



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA-BA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



MONA LIZA SANTANA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, APLICAÇÃO E DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL DE CELULASE DE *Moniliophthora pernicioso*

Feira de Santana, 2010.

MONA LIZA SANTANA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, APLICAÇÃO E DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL DE CELULASE DE *Moniliophthora perniciosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr Alex Gutterres Taranto

Co-orientador: Prof. Dra Sandra Aparecida de Assis

Feira de Santana, 2010.

A DEUS e a toda minha família em especial a minha dindinha
Bezinha dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar nos melhores caminhos e me guiar nos momentos de dificuldades.

Aos meus pais Maria Diva e Pedro Lopes, por serem meus exemplos de caráter e por todo esforço que fizeram para que pudesse seguir em frente nas minhas escolhas.

À minha irmã Shirley que tanto amo, pelo carinho e incentivo e a minha amiga Renata de todas as horas.

À minha adorada dindinha Bezinha, pelo seu cuidado, preocupações e carinho

Aos meus amigos e irmãos da casa 8 (Robson, Tiago, Lú, Crispa e Uill), por ter me acolhido e contribuído muitas vezes descontrações.

Às minhas amigas excepcionais (Aline e Camila), pelo apoio, incentivo, risos e muitas fotos.

Aos amigos do LAEN (Aline, Íngara, Diego, Gildomar, Priscila, Amanda e Tony), pelas sugestões e troca de experiências.

Aos meus amigos Rafaela e André pela paciência, sugestões, piadas, pela companhia em horas de trabalho, enfim, por tudo.

À Bruno Andrade e Catinha, pela paciência em todos os momentos boa vontade e pelas brincadeiras.

À minha amiga Alessandra de Petrolina, Rio de Janeiro, Manaus, Curitiba de qualquer lugar, pela companhia, incentivo, alegria e muitas histórias.

À Othon, pelo apoio, amizade e compreensão nos momentos ausentes.

Aos funcionários da BIOTEC, em especial à Helton, pela educação, competência e boa vontade.

Aos funcionários da Área, pela disponibilidade de sempre.

Ao meu amigo Edvan, que desde o início contribuiu com seus conhecimentos e momentos de descontrações.

Aos meus amigos do Yôga em especial Nay, pela sua tranquilidade, amizade.

A universidade Estadual de Feira de Santana e ao departamento de Farmácia, pela oportunidade concedida para realização do curso.

As alunas de Engenharia de Alimentos (Èrica e Nilmara), pela ajuda nas análises de microbiologia.

À empresa NECTARE pelo fornecimento das amostras de suco e pela disponibilidade.

Aos professores Dr. Antonio Azeredo e ao Dr. Carlos Priminho Pirovani pela disposição em participarem da banca, contribuindo assim com as correções do meu trabalho.

À Luciano do departamento de Alimentos, pela disponibilidade e sugestões.

Em especial, ao meu orientador Alex Taranto pela oportunidade e confiança no meu trabalho, e a minha co-orientadora Sandra Aparecida, pela confiança, paciência, disponibilidade de sempre e alegria.

Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas, se existir sonhos.... os erros produzirão crescimento e os desafios produzirão oportunidades.

Augusto Cury

RESUMO

As celulasas são enzimas degradadoras da parede celular vegetal e podem ser produzidas por diversos microrganismos, sendo os fungos filamentosos os principais produtores. Essas enzimas estão diretamente envolvidas na degradação da parede celular vegetal, o que permite a invasão de microrganismos patogênicos na planta, além de sua vasta aplicação em diversos segmentos industriais como a indústria alimentícia e de biocombustíveis. Neste contexto, o presente trabalho objetivou produzir, caracterizar, aplicar e determinar a estrutura tridimensional de celulase de *Moniliophthora perniciosa*, o fungo causador da vassoura-de-bruxa. Os resultados mostraram que as melhores condições para a sua produção, em meio submerso, foi utilizando 7g.L⁻¹ de extrato de levedura em 19 dias de incubação. O pH e temperatura ótimos de atividade máxima de celulase foram 7,2 e 47°C, respectivamente. Quanto à termoestabilidade, a enzima se manteve estável a 60°C após 30 minutos de incubação. Os estudos dos efeitos de sais na atividade enzimática demonstraram que o cloreto de potássio e brometo de potássio são bons ativadores da enzima. Os estudos cinéticos mostraram um K_m e V_{max} de 0,03732 mg/mL com relação ao substrato CMC e 27,47 μmoles/mg/min, respectivamente. A sequência de celulase de *M. perniciosa* foi obtida a partir de banco de dados do Projeto Genoma/Proteoma do *M. perniciosa* com 2193 pares de bases e 731 aminoácidos, utilizando-a para a construção do modelo tridimensional por modelagem comparativa. Após simulações de dinâmica molecular o modelo apresentou um início de simulação estável entre 2,00 e 2,36 nonossegundos. O complexo celulolítico obtido de *M. perniciosa*, foi eficiente na hidrólise do bagaço-de-cana de açúcar e na redução da viscosidade do suco de caju.

Palavras-chaves: celulase, *Moniliophthora perniciosa*, aplicação, estrutura 3D, modelagem molecular

ABSTRACT

Cellulases are enzymes that degrade plant cell wall. These enzymes are produced by various microorganisms, which filaments fungi are the main producers. Pathogenic microorganisms produced enzymes available to act the degradation of plant cell wall, allowing their invasion in the plant. In addition with a possible involvement in the pathogenic mechanism of *Moniliophthora perniciosa*, cellulases are enzymes that have wide application in the food and biofuels. In this context, this study aimed to produce, characterize, apply and determine the three-dimensional structure of glycosidic enzymes. The results showed that the best conditions for its production, in liquid fermentation, were using 7 g L⁻¹ yeast extract in 19 days of incubation. The pH optimum and temperature for maximum cellulase activity were 7.2 and 47°C, respectively. Studies of the effects of salts on enzyme activity showed that the potassium chloride and potassium bromide causes increase in enzyme activity and the presence of 100 mM. Kinetic studies showed a Km and Vmax of 0.03732 mg / mL substrate CMC and 27.47 μmoles / mg / min, respectively. The sequence of the cellulase of *M. perniciosa* was obtained from the database of Genome / Proteome *M. Perniciosa* with 2193 base pairs and 731 amino acids, and using it to build the three-dimensional model for comparative modeling. After molecular dynamics simulations of the model presented an early stable simulation between 2.00 and 2.36 nanoseconds. The complex cellulolytic obtained from *M. pot.* was efficient in the hydrolysis of bagasse-cane sugar and reducing the viscosity of cashew apple juice.

Keyword: enzymes glycosidic, *Moniliophthora perniciosa*, application, structure 3D comparative modeling

SUMÁRIO

REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 1	13
1.2 Constituintes da parede vegetal	14
1.2.1 Celulases.....	15
1.2.2 Aplicações de celulases	17
REFERÊNCIAS	19
CAPITULO 2	21
2.1 INTRODUÇÃO	22
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.2.1 Reagentes	23
2.2.2 Microrganismo	23
2.2.3 Condições de cultivo de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	23
2.2.4 Produção de celulase utilizando o modelo experimental Doehlert	24
2.2.5 Obtenção do complexo celulolítico.....	25
2.2.6 Ensaio enzimáticos	25
2.2.7 Determinação da atividade específica (AE) e conteúdo protéico total	25
2.2.8 Caracterização de celulase	26
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
2.3.1 Produção de celulase	27
2.3.2 Caracterização de celulase de <i>M. perniciosa</i>	31
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 3	41
3.1 INTRODUÇÃO	42
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.2.1 Identificação da sequência e alinhamento dos moldes.....	43
3.2.2 Construção e refinamento do modelo.....	43
3.2.3 Validação.....	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
REFERÊNCIAS	50
CAPITULO 4	53
4.1 INTRODUÇÃO	54
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.2.1 Reagentes	55
4.2.2 Microrganismo	55

4.2.3 Condições de cultivo de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	56
4.2.4 Tratamento térmico do bagaço de cana-de-açúcar	56
4.2.5 Ensaio de hidrólise do bagaço de cana utilizando extrato bruto de <i>M. perniciosa</i>	56
4.2.6 Filtração do extrato bruto e obtenção das amostras	57
4.2.7 Delineamento experimental para clarificação do suco de caju	57
4.2.8 Características físico-químicas e microbiológicas	57
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.3.1 Conversão de celulose	58
REFERÊNCIAS	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

1 INTRODUÇÃO

O Brasil e principalmente o estado da Bahia, destaca-se como uma das principais regiões no mundo produtoras de cacau (SOUZA; DIAS, 2001). A cacauicultura teve um papel importante no desenvolvimento regional trazendo empregos e colocando o país em destaque no cenário econômico internacional.

A planta *Theobroma cacao* L é cultivada nas Américas Sul e Central, Caribe, África e Ásia, e suas amêndoas representam a principal matéria prima para indústria de chocolate, na utilização da manteiga de cacau, polpas, geléias, dentre outros produtos (CARVALHO, 2007). Na região sul baiana, a cacauicultura vem sofrendo perdas significativas na produção, devido a presença de doenças que se estabelecem em suas plantações, ocasionando prejuízo econômicos de grande escala.

Dentre as principais doenças, destaca-se a vassoura-de-bruxa, causada pelo fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*. Este fungo é um basidiomiceto hemibiotrófico que apresenta uma fase parasítica e outra saprófita, provocando alterações morfológicas, histológicas e fisiológicas tecido-específicas e temporais no cacaueiro (FRIAS et al, 1991). O fungo infecta lançamentos florais novos, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais, podendo provocar a morte da planta quando afetada por consecutivos ciclos do patógeno integrando a fatores abióticos (SILVA, 2002).

Medidas integradas como o controle cultural, biológico e químico e também o uso de cultivares resistentes tem sido utilizados no controle dessa doença. Entretanto, estudos moleculares vêm atuando na busca de mecanismos que são desecandeados na interação planta-patógeno, sendo foco de muitos projetos de pesquisas (CARVALHO, 2007).

Trabalhos realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular, Enzimologia e Modelagem Molecular da Universidade Estadual de Feira de Santana UEFS, em colaboração com outros laboratórios (UESC, UFBA e CEPLAC), vêm buscando soluções para o controle da doença através de estudos moleculares que possibilite ao desenvolvimento de novas formas de combate à doença (ANDRADE et al, 2009).

A caracterização bioquímica e funcional de produtos gênicos (PIROVANI et al., 2005) são de fundamental importância na busca de um controle efetivo da doença, além da prospecção e o desenvolvimento de inibidores específicos (SOUZA, 2007). O conhecimento das enzimas fungicas que estão envolvidas na degradação dos polissacarídeos presentes na parede vegetal da planta podem ser alvos interferentes no desenvolvimento do patógeno, uma

vez que para degradação desses polissacarídeos os fungos patogênicos necessitam produzir complexos enzimáticos que degradem a parede celular vegetal, facilitando sua invasão na planta. Entre as enzimas envolvidas, as celulases são as principais enzimas degradadoras da parede celular vegetal.

Este complexo enzimático tem como alvo diferentes sequências, estruturas e mecanismo hidrolítico com inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico (GLOSTER et al, 2007). As celulases são enzimas que pertencem a famílias das hidrolases glicosídicas, sendo estas agrupadas atualmente em 87 famílias (HENRISSAT et al, 1993).

A conversão microbiana de celulose em produtos solúveis exige a ação de diversos tipos de enzimas glicosídicas hidrolíticas, tais como endoglucanases celobiohidrolases e β -glicosidase (GILKES et al, 1991). Estas enzimas atuam na hidrólise da biomassa para produção de etanol, sendo utilizadas também em diversos processos industriais. Entre estes, destacam-se a indústria têxtil, papel e celulose, alimentícia e alimentação animal (BHAT, 1997).

No entanto, a partir do conhecimento sobre as características bioquímicas e estruturais das celulases poderá indicar o envolvimento dessas enzimas na interação entre *M. pernicioso* e o *T. cacao*, e assim, determinar de forma eficiente uma metodologia para o controle da doença, além de avaliar o potencial do fungo na produção desse complexo a nível industrial.

