus Fusarium oxysporum. **Chinese Science Bulletin**, 51(2): 191-197, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L.; RANDALL, R. J. A rapid method for quantifying small amounts of protein. **The Journal of Biological Chemistry** 193 265. 1959.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição. 2010.

MADIGAN, M. T.; OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 265–269, 1999.

MAHANTA, P.; BHARDWAJ, A.; KUMAR, K.; REDDY, V. S.; RAMAKUMAR, S. Modulation of Nto C-terminal interactions enhances protein stability. **Scientific Reports**. 4, 7284, 2015.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 3, p. 461–488, 2000.

MAICHE, R. HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**, v. 7, n.2, p.1-19. 2010.

MAMMAN, A. S.; LEE, J. M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, N. J.; HWANG, Y. K.; CHANG, J. S.; HWANG, J. S. Furfural: hemicellulose/xylose-derived biochemical. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**. v. 2, n. 5, p. 438-454, 2008.

MANDER, P.; CHOI, Y. H.; G.C., P.; et al. Biochemical characterization of xylanase produced from Streptomyces sp. CS624 using an agro residue substrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 451–456, 2014.

MANDL, M. G. Status of green biorefining in Europe. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 4(3), 268-274. 2010.

MANDRICH, L.; MERONE, L.; PEZZULLO, M.; CIPOLLA, L.; NICOTRA, F.; ROSSI, M.; MANCO, G. Role of the N terminus in enzyme activity, stability and specificity in thermophilic esterases belonging to the HSL family. **Journal of Molecular Biology**, 345 :501-512, 2005.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of Penicillium echinulatum and Trichoderma reesei cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource technology**, v. 99, n. 5, p. 1417–24, 2008.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.

MELO, J. C. P. **Síntese e caracterização de derivados da celulose modificada com anidros orgânicos - adsorção e termodinâmica de interação com cátions metálicos**. Dissertação de mestrado. Laboratório de Termoquímica de Materiais. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. 2007.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. The kinetics of invertase action. **Biochemische Zeitschrift Journal**. 49, 333. 1913.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination od Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. 426-428. 1959.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are there on earth and in the ocean? **PLoS Biology**, v.

9, n. 8, p. 1–8, 2011.

MURRAY, P. G.; GRASSICK, A.; LAFFEY, C. D.; CUFFE, M. M.; HIGGINS, T.; SAVAGE, A. V. Isolation and characterization of a thermostable endo-β-glucanase active on 1,3-1,4-β-D-glucans from the aerobic fungus *Talaromyces emersonii* CSB 814.70. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 90 –98, 2001.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124–129, 2008.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; et al. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from Aspergillus terreus and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 150–161, 2014.

NAZIR, A.; SONI, R.; SAINI, H. S.; MANHAS, R. K.; CHADHA, B. S. Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley β-glucan and xyloglucan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 25, 1189-1197. 2009.

NEDDERSEN, M.; ELLEUCHE, S. Fast and reliable production, purification and characterization of heat-stable, bifunctional enzyme chimeras. **Applied and Industrial Microbiology and Biotechnology**, 5:33 DOI 10.1186/s13568-015-0122-7. 2015.

NETO, O. B. **Integração Das Principais Tecnologias De Obtenção De Etanol Através Do Processamento De Celulose (2ª Geração) Nas Atuais Usinas De Processamento De Cana-De-Açúcar (1ª Geração)**. Dissertação de Mestrado. USP - Pós-Graudação em Engenharia de Sistemas. 2009.

NEUTELINGS, G. Lignin variability in plant cell walls: Contribution of new models. **Plant Science**, v. 181, n. 4, p. 379–386, 2011.

NORVELL, L. L. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new Code. **Mycotaxon**, v. 116, n. 1, p. 481–490, 2011.

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, p. 97–109, 2012.

OLIVEIRA, M. A vez da biotecnologia na biomassa. **Revista Pesquisa Fapesp**. Ed. 235. 2015. Luz. p. 70-73. 2015.

OYEKOLA, O. O.; NGESI, N.; WHITELEY, C. G. Isolation, purification and characterisation of an endoglucanase and β-glucosidase from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 637–644, 2007.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from Aspergillus niger DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7563–7569, 2010.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of Saccharomyces cerevisiae in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 375-380, 1990.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, 35(10)1153-1169. 2000.

PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from Fomes sclerodermeus growing in solid-state fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 54–59, 2007.

PERCIVAL ZHANG, Y.-H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.

PAREDES, D. I.; WATTERS, K.; PITMAN, D. J.; BYSTROFF, C.; DORDICK, J. S. Comparative void-volume analysis of psychrophilic and mesophilic enzyme: Structural bioinformatics of psychrophilic enzymes reveals sources of core flexibility. **BMC Structural Biology**. 11:42. Epub 2011/10/22. 2011.

PEREIRA RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

PHAM, T. H.; QUYEN, D. T.; NGHIEM, N. M. Purification and properties of an endoglucanase from Aspergillus niger VTCC-F021. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 694–701, 2012.