Esta dissertação teve como objetivos: (i) produzir e caracterizar celulase de *M. pernicioso*; (ii) avaliar o complexo celulolítico na hidrólise de bagaço-de-cana e clarificação de suco de caju; (iii) determinar a estrutura tridimensional de celulase de *M. pernicioso*.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, B. S; TARANTO, A. G; GÓES NETO, A; DUARTE, A. A. Comparative Modeling of DNA and RNA Polymerases from *Moniliophthora Perniciosa* Mitochondrial Plasmid. **Theoretical Biology and Medical Modeling**, v. 6, p. 1-2, 2009.
- BHAT, M.K; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, p583-620, 1997.
- CARVALHO, H. A. S. Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao-Moniliophthora prniciosa*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual de Santa Cruz, 2007.
- GLOSTER, T.M; FARID, M. I; MACAULEY, K; EKLO, J. M; ROBERTS, S, TURKENBURG, J.P; BJORNVAD, M. E; JORGENSEN, P. L; JOHANSEN, K. S. D. Characterization and Three-dimensional Structures of Two Distinct Bacterial Xyloglucanases from Families GH5 and GH12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 19177–19189, 2007.
- FRIAS, G. A; PURDY, L. H; SCHMIDT, R. A. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, v. 7, n. 6, p. 552-556, 1991.
- GILKES, N. R; HENRISSAT, B; KILBURN, D.G; MILLER, R. C. J; WARREN, R. J. Domains in microbial β -1,4-glyconases: sequence conservation, function, and enzymes families. **Microbial**, v. 55, p. 303-315, 1991.
- HENRISSAT, B and BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J**, v. 293, p. 781–788, 1993.
- PIROVANI, C. P; LOPES, M. A; OLIVEIRA, B. M; DIAS, C. V; SOUZA, C. S; GALANTE, R. S; SANTOS-JUNIOR, M. C; SILVA, B. G. M; UETANABARO, A. P. T; TARANTO, A. G; CRUZ, S. H; ROQUE, M. R. A; MICHELI, F. F. L; GESTEIRA, A. S; SCHRIEFER, A; CASCARDO, J. C. M; PEREIRA, G. A. G; GÓES-NETO, A. Knowledge discovery in genome database: the chitin metabolic pathway in *Crinipellis perniciosa*. **Proceedings of I International Symposium on Mathematical and Computational Biology**, 2005.
- SILVA, S. D. V. M. et al. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cauceiros. **Agrotropica**, v.14, p. 28, 2002.
- SOUZA, C. A. S; DIAS, L. A. Melhoria ambiental e sócio-econômico. In: DIAS, L.A.S. Melhoria genética do cauceiro. **Editores Folha de Viçosa Ltda**, p.1-47, 2001.
- SOUZA, C. S. Sintase da quitina de *Moniliophthora perniciosa* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA: Caracterização Gênica e Modelagem do provável sítio Catalítico. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, 2007.

CAPÍTULO 1

ENZIMAS DEGRADADORAS DA PAREDE CELULAR VEGETAL

Os fungos patogênicos de plantas podem produzir uma variedade de enzimas capazes de degradar os componentes da parede celular. A parede celular dos vegetais superiores varia quanto a sua composição e organização, mas são constituídas primeiramente de celulose e hemicelulose. Para invadir os tecidos vegetais, os fungos filamentosos precisam produzir e excretar várias enzimas hidrolíticas, que serão responsáveis pela degradação da parede celular.

Entre estas enzimas, podemos citar as celulases. O estudo de enzimas capazes de degradar a parede celular de plantas pode levar a descoberta de novos controles de pragas, sendo deste modo, de grande interesse científico. Neste capítulo revisamos os principais constituintes e enzimas degradadoras da parede vegetal.

1.2 Constituintes da parede vegetal

A celulose e hemicelulose são os principais polissacarídeos constituintes da parede vegetal. A celulose é um homopolissacarídeo composto por unidades de glicose ligadas entre si através de ligações β -1,4, formando microfibras. Estas microfibras se entrelaçam, formando finos filamentos, denominados macrofibrilas.

Moléculas de celulose possuem duas regiões, cristalina e amorfa. A região cristalina apresenta um maior número de interações moleculares intra e internamente, como pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, o que torna a celulose insolúvel e mais resistente a ação enzimática, a tração e a agentes químicos (PERCIVAL et al, 2006; LYNDY et al, 2002). A região amorfa, é mais facilmente hidrolisável, possui menos interações de hidrogênio, sendo facilmente hidratada e mais acessível às enzimas (LYNDY et al, 2002). No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm demonstrado capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis de baixas massas moleculares como a celobiose e glicose (BHAT, 1997).

As hemiceluloses são polímeros constituídos de vários monossacarídeos, principalmente de D-xilose e por outras subunidades, com D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido glicorônico e ácido galacturônico. A hemicelulose está fortemente ligada à celulose por grupos de ligações de hidrogênio e também através de ligações covalentes.

A Figura 1 evidencia a estrutura de celulose envolvida com hemicelulose através de microfibras.

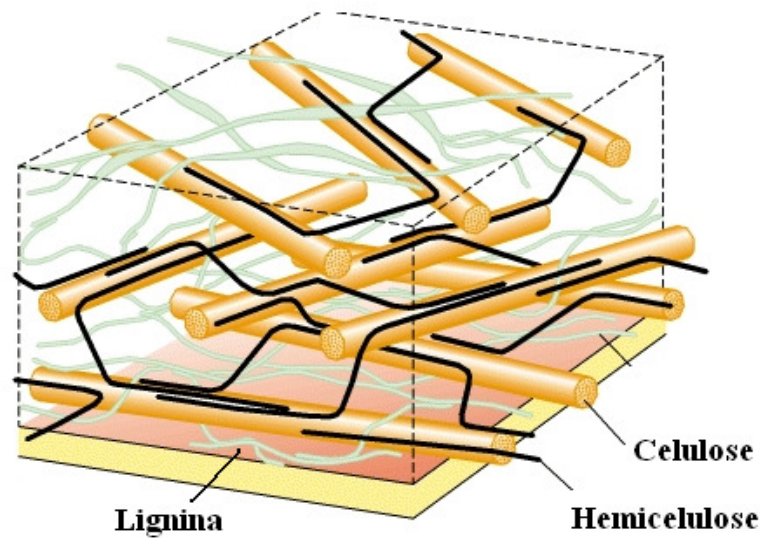


Figura 1: Estrutura de célula vegetal representando as fibras de celulose e hemicelulose

Para uma completa degradação de celulose é necessária a ação de várias enzimas denominadas de celulases. Estas enzimas são produzidas por um espectro de bactérias, fungos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos, protozoários, tendo os fungos filamentosos como a mais importante fonte comercial (POLIZELI et al., 2005).

1.2.1 Celulases

Os materiais naturais de celulose podem fornecer energia sob a forma de glicose, através da sua hidrólise por enzimas celulolíticas de origem microbiana. A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase, que em conjunto, constituem um complexo de enzimas celulases. Consequentemente os substratos insolúveis celulósicos são convertidos em açúcares solúveis pela ação sinérgica dessas enzimas (BAGGA et al., 1990).

A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e b-glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO & PEREIRA, 2010). A Figura 2 representa o mecanismo de degradação da celulose pelo sinergismo das enzimas.

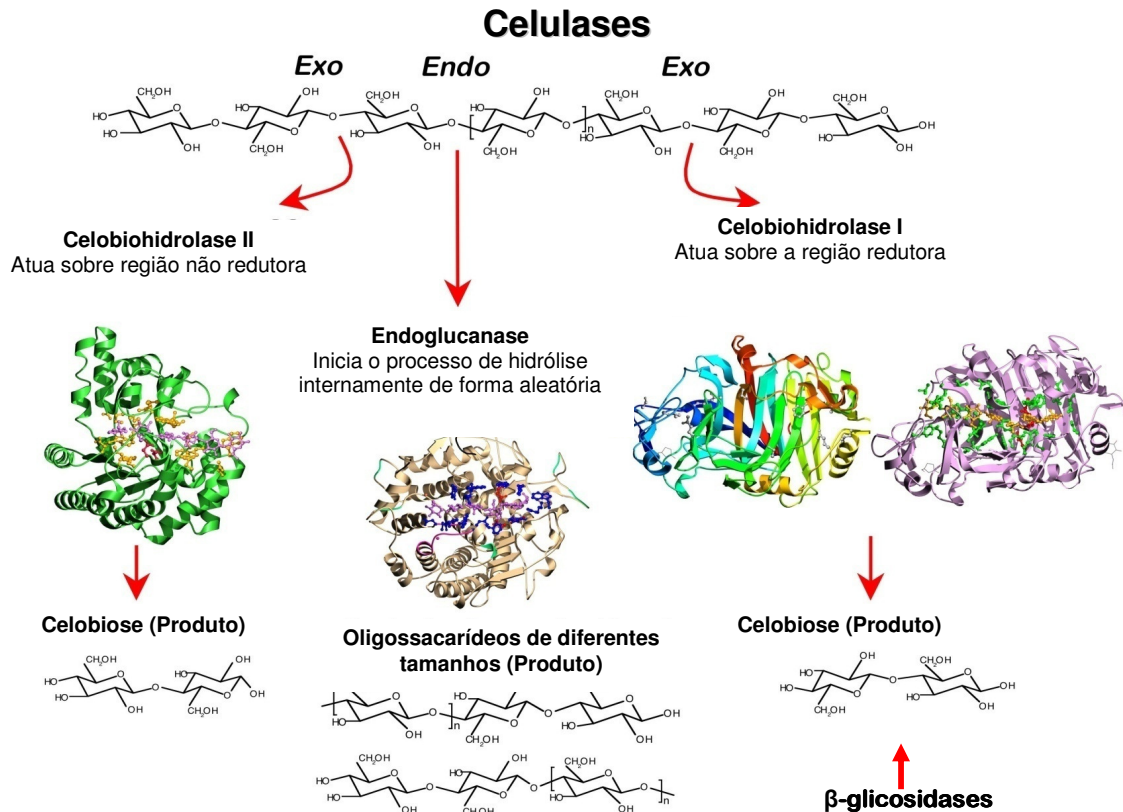


Figura 2: Mecanismo de ação do complexo enzimático

A endoglucanase (EC 3.2.1.4) é a enzima responsável por iniciar a hidrólise. Ataca internamente à celulose de forma aleatória na parte amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (CASTRO & PEREIRA, 2010).

As endoglucanase também são conhecidas como celulases e carboximetil celulase. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável em carboximetil celulose (CMC), avicel (celulose cristalina), β-glicana e xilana. Elas atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade é diminuída conforme o encurtamento da cadeia de celulose (PERCIVAL ZHANG et al, 2006; LYNDY et al, 2002; BHAT & BHAT, 1997).

As exoglucanases, também conhecidas como glucanohidrolase e celobiohidrolases, atuam em porções redutoras e não redutoras sendo capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando cadeias do polissacarídeo. Duas classificações são utilizadas para definir este tipo de atividade enzimática: 1,4- β -D-glucana-hidrolases e celobiohidrolase.

As 1,4- β -D-glucana-hidrolases (GH), também conhecidas como exo- β -glucosidase (EC. 3.2.1.74), são responsáveis pela hidrólise da fibra celulósica, liberando glicose diretamente do polímero. Celobiohidrolase (CBH) (EC 3.2.1.91), denominadas também como exo-glucanase ou celobiohidrolases, pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (NR). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO & PEREIRA, 2010). Possuem ação limitada sobre substratos de carboximetil celulose e hidroxetilcelulose (HEC) (LYNDY et al., 2002; BHAT & BHAT, 1997).

As β -glucosidases (EC 3.2.1.21) hidrolisam celobiose e removem glicose de terminais não redutores de pequenas celodextrinas (BHAT & BHAT, 1997). As β -glucosidases tem um papel importante na hidrólise de materiais lignocelulolíticos. A celobiose, principal substrato para a β -glucosidase é um potente inibidor de exocelulases e sua ausência diminui o processo de sacarificação das biomassas (ALMEIDA, 2009; LYNDY et al., 2002).

Muitas celulases são compostas por dois domínios distintos: o domínio de ligação ao substrato (DLS) e domínio catalítico (DC), que abriga o sítio ativo (SA). O sítio ativo possui como função a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose e cada classe de celulase possui uma forma diferente de hidrólise de ligações localizadas em regiões diferentes do substrato, com ligações terminais localizadas nas extremidades das cadeias e ligações internas. O domínio de ligação ao substrato está associado à adsorção, que permite o aumento da concentração das celulases na superfície da celulose através de interações não-covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio, forças eletroestáticas e interações hidrofóbicas (MARTINS, 2005).

1.2.2 Aplicações de celulases

As celulases possuem uma ampla faixa de aplicações, tendo seu uso intenso nos primeiros anos da década de 80, primeiro na indústria de alimentação animal, seguindo da aplicação na indústria de alimentos. Subsequentemente, estas enzimas foram aplicadas na indústria têxtil e lavanderia (BHAT, 2000).

Na indústria de alimentos, essas enzimas são aplicadas em conjunto com as hemicelulases e pectinas, na extração de sucos de frutas e óleos de sementes, na filtração e clarificação de sucos, aumento da eficiência da extração da cor de sucos e na liquefação do tecido vegetal (BHAT & BHAT 1997). As β -glucosidases possuem capacidade de liberar compostos aromáticos durante a fabricação do vinho, como terpenos, compostos fenólicos de capacidade antioxidante, nutracêutica e flavorizante (DAROIT et al, 2007).

A busca de novas fontes de energia devido ao aumento gradual dos preços de óleo e do gás natural e alta instabilidade do mercado de energia tem destacado a importância do desenvolvimento de tecnologias para o uso de fontes renováveis. Na indústria de ração animais ruminantes as celulases em conjunto com pectinases e hemicelulases, são aplicadas na degradação das plantas forrageiras, melhorando a digestibilidade da ração. Na indústria têxtil as celulases degradam as fibras superficiais tornando os tecidos mais lisos e macios. Também são utilizadas como aditivos biológicos na preparação de silagem, fermentação de alfafa e como aditivo biológico (MUHLBACH et al, 2000).

A biomassa é a única fonte de carbono suficiente para substituir o uso dos combustíveis fósseis. Sendo assim, os materiais lignocelulolíticos são os mais atrativos, devido ao baixo custo. Diversos investimentos têm sido realizados para possibilitar a degradação desse material complexo em açúcares simples e fermentáveis para produção de etanol. A degradação da celulose pelas celulases é um processo muito bem estudado e a atuação destas enzimas é afetada pela porosidade e cristalinidade da celulose além do conteúdo de lignina e hemicelulose da biomassa (BALAT, 2008). Estudos físico-químicos e mecânicos tem sido realizados para possibilitar o aumento da superfície de contato da biomassa extraindo lignina e hemicelulose para atuação de celulases (ALMEIDA, 2009).

Avanços das pesquisas sobre celulases ocorrem em diversas áreas do conhecimento. Ao longo dos anos, e até os dias atuais, contribuições científicas vem sendo geradas continuamente, no que tange ao isolamento de microrganismos produtores de celulases, aumento da expressão de celulases por expressão gênicas, à purificação e caracterização de componentes deste complexo enzimático, ao entendimento sobre o mecanismo de ataque a celulose, à clonagem e expressão de genes, à determinação tridimensional das celulases e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (CASTRO & PEREIRA, 2010).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. N. Celulases e hemicelulases de espécies de *Acremonium* Endofíticos. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa do programa de pós-graduação em Bioquímica, 2009.

BAGGA, P. S; SANDHU, D. K, S H A R M, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*, **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 61-68, 1990.

BALAT, M; BALAT, H; OZ. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.

BHAT, M. K; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, p. 583-620, 1997.

BRAITHWAITE, K. L; BLACK, G.W; HAZLEWOOD, G. P; ALI, B. R; GILBERT, H. J. A no-modular endo-beta-1, 4-mannase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies cellulose. **Biochemical Journal**, v.305, p.1005-1010, 1995 apud WULFFE. N.A. Caracterização enzimática das celulases XF-810 XF-818 E XF-2708 de *Xylela Fastidiosa* e purificação da proteína XF-818, expressas em *escherichia coli*. Tese de Doutorado apresentada a escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz – Piracicaba, SP, 2002.

CASTRO, A. M; PERREIRA, N. Jr. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 33, p. 181-188, 2010

DAROIT, D. J; SILVEIRA, S.T; HERTZ, P. F; BRANDELLI, A. Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 904-908, 2007.

GILKES, N.R; HENRISSAT, B; KILBURN, D.G; MILLER, R. C. Jr; WARREN, R.J. domains in microbial β -1,4-glucanase: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiological Reviews**, v.55, n. 2, p. 303-315, 1991.

LYND, L. R; WEIMER, P. J; VAN ZYL, W.H; PRETORIUS I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnonology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 66, p.506-577, 2002.

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulolítico de *Penicillium echinulatun* dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, 2005.

MUHLBACH, P. R. F. et al. Silagem de Alfafa Colhida no Início do Florescimento e Submetida ao Emurchimento e à Ação de Aditivos Biológicos. **Revista brasileira de zootecnia**, v 29, p.349-356, 2000.

PERCIVAL ZHANG, Y. H; HIMMEL, M. E; MIELENZ, F; MUTJE, P. Enzyme deinking of old newspapers with cellulose. **Process Biochemistry**, v.24, p.452-481, 2006.

POLIZELI, M. L. M; RIZZATTI, A. C. S; MONTI, R; TERENCEZI, H. F; JORGE, J. A; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Microbial Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

CAPITULO 2

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULASE DE *Moniliophthora perniciosa*

2.1 INTRODUÇÃO

O fungo *Moniliophthora perniciosa*, é o agente causador da praga vassoura-de-bruxa em cacauzeiros, responsável por grandes perdas em plantações de cacau na América do Sul e Caribe (KILARU et al, 2005).

Os fungos patogênicos de plantas podem produzir uma variedade de enzimas capazes de degradar os componentes da parede celular. A parede celular dos vegetais superiores varia quanto a sua composição e organização, mas são constituídas primeiramente de celulose e hemicelulose. Para invadir os tecidos vegetais, os fungos filamentosos precisam produzir e excretar várias enzimas hidrolases, que serão responsáveis pela degradação da parede celular, entre estas enzimas, podemos citar as celulases.

As celulases catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4 da celulose de forma aleatória. O seu substrato natural é celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetil celulose (CMC), xilana e β -glucana. As celulases têm sido amplamente estudadas e utilizadas em diversos fins industriais, devido ao seu potencial tecnológico na indústria têxtil, papel e celulose, indústria farmacêutica, alimentícia e química (NEMETH et al, 2002).

A obtenção de celulases de fonte microbiana é uma excelente alternativa para produção de complexos celulolíticos, uma vez que estas fontes apresentam um alto poder de multiplicação, são adaptáveis a vários meios nutricionais, e sintetizam uma variedade de substâncias químicas, dentre elas as enzimas, e podem apresentar baixo custo de cultivo (AZEVEDO, 2004; ANDREAUS, 2002).

Técnicas de fermentação como o cultivo em estado sólido são bastante usadas para produção de enzimas, por apresentar baixo custo operacional e evitar o consumo excessivo de água durante a produção (FERNANDEZ et al. 1996). Entretanto, o cultivo submerso apresenta maior vantagem sobre o cultivo em estado sólido, devido a sua capacidade em gerar uma variedade de metabólitos (PAPAGIANNI, 2004; GIBBS et al, 2000), principalmente pela maior homogeneidade, disponibilidade e interação dos nutrientes, implicando diretamente com a produção, transporte de enzimas e metabólitos entre o meio e o microrganismo. Assim, para o cultivo de fungos filamentosos em meio submerso, é necessário o estudo de variáveis como, pH, temperatura, fonte de carbono, nitrogênio e

oxigênio dissolvido. Poucos fungos e bactérias produzem celulase suficiente para completa degradação de celulose.

Deste modo, para a compreensão do potencial do microrganismo na produção de enzimas do complexo celulolítico e o mecanismo de ação de cada enzima na hidrólise de celulose, a produção e caracterização utilizando extrato bruto é um pré-requisito necessário. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar celulase de *M. Perniciosa*.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Reagentes

Carboximetilcelulose, glicose, albumina bovina, dextrose, Agar (BDA - HiMedia) foram obtidas da Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, Tris 0,2 M, ácido dinitrosalicílico (DNS), cloreto de cálcio, brometo de potássio, cloreto de potássio, sulfato de amônio.

2.2.2 Microrganismo

As amostras de *M. perniciosa* (CCMB 0257) foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB).

2.2.3 Condições de cultivo de *Moniliophthora perniciosa*

O fungo foi cultivado em meio sólido por 10 dias em caldo batata e dextrose. O complexo celulolítico foi produzido utilizando meio líquido contendo a seguinte composição: (g L⁻¹): farelo de trigo, 40,0; extrato de levedura variando de 3 a 9; K₂HPO₄ 3H₂O, 1,0; MgSO₄ 7H₂O, 0,2; KCl, 0,2. Um disco de 1 cm de diâmetro do micélio foi transferido para frasco de erlenmeyer de 100 mL. A incubação foi realizada a 28°C variando de 7 a 21 dias a 120 rpm. O meio líquido foi filtrado e centrifugado a 8.000 g por 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como um extrato bruto enzimático (HUA et al., 2007).

2.2.4 Produção de celulase utilizando o modelo experimental Doehlert

Os parâmetros mais importantes que afetam a produção de enzimas são tempo de fermentação e concentração de substrato. Neste estudo, utilizou-se para avaliar os efeitos do tempo de fermentação e concentração do indutor sobre a produção da enzima celulase, o delineamento experimental de superfície de resposta com duas variáveis (concentração de substrato e tempo de fermentação) e ponto central, levando a um total de 9 experimentos (Tabela 1). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A concentração do substrato foi estudada em cinco níveis (de 3 a 7g. L⁻¹) e o tempo de fermentação estudado em três níveis (7 a 21 dias). Os erros experimentais foram avaliados a partir de replicação do ponto central. Os dados experimentais foram plotados e ajustados em modelos e a significância estatística de cada um dos termos foram avaliados através análise de variância (ANOVA) utilizando Design Statistica, versão 6.0.

Tabela 01. Matriz de Doehlert utilizada para a otimização da produção de celulase de *M. perniciososa*

Experimento	Concentração do Indutor (g/L)	Tempo (dias)
1	3 (-1)	14 (0)
2	4,5 (-0.5)	7 (-0.866)
3 (C)	6 (0)	14 (0)
4 (C)	6 (0)	14 (0)
5 (C)	6 (0)	14 (0)
6	7,5 (0.5)	7 (-0.866)
7	9 (1)	14 (0)
8	4,5 (-0.5)	21 (0.866)
9	7,5 (0.5)	21 (0.866)

(C): ponto central; valores codificados são apresentados em parênteses

2.2.5 Obtenção do complexo celulolítico

Após o período de incubação, os meios foram centrifugados (Centrifuga 5804R - eppendorf) a 10000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

2.2.6 Ensaios enzimáticos

Os ensaios sobre a atividade de celulase foram verificados segundo LIMA et al (2005). Cada triplicata continha alíquotas de 250 µL de solução enzimática, 250 µL carboximetilcelulose 0,5%, pH 5,8, em 50°C por 30 min. A quantidade de açúcar redutor produzido foi determinada utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959).

As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV/VIS (Varian, Cary 50) com o comprimento de onda de 540 nm e a quantidade de açúcar redutor reduzida foi determinada utilizando uma curva de calibração com glicose pura (Sigma). Uma unidade de atividade de celulase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de um µmol de glicose por minuto. Todas as análises foram realizadas em triplicatas, sendo considerados apenas os resultados das triplicatas que diferem entre si menos que 5%.

2.2.7 Determinação da atividade específica (AE) e conteúdo protéico total

A proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976): 50 µL de solução contendo a enzima e incubada em 2,5 mL de reagente de Bradford por 5 min em temperatura ambiente. As absorbâncias das amostras foram lida em 595 nm em espectrofotômetro UV/VIS (Varian, Cary 50).

A atividade específica da celulase foi então calculada pela razão:

$$AE = UA_{\text{celulase}} / \text{mg proteína}$$

Sendo: AE = μmol de glicose liberado por min/mg de proteína

2.2.8 Caracterização de celulase

2.2.8.1 Otimização do efeito de pH ótimo e temperatura ótima de celulase de *M. perniciosus* através da metodologia de superfície de resposta

As interações dos efeitos de pH e temperatura ótima sobre a atividade do complexo celulolítico foram obtidas através da realização de 9 experimentos de atividade (Tabela 2). A avaliação do efeito de pH foi realizada utilizando solução tampão de fosfato de sódio 0,5 M para pH (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0) e solução tampão Tris (hidroximetil) 0,5 M para pH 9,0 e a temperatura ótima (40, 60 e 80°C). Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 2.2.6. Para cada ensaio foram utilizadas três repetições.

Os dados experimentais foram plotados e ajustados em modelos e a significância estatística de cada um dos termos avaliadas através de análise de variância (ANOVA) realizado pelo software Statistica 6.0.

Tabela 02. Otimização do efeito de pH e temperatura na atividade de celulase de *M. perniciosus*

Nº	pH	Temperatura (°C)
1	6,0	80
2	8,0	80
3	5,0	60
4	7,0	60
4	7,0	60
4	7,0	60
5	9,0	60
6	6,0	40
7	8,0	40

2.2.8.2 Parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato CMC sobre a atividade de celulase foi avaliado em condições ótimas de ensaios. O substrato foi diluído em solução tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0, nas concentrações de 0,05 mg/mL a 0,2 mg/mL. Os valores da velocidade inicial da reação foram obtidos graficamente pelo método duplo recíproco Lineweaver-Burk (LINEWEAVER-BURK, 1934). Os ensaios de atividade de foram realizados conforme o item 2.2.6.

2.2.8.3 Estudo da termoestabilidade de celulase

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se amostras da enzima em diferentes temperaturas (60, 70, 80 e 90°C) e tempos (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos). Após este período de incubação, os tubos de ensaio contendo as enzimas foram resfriados em banho de gelo e foram realizados os ensaios enzimáticos. Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 2.2.6.

2.2.8.4 Efeito de sais na atividade de celulase

O efeito da presença de sais (brometo de potássio, cloreto de amônio, cloreto de cálcio e cloreto de potássio) foi avaliado em diferentes concentrações (0,0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mM). Os ensaios de atividade foram realizados conforme o item 2.2.6.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Produção de celulase

Diversos fatores podem ser estudados para produção de celulases, tais como, nutrientes, fonte de carbono e condição de incubação. As condições ótimas de produção de celulase de *M. perniciosus* foram avaliadas utilizando o estudo de duas variáveis através da matriz de

Doehlert. A equação abaixo ilustra a relação entre as duas variáveis e a resposta, onde R é a resposta de atividade da enzima, IC é a concentração e T é o tempo:

$$UA = 2,1819 + 0,0829(T) - 0,010196(T)^2 + 0,9329(E.L) - 0,12162(E.L)^2 + 0,0425(T)(E.L)$$

UA: atividade; T: tempo de fermentação; E.L: extrato de levedura

Os resultados obtidos a partir de superfície de resposta correspondem aos gráficos de curva de níveis para equação descrita acima mostrado na Figura 1. De acordo com o gráfico de superfície de resposta mostrado na Figura 1 e 2, o extrato de levedura apresenta maior influencia na atividade de celulase em relação ao tempo de fermentação. No entanto, pode ser observado que ambos os parâmetros estudados possuem influência na atividade de celulase.