PISLIAKOV, A. V.; CAO, J.; KAMERLIN, S. C. L.; WARSHEL, A. Enzyme millisecond conformational dynamics do not catalyze the chemical step. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 106, no. 41, 17359–17364, 2009.

POL, D.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from penicillium pinophilum MS 20. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 49, n. 3, p. 189–194, 2012.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, R. S.; HOBBS, P. J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 8–36, 2009.

PINTO, T. O. P.; **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. UNESP-IBILCE. São

José do Rio Preto. 2010.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; PÉREZ-MEJÍA, N.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; ACOSTA-URDAPILLETA, L.; FOLCH-MALLOL, J. Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation** 22(3) 565-572. 2010.

RAJOKA, M. I.; ASHRAF, Y.; RASHID, H.; KHALID, A. M. Kinetics and thermodynamics of the Native and Mutated Extracellular Endoglucanases From *Cellulomonas biazotea*. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n. 6, p. 561-568(8), 2003.

RAWAT, R.; KUMAR, S.; CHADHA, B. S.; KUMAR, D.; OBEROI, H. S. Na acidothermophilic functinally active novel GH12 family endoglucanase from *Aspergillus niger* HO: purification, characterization and molecular interaction studies. **Antonie van Leeuwenhoek**. 107:103-117. 2015.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 3. ed. Wisconsin: Academic Press, 573 p, 1993.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico.** São Joaquim da Barra: Iara Coimbra, 2008. 25 p.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211–219, 2005.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases , xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto. 2014.

SABOTO, D.; NUCCI, R.; ROSSI, M.; GRYCZYNSKI, I.; GRYCZYNSKI, Z.; LAKOWICZ, J. The β-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 ºC. **Biophysical Chemistry** 81, 23-31. 1999.

SADANA, J. C.; LACHKE, A H.; PATIL, R. V. Endo-(1,4)-β-D-glucanases from *Sclerotium rolfsii*. Purification, substrate specificity, and mode of action. **Carbohydrate Research**, v. 133, n. 2, p. 297–312, 1984.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of Mucor circinelloides. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1871–1876, 2004.

SAMMOND, D. W.; KASTELOWITZ, N.; HIMMEL, M. E.; YIN, H.; CROWLEY, M. F.; BOMBLE, Y. J. Comparing residues clusters from thermophilic and mesophilic enzymes reveals adaptative mechanisms. **PLoS ONE**, 11(1): e0145848. doi:10.1371/journal.pone.0145848. 2016.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, n. 3, p. 246–291, 2005.

SAQUIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from Aspergillus fumigatus grown under solid state 83 fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, vol. 45, p. 641-646, 2010.

SARABOJI, K.; GROMINHA, M. M.; PONUSWANY, M. N. Importance of main-chain hydrophobic free energy to the stability of thermophilic proteins. **Biological Macromolecules**. v. 35, p. 211–220, 2005.

SARANRAJ, P.; STELLA, D.; REETHA, D. Microbial celulases and its applications: a review. **Internation Journal of Biochemistry & Biotech Science** 1:1-12. 2012.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated Aspergillus foetidus strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1763–1771, 2005.

SHAHRIARINOUR, M.; WAHAN, M. N. A.; MOHAMAD, R.; MUSTAFA, S.; A.B. ARIFF, A. B. Effect of medium and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, 10 (38), 7459-7467. 2011.

SHARADA R.; VENKATESHWARLU, G.; VENKATESWAR, S.; ANAND RAO, M. Production of Cellulase – A Review. **International Journal of Clinical & Biological Sciences**. 3(4):1070-1090, 2013.

SHARMA, A.; RUPINDER, T.; SINGH, S. R.; SONI, R.; SONI, S. K. Cellulases: Classification, **Methods of Determination and Industrial Applications Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-35, 2016.

SHEN, D. K.; GU, S. The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6496–6504, 2009.

SHEN, B.; SUN, X.; ZUO, X. et al. Engineering a thermoregulated intein-modified xylanase into maize for consolidate lignocellulosic biomass prossecing. **Nature Biotechnology**, 30(11). 2012.

SOHAIL m.; AHMAD, a.; KHAN, S. A. Comparative studies on production of cellulases from three strains of *Aspergillus niger*. **Pakistan Journal of Botany**, 46(5): 1911-1914, 2014.

SOLA-PENNA, M.; MEYER-FERNANDES, J. R. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 360 (1): 10–14. 1998.

STUTZENBERGER, F.; LUPO, D. pH dependente termal activation of endo-1,4-β-glucanase in *Thermomonospora curvata*. Enzyme and Microbial Technology, 8: 205-208, 2007.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, 2015.

TAKARA, D.; KHANAL, S. K. Green processing of tropical banagrass into biofuel and biobased products: An innovative biorefinery approach. **Bioresource Technology**, 102(2), 1587-1592. 2011.

TAO, , Y. M.; ZHU, X. Z.; HUANG, J. Z.; MA, S. J.; WU, X. B.; LONG, M. N.; CHEN, Q. X. Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 6126-6130. 2010.