A análise de variância foi aplicada para avaliar os dados experimentais do modelo quadrático. Baseado no teste F, a equação é estatisticamente significativa, obtendo-se um F calculado 33,16 e F tabelado 9,01.

A partir da plotagem dos gráficos dos ensaios de concentração de substrato e tempo de fermentação, observou-se que concentrações de extrato de levedura acima de 7 g.L⁻¹ e abaixo de 5 g.L⁻¹ mostraram uma redução na atividade celulolítica. Concentrações de extrato de levedura, entre 6 e 7 g.L⁻¹ e tempo de fermentação de 14 e 20 dias, apresentaram os valores mais elevados para produção do complexo celulolítico, tendo como valor máximo de atividade de celulase na concentração de 7,15 g.L⁻¹ em extrato de levedura no tempo de 19 dias de fermentação obtendo-se 6,33 UA.

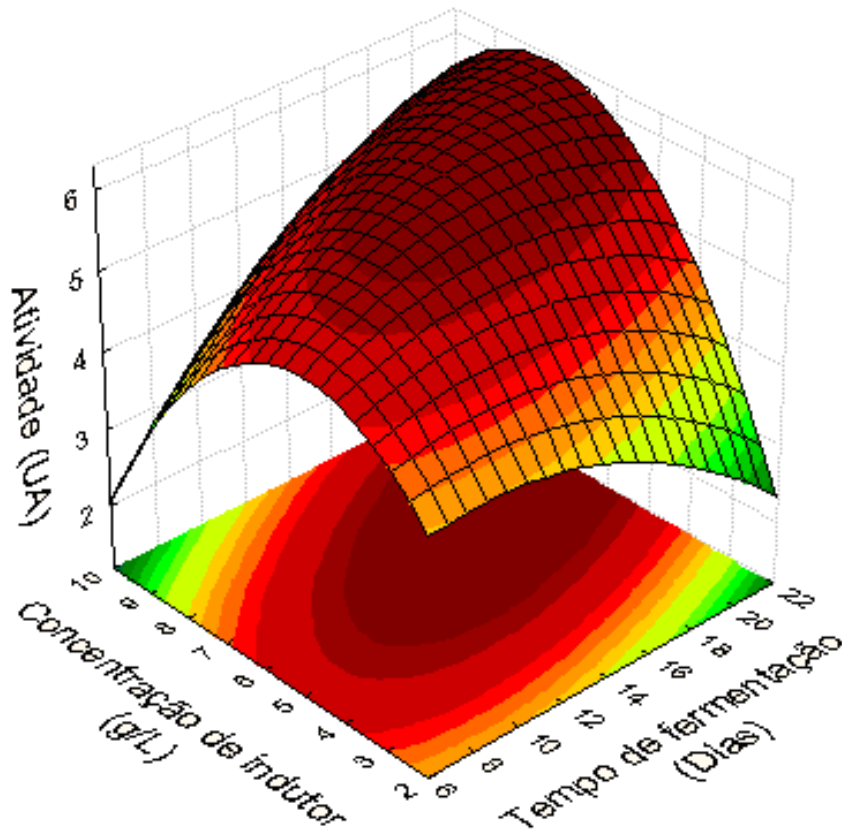


Figura 1. Superfície de resposta a partir da concentração de substrato em função do tempo de incubação. O círculo central em vermelho indica a influencia do tempo de fermentação e concentração do indutor (substrato).

Entre os produtores de celulasas estão o gênero *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Clostridium* e *Trichoderma* (LYND et al, 2002; KAREN et al, 1996). Fungos termofílos também estão sendo pesquisados, devido a sua capacidade de secretar enzimas que degradam a celulose em temperaturas mais elevadas e possuem melhor estabilidade térmica, além de sintetizarem celulasas resistentes a pHs de alcalinidade e acidez elevada (BHAT & BHAT, 1997).

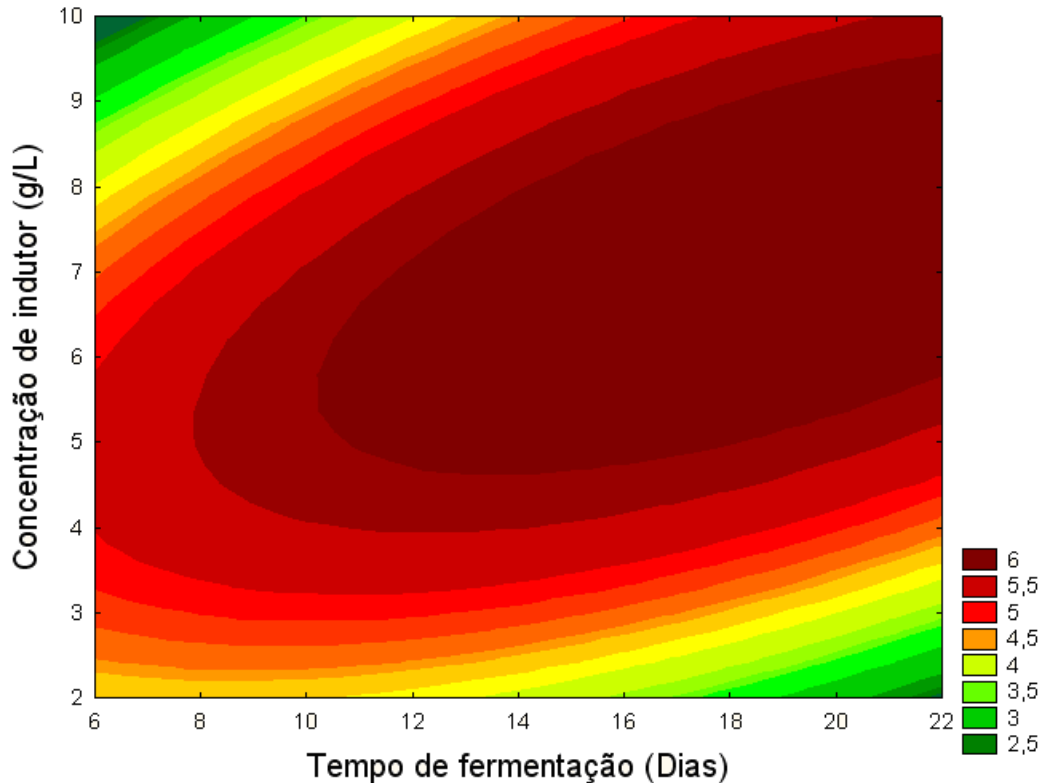


Figura 2: Curvas de nível de concentração de indutor em função do tempo de incubação. O círculo central em vermelho indica o tempo ótimo de fermentação em função da concentração de substrato.

Estudos de crescimento de fungos filamentosos para produção de enzimas do complexo celulolítico em cultivo líquido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, identificou 78 linhagens produtoras de enzimas celulolíticas (RUGGER et al, 2004). Destes microrganismos estudados, o *Trichoderma harzianum* apresentou melhor atividade (1,64 UA). Além de estudos demonstrarem o potencial das linhagens de *Trichoderma*, na produção de celulases outras espécies do gênero de *Aspergillus* e *Penicillium* têm sido citadas como bons produtores de celulases.

A produção de enzimas do complexo celulolítico não está somente ligada à linhagem do microrganismo, mas principalmente as técnicas e substrato utilizados no processo, dessa forma, isso se torna difícil comparar com estudos realizados por outros autores (RUGGER, et al, 2004). Diversos fatores podem influenciar na produção do complexo celulolítico. Técnicas

de cultivo em meio líquido apresentam maiores vantagens na produção de enzimas extracelular, devido principalmente a interação dos nutrientes com o microrganismo.

2.3.2 Caracterização de celulase de *M. pernicioso*

2.3.2.1 Efeito de pH ótimo e temperatura ótima de celulase de *M. pernicioso* através da metodologia de superfície de resposta

A partir da construção dos gráficos dos ensaios de otimização de temperatura e pH ótimos das amostras contendo as enzimas pelo software Statistica 6.0, pode-se analisar os efeitos de temperatura e pH na atividade celulolítica. Os dados indicaram que valores de pH abaixo de 7,0 e acima de 8,0 apresentam redução de atividade celulolítica. Quanto à temperatura ótima de atividade, os resultados obtidos indicaram que temperaturas abaixo de 40 e acima de 55°C acarretam na diminuição de atividade de celulase. Valores entre pH 7,0 e 8,0 e temperaturas entre 40 e 55°C apresentaram os melhores resultados de atividade. Os valores ótimos de pH e temperatura foram 7,22 e 47°C (Figura 3 e 4).

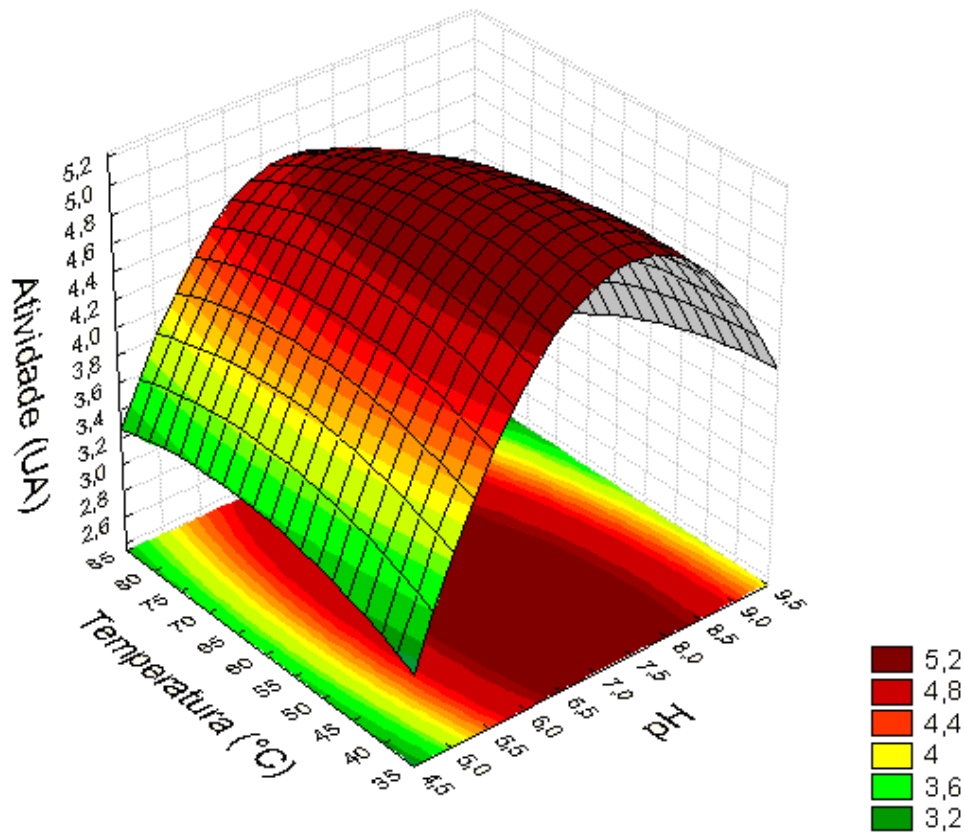


Figura 3. Temperatura e pH ótimo de celulase de *M. perniciosa*. O círculo central em vermelho intenso indica o ponto central de pH ótimo e temperatura ótima.

Há diversos relatos na literatura sobre a caracterização de celulases de origem fungicas, sendo as endoglucanases as mais estudadas. Efeitos de pH e temperatura ótima de atividade são fundamentais para se entender o comportamento enzimático e possivelmente determinar suas condições ótimas de trabalho. Vários organismos produtores de endoglucanases apresentam pH 7,0 como ótimo de atividade e temperatura de 50°C (KAUR et al, 2007; LIMA et al, 2005; SAHA et al, 2004; ROMANIEC et al, 1992; BAGGA, et al., 1990).

Resultados similares aos de *M. perniciosa* também foram encontrados em *Aspergillus Níger*, *A. nidulans* e em *Clostridium cellulolyticum* com temperatura ótima de 51°C e pH 7,2

(ALI et al, 2008; FIEROBE et al, 1991). Outros gêneros de *Clostridium* apresentam valores ótimos de pH e temperatura 5,2 e 62°C respectivamente (NG, et al, 1981).

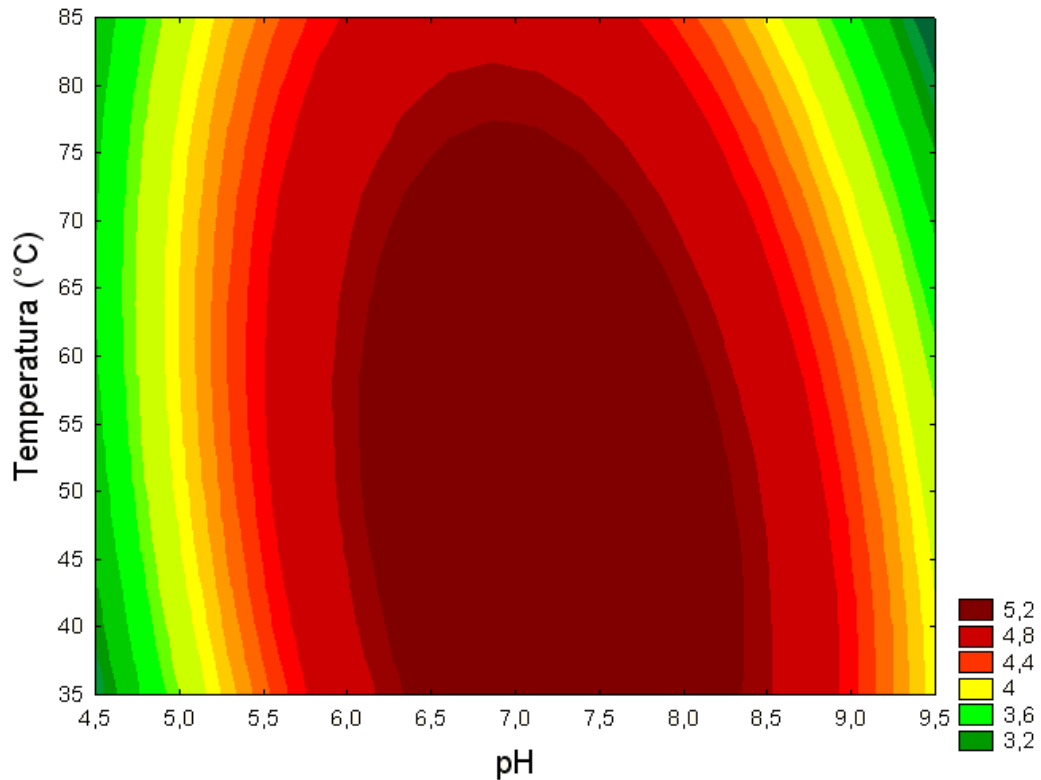


Figura 4. Temperatura e pH ótimo de celulase de *M. pernicioso*. O círculo central em vermelho intenso indica a faixa de temperatura (47,39 °C) e pH ótimo (7,2) da enzima.

Fungos como *Penicilium*, *Aspergillus nidulans* e *Trichoderma viride* apresentam atividade ótima de endoglucanase em pH variando de 4,5 – 6,0 (KAUR et al, 2007; KIM et al, 1994; BAGGA et al., 1990).

Estudos com *P. enchinulatum* e *Thermoascus aurantiacus* demonstraram atividade máxima para endoglucanase a temperatura de 60°C (SILVA, 2008; CAMASSOLA, et al, 2004). Para o multi-complexo enzimático celulolítico a temperatura ótima de 60°C já é muito citada na literatura (KARBOUNE et al, 2008).

Efeito da temperatura para produção de endoglucanase em *Aspergillus niger* e *A. nidulans* foram estudados a temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45°C, obtendo temperatura ótima de 35 e 30°C para *Aspergillus niger* e *A. nidulans* respectivamente (ALI et al, 2008).

Celulases de *Bacillus* foram otimamente ativas em pH de 5-6,5. A enzima apresentou temperatura ótima de 65 e 70 ° C para a endoglucanase de CH43 e HR68, respectivamente (Mawdza et al, 2000).

2.3.2.2 Parâmetros Cinéticos

Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. Utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk que correlaciona linearmente $1/v$ versus $1/[S]$, para a determinação dos parâmetros. Na curva de Lineweaver-Burk o ponto no qual a reta toca o eixo das ordenadas corresponde a $1/V_{max}$, já o ponto no qual a reta toca o eixo das abscissas equivale a $1/K_m$. Os valores de K_m e V_{max} obtidos de celulase de *M. perniciososa* foi de 0,03732 mg/mL e 27,47 μ moles/min/mg respectivamente (Figura 5).

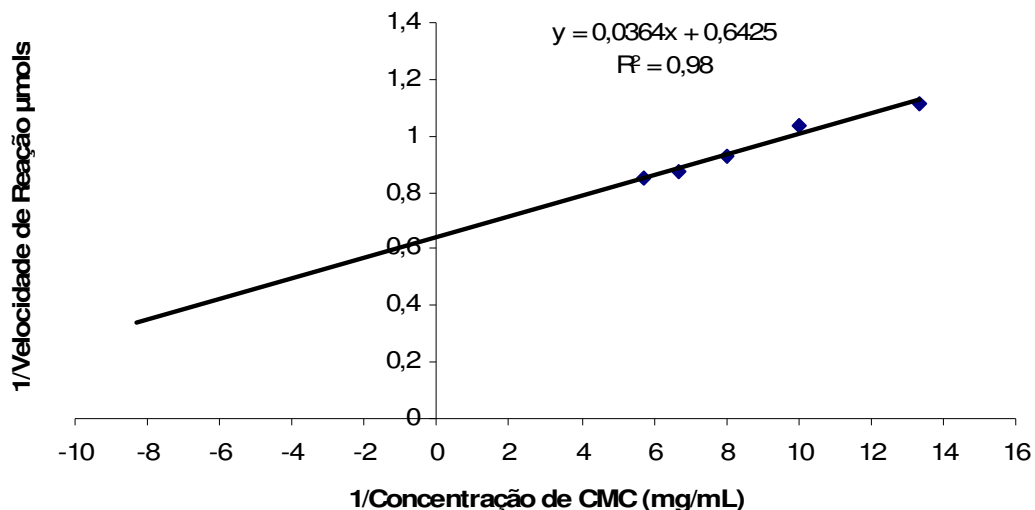


Figura 5: Curva de Lineweaver-Burk referente à celulase produzida por *M. Perniciosa*.

Estudos cinéticos realizados em celulase de *M. pernicioso* demonstraram que a enzima possui maior afinidade ao substrato CMC quando comparado ao K_m de outros organismos citados na literatura. Estudos cinéticos realizados por BAGGA (1990) com duas endoglucanases de *Aspergillus nidulans* apresentaram K_m 5,0 e 4,0 mg/mL e V_{max} 12,0 e 10 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Em endoglucanase produzida por *Salinivibrio* sp a afinidade ao substrato de CMC foi K_m de 3,03 mg/mL e V_{max} de 142,86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (WANG et al, 2009).

2.3.2.3 Estudos da termoestabilidade de celulase

Os efeitos da estabilidade térmica sobre a atividade residual de celulase mostraram retenção de atividade 99%, 95, 05 % 94, 80 % de atividade celulolítica a 60, 70 e 80°C após 30 minutos de incubação respectivamente (Figura 6). O complexo celulolítico após 30 minutos de incubação a 90°C manteve 88,66% sua atividade residual (Figura 6). A presença de enzimas celulósicas estáveis à temperatura de 50 e 60°C está presente em outros microrganismos (KIM et al, 2009; CAMASSOLA et al, 2004; JAGER et al, 2001). Enzimas que apresentam estabilidade em temperatura acima de 40 °C são ditas como termoestáveis, sendo comum encontrar microrganismos mesófilos que cresçam em temperatura de 28 e 32°C e produza enzimas que atuam a temperatura de 60 °C, como por exemplo, glucoamilase de *Neosartorya fischeri* e *Aspergillus fumigatus* (GOMES et al, 2007).

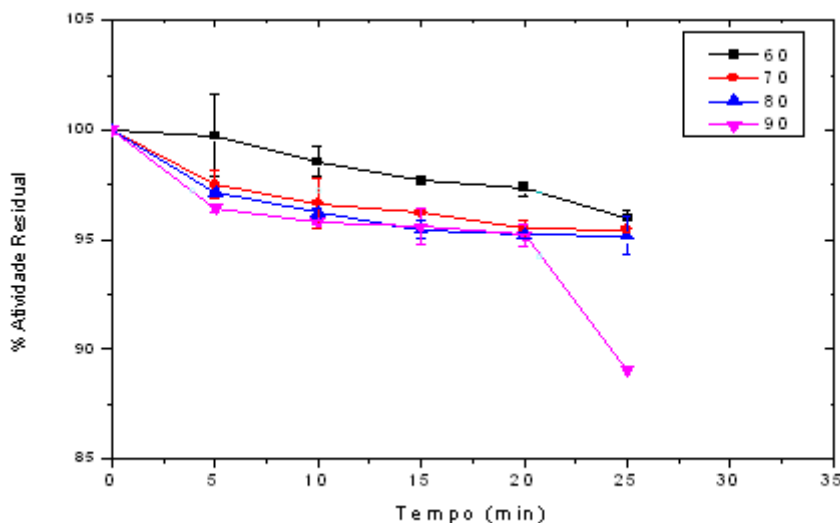


Figura 6. Efeito da termoestabilidade de celulase produzida por *M. pernicioso*. 60 (■), 70 (●), 80 (▲), 90 °C (▼).

Estudos com *A. phoenicis* apresentaram perda total de atividade para endoglucanases após 15 minutos de incubação a 80°C (SILVA, 2008). No actinomiceto *Streptomyces drozdowiczii*, o extrato bruto contendo endoglucanase demonstrou estabilidade térmica ao longo de uma hora e meia a temperatura de 50°C, no mesmo período, 100% de atividade foi reduzida a 60°C (LIMA et al, 2005). Estudos com fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* em endoglucanase e celobiase mostraram que ambas as enzimas permaneceram estáveis a temperatura de 80°C por 42 e 18 minutos respectivamente (Kalogeris et al, 2008). Enzimas termoestáveis são altamente específicas e, portanto, têm um potencial considerável para muitas aplicações industriais.

As enzimas podem ser produzidas a partir de fermentação otimizada de microrganismos mesófilos ou clonagem de rápido crescimento a partir da tecnologia do DNA recombinante (Haki et al, 2003). A hidrólise enzimática da celulase possui aplicações potenciais econômicas e ecológicas. Portanto, a descoberta de novas celulases extremófilas é essencial para atender as necessidades da indústria (Dutta et al, 2008).

2.3.2.4 Influência de sais na atividade de celulase

A influência de brometo de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de amônio e cloreto de potássio foram estudados sobre a atividade de celulase em diferentes concentrações.

A enzima reteve 96% e 94% de atividade residual, quando incubada na presença de brometo de potássio e cloreto de potássio, na concentração de 100 mM (Figura 7). Na presença de 100 mM de cloreto de cálcio e cloreto de amônio, verificou-se a retenção de 74% e 71% de atividade residual, respectivamente.

Em *Clostridium thermocellium* estudos na presença de CaCl na concentração de 5 mM mostraram um aumento de 50% da atividade em endoglucanase (ROMANIEC et al 1992). Resultados obtidos por SILVA (2008) com *A. poenicis* na presença de cloreto de potássio e cloreto de cálcio revelaram perda total de atividade de endoglucanase.

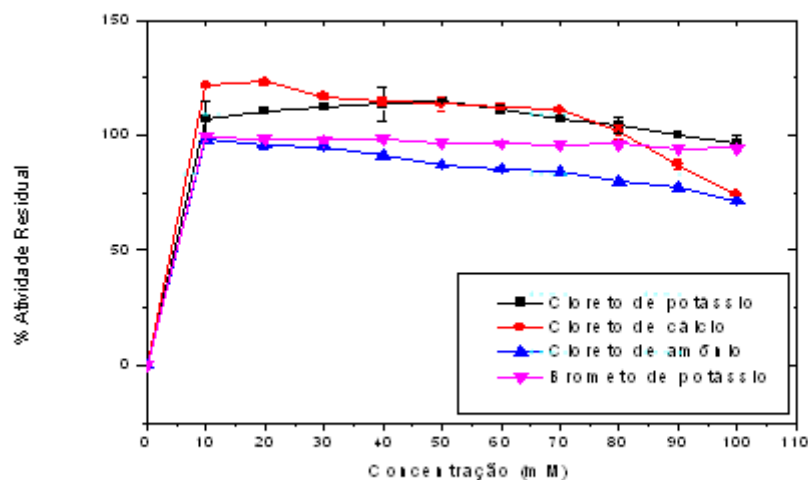


Figura 7: Efeito da influência de sais na atividade de celulase produzida por *M. perniciosa*. Cloreto de potássio (■), Cloreto de cálcio (●), Cloreto de amônio (▲), Brometo de potássio (▼).

REFERÊNCIAS

- ALI, F. H; SAAD EL-DEI, H.S. Production and Partial Purification of Complex by *Aspergillus Níger* and *A. nidulans* on Water Hyacinth Blend. **Journal of Applied Sciences Research**, p. 875-891, 2008.
- ANDREAUS, J. Uso de celulases na indústria têxtil. *In: Seminário Brasileiro de tecnologia enzimática* - ENZITEC, anais: UnB, p. 50, 2002.
- AZEVEDO, J. L. Genética dos fungos. *In: AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: **Educs**, p. 173-212, 2004.
- BAGGA, P. S; SANDHU, D. K; SHARMA, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 61-68, 1990.
- BHAT, M. K; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and potential industrial applications, **Advances Biotechnology, New York**, v.15, p586-620, 1997.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantization of microgram of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.
- CAMASSOLA, M; BITTENCOURT, L. R; SHENEM, N. T; ANDREAUS; J DILLON, A. J. P. Characterization of the cellulose complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p. 361-396, 2004.

DUTTA, T; SAHOO, R; SENGUPTA, R; RAY, S. S; BHATTACHARJE, A and GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 275-282, 2008.