TANSEY, M. R.; BROCK, T. D. The upper temperature limit for eukaryotic organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 9, p. 2426–2428, 1972.

TAYLOR, T. J.; VAISMAN, I. I. Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. **BMC structural biology**, v. 10 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S5, 2010.

Y. M. Torchinskii. In *Sulfhydryl and Disulfide Groups of Proteins,* Consultants Bureau, New York, 1974, pp. 99–124.

TUNGA, R.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYA, B. C. Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. **Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 6, p. 485–489, 1999.

UZAWA, T.; YAMAGISHI, A.; OSHIMA, T. Polypeptide synthesis directed by DNA as a messenger in cell-free polypeptide synthesis by extreme thermophiles, *Thermus thermophilus* HB27 and *Sulfolobus tokodaii* strain 7. Journal of Biochemistry. 131: 849–853. 2002.

VALÁSKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. **Microbiology**. 152: 3613-3622. 2006.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances** 30(6):1458–80, 2012.

VANDERGHEM, C.; BROSTAUX, Y.; JACQUET, N.; BLECKER, C.; PAQUOT, M. Optimization of formic/acetic acid delignification of *Miscanthus* × *giganteus* for enzymatic hydrolysis using response surface methodology Industrial. **Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 280–286, 2012.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65, 1-43. 2001.

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, MATTI. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. 108: 121-145. 2007.

VIIKARI, L.; VEHMAANPERA, J.; KOIVULA, A.; Lignocellulosic ethanol: From science to industry. Biomass and Bioenergy 46:13-24. 2012.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica** - 3ª Ed. 2002.

VOLLHARDT, K. P.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica** – Estrutura e Função. 6ª ed. 2013. Ed. Saraiva.

WANG, K.; LUO, H.; BAI, Y.; et al. A thermophilic endo-1,4-β-glucanase from Talaromyces emersonii CBS394.64 with broad substrate specificity and great application potentials. **Applied microbiology and biotechnology**, , n. 12, p. 7051–7060, 2014.

WANG, L.; HANNA, M. A.; WELLER, C. L.; JONES, D. D. Technical and economical analyses of combined heat and power generation from distillers grains and corn stover in ethanol plants. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 7, p. 1704–1713, 2009.

WANGA, H. J.; HSIAO, Y. Y.; CHENA, Y. P.; MAA, T. Y.; TSENGA, C. P. Polarity Alteration of Calcium Site Induces a Hydrophobic Interaction Network and Enhances Cel9A Endoglucanase Thermostability. **Applied and Environmental Microbiology**, doi:10.1128/AEM.03326-15. 2016.

WEISS, J. **Handbook of Ion Chromatography**. 3ª Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2004.

WILLIAMS, A.; FRASCA, V. Ion-Exchange Chromatography. In: Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Ltd., pp. 821-823. 2001.

WOOD, I. P.; ELLISTON, A.; RYDEN, P.; et al. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, n. 0, p. 117–121, 2012.

WOODWARD, W. T. W. **The Potential of Alfalfa, Switchgrass and Miscanthus As Biofuel Crops in Washington**. In: Proceedings

Washington State Hay Grower Association Annual Conference and Trade Show, Three Rivers Convention Center, Kennewick. 2008.

WU, X. H.; CHEN, R. C.; GAO, Y.; WU, Y. D. Effect of Asp-His-Ser/Thr-Trp tetrad on the thermostability of WD40-repeat proteins. **Biochemistry**. 30;49(47):10237-45. doi: 10.1021/bi101321y. 2010.

XIMENES, E.; YOUNGMI, K.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, 46, 170–176, 2010.

XIU. S.; SHAHBAXI, A. Green Biorefining of Green Biomass. In: **Biomass Processing, Conversion and Biorefinery**, B. Zhang, and Y. Wang, eds., Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, 435-446. 2013.

XIU, S.; SHAHBAZI, A. Development of Green Biorefinery for Biomass Utilization: A Review. **Trends in Renewable Energy** ISSN: 2376-2144. USA. 2015.

YIN, X.; HU, D.; LI, J. F.; HE, Y.; ZHU, T. D.; WU, M. C. Contribution of Disulfide Bridges to the Thermostability of a Type A Feruloyl Esterase from Aspergillus usamii. **PLoS ONE** 10(5): e0126864. doi:10.1371/journal.pone.0126864. 2015.

ZHAO, H. Protein stabilization and enzyme activation in ionic liquids: specific ion effects. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, 91 25–50. 2016.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

ZHANG, Z. G.; YI, Z. L.; PEI, X. Q.; WU, Z. L. Improving the thermostability of *Gerobacillus stearothermophilus* xylanase XT6 by directed evolution and site-directed mutagenesis. **Bioresource Technology** 101; 9272-9278. 2010.

ZHANG, F.; ZHANG, X.-M.; YIN, Y.-R.; LI, W.-J. Cloning, expression and characterization of a novel GH5 exo/endoglucanase of Thermobifida halotolerans YIM 90462T by genome mining. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, n. xx, p. 1–6, 2015.

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

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, 03 de agosto de 2016.

Maria Cecília Maia Chierotti
Assinatura do autor