FIEROBE, H.-P, GAUDIN C; BELAICH, A; LOUTFI , M; FAURE, E; BAGNARA C, BATY D; BELAICH J, P. Characterization of Endoglucanase A from *Clostridium cellulolyticum*, **Journal of Bacteriology**, p. 7956-7962, 1991.

FERNANDEZ, M; PEREZ-CORREA, J. R; SOLAR, I; AGOSIN, E. Automation of a solid substrate cultivation pilot reactor. **Bioprocess Engineering**, v.16, p. 1-4, 1996.

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

HAKI, G D and RAKSHIT, S K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, v. 89, p. 17 -34, 2003.

HANS LINEWEAVER, DEAN BURK. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 56, p. 658–666, 1934.

HUA-LI E JING-CHEN E ANNA-LI E DUO-CHUAN LI, Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*, **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p.1297–130, 2007.

JAGER, S; BRUMBAUER, A; FEHER, E RECZER, K;KISS, L. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus strains*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p. 455-461, 2001.

KALOGERIS, E P; CHRISTAKOPOULOS, P; KATAPODIS, A; ALEXIOU, S; VLACHOU, D. K and MACRIS, B.J. Production and characterization of cellulolyticenzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

KARBOUNE, S; GERAET PA; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium*. **Journal of Agriculture and Food chemistry**, v. 56, p. 903-909, 2008.

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

KILARU, A; HASENSTEIN, K. H. Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciosoon*. Interaction with Cacao Leaves. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. 1, p. 101-107, 2005.

KIM, D.W; KIM, T.S. Purification of cellulose from *Trichoderma viride* and properties of Its Component Enzymes, **Bull Koren Chem**, v.15, n.9, 1994.

KIM, BO-KYUNG; LEE, BO-HWA; JIN, II-HYUCK; CHUNG, CHUNG-HAN; LEE, JIN-WOO. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, 411-416, 2009.

LIMA, A. L.G; NASCIMENTO, R. P; BOM, P. S; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 272-277, 2005.

MARTINS, R. E. Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana. Dissertação submetida ao programa de engenharia química da universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

MAWADZA, C; HATTI-KAUL, R; ZVAUYA, R. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. **Journal of biotechnology Y**, v. 83, n. 3, p. 177-187, 2000.

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

NEMETH, A; KAMOND, S; SZILAGYI, A; MAGYAR, C; KOVARI, Z; ZAVODSZYA, P. Increasing the thermal stability of cellulase C using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study, **Biophysical Chemistry**, v. 132, 229–241, 2002.

NG, T. K; ZEIKUS, J.G, Purification and characterization of an endoglucanase (1,4-D-glucanglucanohydrolase) from *Clostridium thermocellum*, **Journal Biochem**, p.199. 341-350, 1981.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelial processes. **Advances Biotechnology**, v. 22, p. 189 – 259, 2004.

ROMANIEC, M. P. M ; FAUTH.U, KOBAYASHI.T ; HUSKISSON.S.N ; BARKER. J, DEMAIN. L. A. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. **Biochem**, 1992.

RUGGER, J. S; TORNISIELO, S. M., Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, **Revista Brasil. Bot.**, V.27, n.2, p.205-211, 2004.

SAHA. B, C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 187-1876, 2004.

SILVA, L. A. D. Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*. Dissertação apresentada ao departamento de Pós-graduação de Microbiologia agrícola e do meio ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

UETANABARO, A. P. T; GÓES-NETO, A. Importance of culture collections of microorganisms (CCMs) for the conservation of microbial biotechnological resources of the

Brazilian semi-arid region. In: Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity. 1st ed. Brasília, DF. **Ministério da Ciência e Tecnologia**, p. 41-43, 2006.

WANG. C; HSIEH. Y, N. G.C. C; CHAN. H. LIN. T. H; TZENG. W; SHYU.Y. Purification and characterization of novel halostable cellulose from *Salinivibrio sp.* Strin NTU-05. **Enzyme and Microbial Technology**, p.44, 2009.

CAPÍTULO 3
DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA CELULASE DE *Moniliophthora*
perniciosa

3.1 INTRODUÇÃO

As celulasas são enzimas responsáveis pela hidrólise de celulose. A celulose é um polissacarídeo composto de unidades de β -D-glicopiranosil, ligados por pontes glicosídicas β -1,4 formando um polímero linear (WULFF, 2002). A conversão microbiana de celulose em produtos solúveis exige a ação de diversos tipos de enzimas glicosídicas hidrolíticas, tais como endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91 e β -glicosidas (EC 3.2.1.21) (GILKES et al, 1991).

Microrganismos capazes de degradar materiais lignocelulolíticos normalmente produzem complexo extracelular de celulasas. Este conjunto de enzimas reflete em diferentes sequências, estruturas e mecanismo hidrolítico com inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico (HENRISSAT et al, 1991). Enzimas com sequencias similares apresentam diferentes especificidades (exo ou endohidrólise), o que sugere que esta atividade seja consequência de detalhes na sua estrutura tridimensional (GILKES et al, 1991).

De acordo com classificação inicial as famílias A, B, H e K contêm enzimas bacterianas e fungicas, a família E contêm bactérias e enzimas de plantas, família C possui somente os fungos e família D e G contêm somente bactérias (BHAT, 1997).

Membros de cada família possuem a mesma proteína dobrada e exibe a mesma seletividade, o que sugere que eles compartilhem um mecanismo geral de hidrólise. Estudos demonstram que o controle da síntese de secreção de celulasas é regulada por celobiose, que é gerada a partir da degradação da celulose.

Este trabalho objetiva elucidar a estrutura 3D de uma celulase de *Moniliophtera pernicioso* por modelagem comparativa. O entendimento químico através da estrutura tridimensional de celulasas *M. pernicioso* possibilitará estudos futuros sobre o mecanismo de ação do fungo e a interação com possíveis inibidores da enzima.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Identificação da sequência e alinhamento dos moldes

A sequência de celulase de *M. perniciosus* foi obtida no banco de dados do projeto genoma de *M. perniciosus* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>). Em seguida, a sequência foi submetida ao PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) contra as proteínas depositadas no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN, *et al.*, 2000) para selecionar proteínas que apresentem grau de homologia igual ou superior a 30% (GOLDSMITH-FISCHMAN, HONIG, 2003). O molde e a sequência alvo foram alinhados pelas ferramentas disponíveis no Swiss PDB Viewer (versão 3.7) (GUEX; PEITSCH, 1997) e submetido ao servidor de modelagem por homologia *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB).

3.2.2 Construção e refinamento do modelo

O modelo 3D da proteína-problema foi construído segundo protocolo de Deep PDB Viewer (3.7). O refinamento foi realizado no Amber 9.0 pelo campo de força ff03 (CASE, D. A. *et al.*, 2006) realizando cálculo de otimização geométrica por métodos de *Steepest Descent* e Gradiente Conjugado com 800 ciclos, seguindo de simulações de dinâmica de aquecimento. Os parâmetros utilizados para dinâmica de aquecimento foram: ntb=0, igb=1, temp0=300, nstlim=50000, dt=0.002, cut=14, rgbmax=12. Posteriormente, foi realizada dinâmica de equilíbrio objetivando verificar estabilidade, utilizando os seguintes parâmetros: ntb=0, igb=1, temp0=300, nstlim=8000000, dt=0.001, cut=14.

3.2.3 Validação

A avaliação da qualidade geométrica das coordenadas da estrutura da proteína foi realizada utilizando o programa Procheck (Versão 3.0) (LASKOWSKI *et al.*, 1994). Neste programa é possível gerar o gráfico de Ramachandran, que avalia os ângulos de torção (*Phi*) e (*Psi*) dos resíduos da estrutura.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A sequência de celulase foi obtida no banco de dados do projeto genoma do *M. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>).

Ao submeter a sequência problema ao BLAST, foram identificadas 110 sequências com grau de homologia superior a 30%, tendo-se maior identidade (63%) com celobiohidrolase II (CBH II) da Família C do fungo *Aspergillus biosporus* (Figura 1). A estrutura de código 2CN3 foi selecionada como molde para construção do modelo tridimensional de celulase de *M. pernicioso* por apresentar maior grau de similaridade (43 %). O molde utilizado (2CN3) é uma beta 1,4 hidrolase xyloglucanase Xgh74A a partir de *Clostridium. Thermocellum* de número E. C 3.2.1.151 com 842 resíduos de aminoácidos que consiste de um módulo catalítico N-terminal (1- 776 resíduos) e C-terminal (777- 842 resíduos) (MAETINEZ-FLEITES et al, 2006).

O domínio catalítico da família de celobiohidrolase é descrito como uma grande proteína α/β , com atividade na porção C-terminal a partir de fitas- β . Possui uma estrutura de túnel fechado que permite a interação do domínio catalítico com pontes soltas da superfície de celulose cristalina (HUI, et al, 2002). Possui dois ácidos aspárticos essenciais para catálise localizados no centro da proteína (BHAT, 1997). CBH II hidrolisa terminais não redutores, sendo inibida pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO & PEREIRA, 2010).

Os domínios catalíticos de todas as celulasas são razoavelmente grandes, representado cerca de 70% da proteína total. Análises baseadas na similaridade do sítio catalítico consideram variações entre diferentes celulasas (BHAT, 1997).

Resíduos Asp401, Asn402, Tyr139, Gln575, Phe276, Tyr551 foram descritos como sítio catalíticos conservados em *C. thermocellum* da família celD (JUNG et al, 1993), resíduos de Gly82, Ser83, Asp221, Asp175 e Try169 em CBH II de *T. reesei* pertencente à família C (HUI et al, 2002; KOIVULA et al, 1996). Uma análise realizada pelo EditSeq/Lasrgene (BURLAND, 2000) revelou que a sequência de celulase de *M. pernicioso* apresenta 2.193 pares de bases, 731 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de 77,36 kDa e ponto isoelétrico 6,4. Estudos realizados por BAGGA et al (1990), revelaram três celobiohidrolases com massa molecular de 72,00, 29,00 e 138,0 kDa.

Asp699 – Lys703, Asp341 – Arg339, Asp175 – Lys178, Asp68 – Arg723, Asp57 – Arg99, Asp175 – Arg165, Asp509 – Lys590, Asp700 – Lys676, Asp205 – Arg149, Asp361 – Lys359).

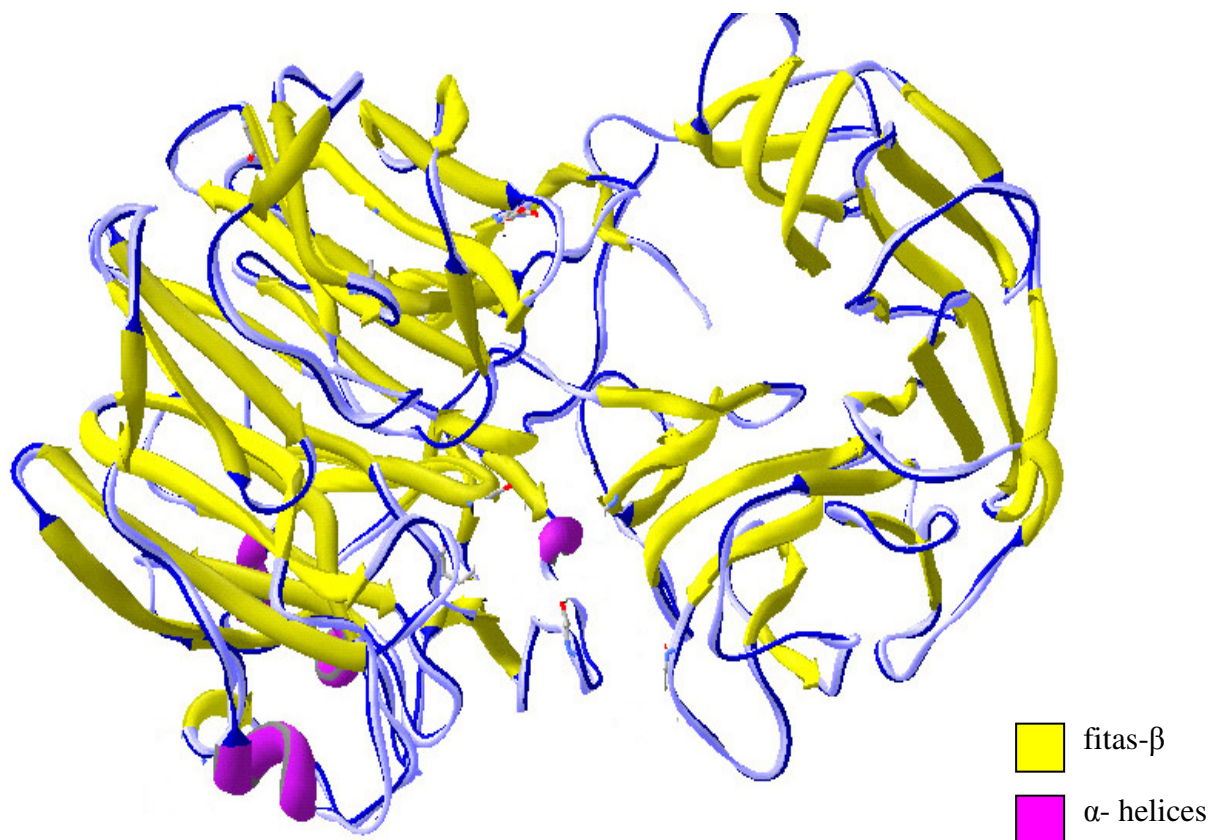


Figura 2: Modelo inicial celu01 de celulase de *M. perniciosa*. Em amarelo fitas- β e rosa α - helices

No modelo obtido foram encontrados dois resíduos aspárticos (Asp50 e Asp462) (Figura 3). Estes resíduos são conservados em todos os membros da família das hidrolases glicolíticas (MARTINEZ-FLEITES et al, 2006). A catálise ácida é realizada pelos resíduos de aspartato ou glutamato ou ambos. Nesta catálise, ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando na inversão ou retenção do carbono anomérico glicosídico hidrolisado (WULFF et al, 2002; GILKES et al, 1991). Estes resíduos foram também encontrados em endoglucanases de *Ampullaria crossean*: Asp43 e Asp153 pertencentes à família 45 (GUO et al, 2008), Asp480 de xilogucanase de *Clostridium Thermocellum* (MARTINEZ-FLEITES et al, 2006), Asp56 e Asp59 em endoglucanase de *C. cellulolyticum* (PARSIEGLA. et al, 2002),

e Asp35 e Asp465 em *Geotrichum sp.* (YAIIO et al, 2007). Em CBH II de *T. reesei*: Asp221 e Asp175 (HUI et al, 2002).

Após o refinamento, o modelo de celulase denominado de celu01, apresentou quando validado pela análise do gráfico de Ramachandran 553 resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis representando 93,5% e 38 de resíduos em regiões pouco favoráveis equivalente a 6,5 % (Figura 3).

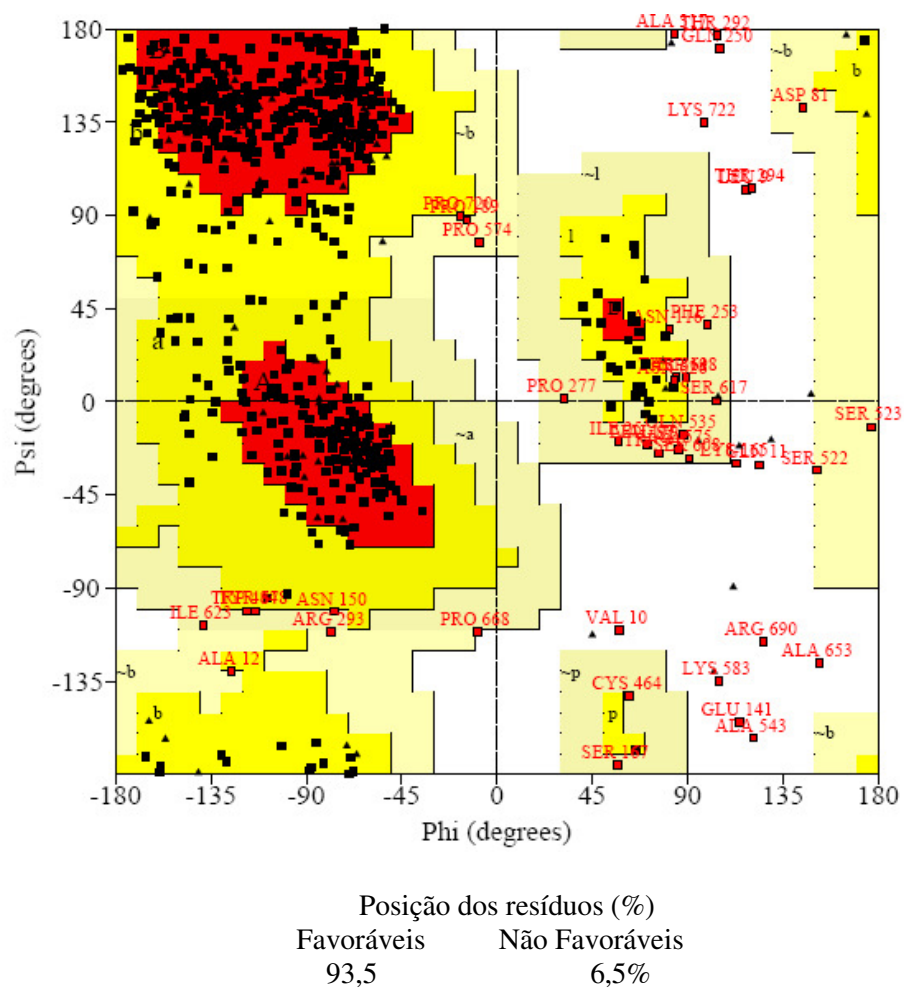


Figura 3. Validação representada pelo gráfico de Ramachandran dos fragmentos modelo 3D celu 01de celulase de *M. perniciosa*, utilizando o molde denominado de 2cn3 após refinamento.

O objetivo da dinâmica de aquecimento é prepara o sistema para a dinâmica de equilíbrio através do aumento gradual da temperatura.

Após simulação de dinâmica de aquecimento com duração de 100 picossegundos (ps), o modelo celu01 apresentou uma considerável variação das coordenadas atômicas (RMSD) após 10 ps de simulação, com aumento gradual ao decorrer do tempo (Figura 4). Essa variação já é esperada, uma vez que o aumento da temperatura permite o movimento atômico do sistema, favorecendo assim pequenas alterações na geometria da molécula.

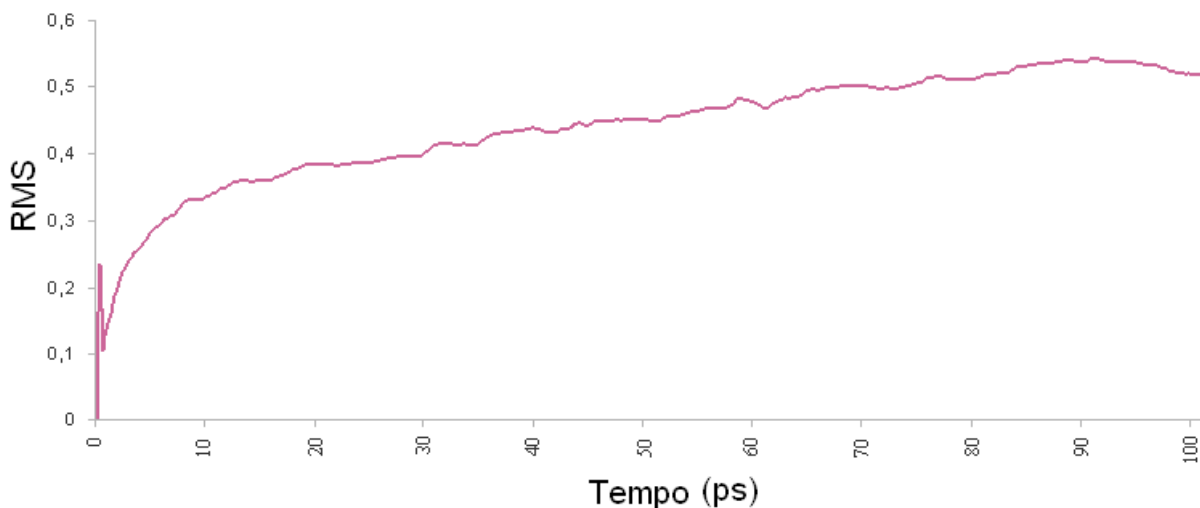


Figura 4. Desvio RMS do modelo de celu01 de *M. pernicioso* após dinâmica de aquecimento

Ao final das simulações de dinâmica de equilíbrio, com durações de 8,00 nanossegundos (ns), percebeu-se um início de simulação estável, aproximadamente entre 2,00 e 2,36 nanossegundos, com um RMSD de 1,5 entre as coordenadas atômicas da estrutura inicial. Observou-se também uma pequena estabilidade com o aumento ao decorrer do tempo. O período compreendido entre aproximadamente 3,58 a 4,19 nanossegundos foi marcado por uma variação menos expressiva do (RMSD) que é uma tendência de estabilização geométrica do modelo. Ao final de simulações de 8,00 ns, o modelo final apresentou energia final de -49600.7724 kcal/mol.

A partir desse ponto o sistema apresenta uma acentuada variação, a qual permanece crescente ao decorrer do tempo (Figura 5). Algumas estruturas podem sofrer uma

instabilidade energética no início da simulação entre 1 a 5 nanossegundos, porém o aperfeiçoamento da estrutura poderá ser significativo quando observado em maior tempo de simulação de dinâmica molecular (FAN et al, 2003).

O modelo final apresenta-se com 3 α -hélices, 44 fitas- β antiparalelas e 48 *loops* (Figura 6). Os resíduos descritos como essenciais para atividade catalítica são: Asp60, Ans148, Arg142, Gly417, Gly418, Trp469 e Asp470 (Figura 6) correspondem a Ala70, Ans154, Arg158, Trp395, Gly430, Trp410 e Asp480 do molde.

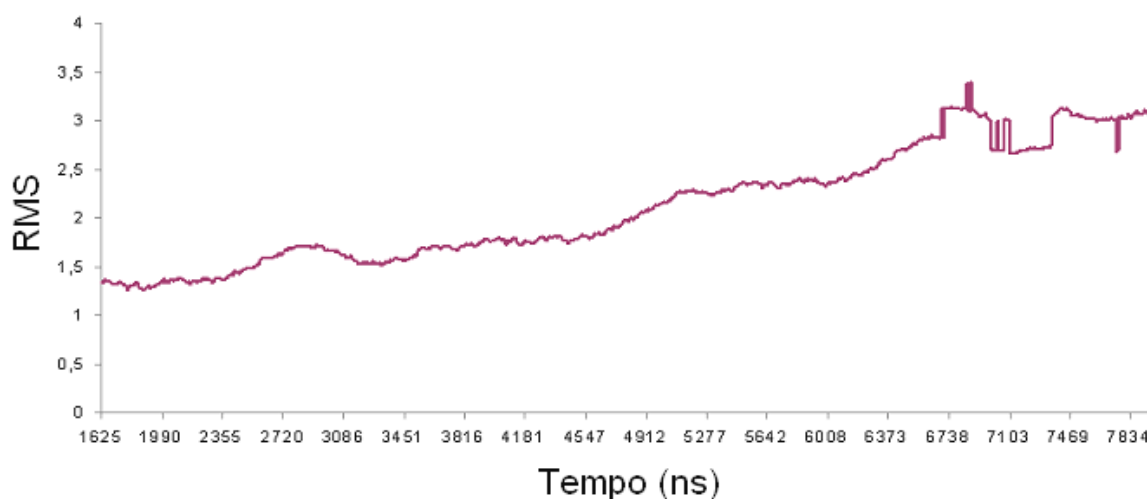


Figura 5: Desvio RMS do modelo de celu01 de *M. perniciososa* após dinâmica de equilíbrio

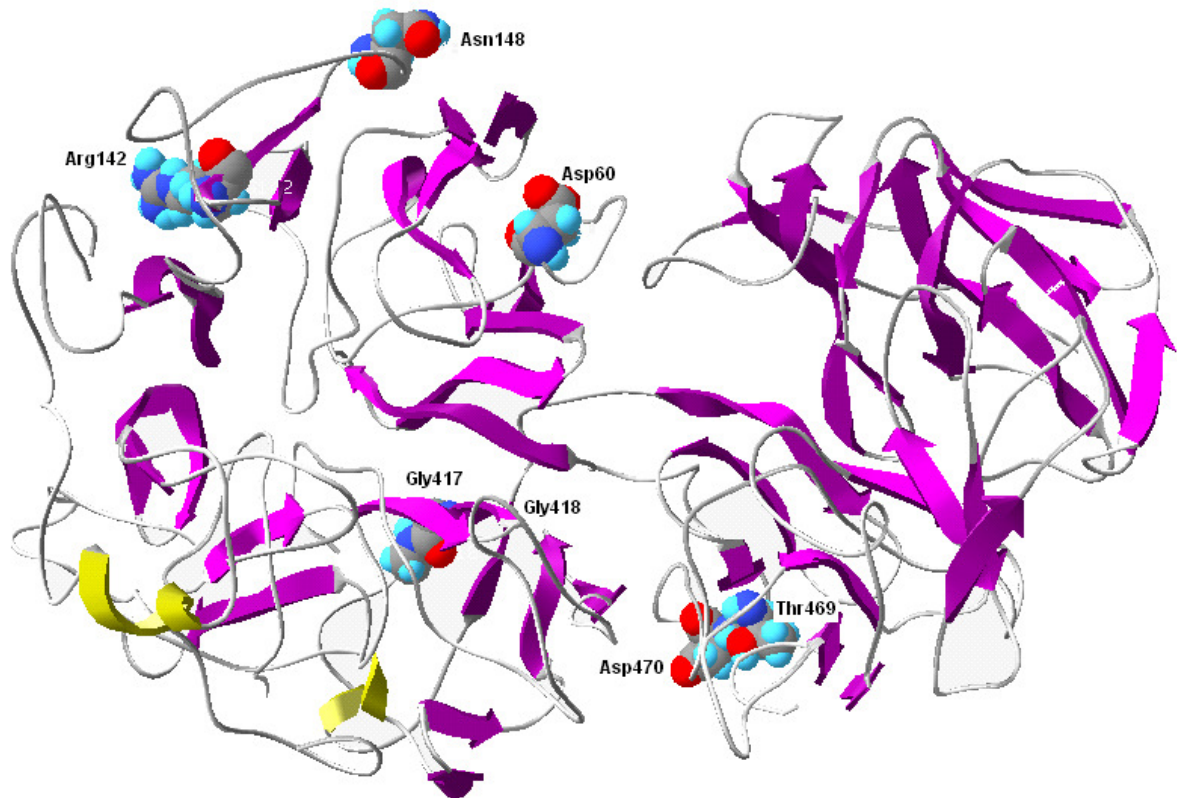


Figura 6. Modelo final de celu01 de *M. perniciosus*. Em destaque estão os resíduos descritos como catalíticos (Asp60, Asn148, Arg142, Gly417, Gly418, Thr469 e Asp470), identificados em celulase de *M. perniciosus*. Em destaque amarelo α -hélices e em verde fitas- β .

REFERÊNCIAS

BHAT, M. K; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, p. 583-620, 1997.

BERMAN, H. M; WESTBROOK, J; FENG, Z, GILLILAND, G; BHAT, T. N, WEISSIG, H; SHINDYALOV, I. N; BOURNE, P. E. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BURLAND, T. G; DNASTAR's. Lasergene sequence analysis software. **Methods Mol Biol.** v.132, p. 91, 2000.

CASE, D.A; DARDEN, T.A; CHEATHAM, T.E; SIMMERLING, C.L; WANG, J, DUKE,R.E; LUO, R, MERZ, K.M; WANG, B, PEARLMAN, D.A; CROWLEY, M, BROZELL,89 S; TSUI, V; GOHLKE, H; MONGAN, J; HORNAK, V; CUI, G; BEROZA, P; SCHAFMEISTER, C; CALDWELL, J.W; ROSS, W.S; KOLLMAN, P. A. **Amber 9**. University of California, 2004.

CASTRO, A. M; FERREIRA, N. Jr. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 33, p. 181-188, 2010.

FAN, H; MARK, A. Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques. **Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute**, 2003.

FERREIRA, L.M.A; DURRAT, A.J; HALL, J;HAZLEWOOD, G.P. Spatial separation of protein domains is not necessary for catalytic activity or substrate binding in a xylanase. **Biochem. J.** v. 269, p. 261-264, 1990.

FLEITES, C. M; GUERREIRO, C. I. P. D; BAUMANN, M.J; TAYLOR, E.J; PRATES,J. A.M; FERREIRA, L. M. A; FONTES, C.M.G.A; BRUMER,B; DAVIES,G.J. Crystal Structures of *Clostridium thermocellum* Xyloglucanase, XGH74A, Reveal the Structural Basis for Xyloglucan Recognition and Degradation. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, 34, p. 24922-24933, 2006.

GILKES, N.R; HENRISSAT, B; KILBURN, D.G; MILLER, R.C. Jr; WARREN, R.J. Domains in microbial β -1,4-glyconases: sequence conservation, function, and enzymes families. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 303-315, 1991.

GOLDSMITH-FISHMAN, S, HONG, B. Structural Genomics: computational methods for structure and analysis. **Protein Science**, v. 12, p. 1813-1821, 2003.

GUO, R; DING, M; ZHANG, G. J. K. X; ZHAO, F. Molecular cloning and characterization of two novel cellulase gens from the mollusc *Ampullaria crosseana*. **J. Physiol**, p.209-215, 2008.

GUEX, N; PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

HENRRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolyses based on amino acid sequence similarities. **Biochem J**, v. 280, p. 309-316, 1991.

HUMPHREY, W; DALKE, A; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics".**Journal Molec**, v. 14, p. 33-38, 1996.

HUI, J. P. M; THERESE, C. W; THIBAUT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. **Glycobiology**, v. 12, p. 837-849, 2002

JUNG, E. D; LAO, G; IRWIN, BRIAN, D; BAR,K. B; BENJAMIN, A; WILSON, A B. DNA Sequences and Expression in *Streptomyces lividans* of an Exoglucanase Gene and an

Endoglucanase Gene from *Thermomonospora fusca*, Applied and Environmental Microbiology, p.3032-3043, 1993.

LASKOWLSKI, R. A; MAC-ARTHUR, M.W; SMITH, D.K; JONES, D.T; HUTCHINSON, E.G;MORRIS, A.L; NAYLOR, D; MOSS, D; THORNTON, J. M. **Manual Procheck** v.3, Program to check the stereochemistry quality of protein structure, p. 27, 1994.

KOIVULA, A; REINIKAINEN, T; RUOHONEN, L; VALKEAJARVI, A; CLAEYSSSENS, M, TELEMAN, G, J; SZARDENINGS, M; ROUVINEM, J; JONES, A. T; TEERI, T. T. The active site of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II: the role of tyrosine 169. **Protein Engineering**, v. 9, p. 691-699, 1996.

YAIIO, K; KONDO, H; HIYOSHI, A; NORO, N, SUGIMOTO, H; TSUDA, H; MITSUISHI, Y; MIYAZAKI, R. The structural basis for the exo-mode of action in GH74 oligoxyloglucan reducing ende-specific cellobiohydrolase. **Journal. Mol. Biol**, v. 370, p. 53-62, 2007.

WULFF, N. A. Caracterização enzimática das celulases XF-810, XF-818 e XF-2708 de *Xylela Fastidiosa* e purificação da proteína XF-818, expressas em *escherichia coli*. Tese de Doutorado apresentada a escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz – Piracicaba, SP, 2002.

PARSIEGLA, G; BELAICH, A; BELAICH, J. P; HASER, R. Crystal structure of the cellulase Ce19M enlightens structure/function relationships of the variable catalytic modules in glycosidase hydrolyses. **Biochemistry**, v. 41, p. 1134-11142, 2002.

CAPITULO 4

APLICAÇÃO DE ENZIMAS DO CELULOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Moniliophthora pernicioso.*

4.1 INTRODUÇÃO

As celulasas são enzimas com diversas aplicações tecnológicas, e são obtidas em sua grande maioria a partir de fungos filamentosos. Dentre as suas aplicações industriais encontram-se a indústria farmacêutica, têxtil, papel e celulose, combustível, medicina, química fina, agroindústria e alimentação animal (MARTINS, 2007).

A produção de energias alternativas a partir de materiais lignocelulósicos, é um bom exemplo de sua aplicação, o que vêm atraindo vários pesquisadores a utilizarem resíduos agroindustriais, como palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo bagaço de mandioca entre outros, como substratos para produção de etanol (RAMOS, 2003).

A produção de etanol por fermentação de celulose necessita primeiramente a separação da lignina e hemicelulose presentes e posterior hidrólise para geração de glicose. Diferentes tecnologias para a hidrólise dos polímeros e ou separação dos componentes do bagaço de cana, estão sendo estudadas, as quais podem ser utilizadas individualmente ou combinadas, como: (i) o cozimento sob pressão que hidrata a celulose nas regiões mais resistentes a ação enzimática e a ácidos, mas degrada a hemicelulose a furfural; (ii) hidrólise ácida em condições severas é eficiente, mas gera produtos inibidores para os microrganismos fermentadores dos açúcares (GURGEL et al., 1998). A lignina é solúvel em solvente orgânico, mas esse tratamento possui custo elevado. O tratamento alcalino pode degradar hemicelulose a furfural, mas pode formar produtos inibidores da fermentação como o furfural (MARTINS, 2008).

Sendo assim, após a separação dos constituintes a hidrólise enzimática é uma alternativa recomendável para fermentação de materiais lignocelulolíticos. A hidrólise controlada com ácido diluído pode romper ligações lignina-hemicelulose, extraindo hemicelulose e disponibilizando celulose para ação enzimática. Assim, o cozimento rápido sob pressão de bagaço utilizando ácido diluído por curto tempo, seguido de descompressão rápida pode ser uma boa alternativa para preparar o material para ação das enzimas (RAMOS, 2003).

Quanto ao uso de enzimas do complexo celololítico na indústria de suco clarificado, a reação ocorre mediante a degradação de macromoléculas solúveis, reduzindo a viscosidade. O suco clarificado pode ser utilizado em formulação de refrescos e bebidas prontas para consumo, repositores eletrolíticos, refrigerantes carbonatados ou como insumo na indústria de sorvetes, geléias, etc (WOLKOFF et al., 2003). O suco de caju é consumido e apreciado em

todo mundo, não só pelo sabor, mas, também, por apresentar uma mistura de minerais, ácidos orgânicos, polifenóis, açúcares e uma fonte de vitamina C.

Segundo a legislação brasileira que estabelece o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco tropical de caju, o suco de caju clarificado é definido como bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale, L*) através de processos tecnológicos adequados. O suco de caju clarificado deve obedecer às características de cor variando de branco a amarelo, sabor próprio, levemente ácido e adstringente e aroma próprio (BRASIL, 2000).

Muitos trabalhos têm focado o uso de complexos enzimáticos de pectinases e celulases para extração e clarificação e de sucos de frutas. No entanto, são raros os registros de aplicação dessa tecnologia para suco de caju com extrato bruto contendo enzimas do complexo celulolítico. Neste trabalho objetivamos aplicar o extrato bruto contendo enzimas do complexo celulolítico na conversão de celulose de bagaço-de-cana, após pré-tratamento com explosão a vapor e ácido diluído e na clarificação de suco de caju.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes

Carboximetilcelulose, glicose, albumina bovina, Batata, dextrose, Agar (BDA - HiMedia) foram obtidas da Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), solução tampão de osfato de sódio 0,2 M, Tris 0,2 M, ácido dinitrosalicílico (DNS). O suco de caju foi gentilmente fornecido pela empresa Necctare localizada na Rod BR-324 Km 96 - S/N, Feira de Santana – Ba.

4.2.2 Microrganismo

As amostras de *M. pernicioso* (CCMB 0257) foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB).

4.2.3 Condições de cultivo de *Moniliophthora perniciosa*

O fungo foi cultivado em meio sólido por 10 dias em caldo batata e dextrose. O complexo celulolítico foi produzido utilizando meio líquido contendo a seguinte composição: (g L⁻¹): farelo de trigo, 40,0; extrato de levedura variando de 3 a 9; K₂HPO₄ 3H₂O, 1,0; MgSO₄ 7H₂O, 0,2; KCl, 0,2. Um disco de 1 cm de diâmetro do micélio foi transferido para frasco de erlenmeyer de 100 mL contendo o substrato de extrato de levedura. A incubação foi realizada a 28°C variando de 7 a 21 dias a 120 rpm. O meio líquido foi filtrado e centrifugado a 8.000 g por 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como um extrato bruto enzimático (HUA et al., 2007)

4.2.4 Tratamento térmico do bagaço de cana-de-açúcar

O tratamento foi realizado utilizando 100 g do bagaço-de-cana lavado e moído, que foi autoclavado (121°C por 30 minutos) com 2L de hidróxido de sódio a 4%. Em seguida, o material foi filtrado e neutralizado com ácido fosfórico a 10% e seco em estufa a 65°C até a massa constante. Ao bagaço, foi adicionada a mesma quantidade de água destilada e autoclavou-se a 121°C por 30 minutos. A suspensão foi filtrada e o material sólido seco a 65 °C até massa constante (MENEZES e AGUIA, 2002).

4.2.5 Ensaio de hidrólise do bagaço de cana utilizando extrato bruto de *M. perniciosa*

A eficiência de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi conduzida em frascos com tampa e incubados em solução tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 a 50°C em duas concentrações de extrato bruto (0,5 mg/mL e 0,75 mg/mL). A conversão de celulose foi determinada através do método de DNS (MILLER, 1959) para quantificação dos açúcares redutores ao longo do tempo de 0 a 168 horas.

4.2.6 Filtração do extrato bruto e obtenção das amostras

O extrato bruto contendo as enzimas foi filtrado em membrana de 0,22 μ m, para redução da carga microbiana. As amostras de suco de caju foram fornecidas pela empresa NECTARE previamente pasteurizadas a 90° C/45 min com teor °Brix 13 e acidez 0,89.

4.2.7 Delineamento experimental para clarificação do suco de caju

Para avaliar a melhor concentração enzimática e tempo de clarificação do suco de caju foi realizado o delineamento experimental, avaliando duas variáveis: (i) concentração de extrato bruto (ii) tempo de clarificação e ponto central, levando a um total de 9 experimentos (Tabela 1). Sendo assim, a concentração do extrato bruto foi estudado em três concentrações (100, 250 e 400 ppm) e o tempo de clarificação estudados em cinco níveis (10, 20, 30, 40 e 50 minutos). A hidrólise ocorreu em becker de 600 ml, nos quais o suco foi aquecido a 40°C. A reação foi paralisada, resfriando o suco durante 10 minutos.

Tabela 01. Delineamento fatorial para avaliar o tempo e a concentração de celulase para clarificar o suco de caju

Tempo (minutos)	Concentração de extrato bruto (ppm)
20	400
40	400
10	250
30 (ponto central)	250
50	250
20	100
40	100

4.2.8 Características físico-químicas e microbiológicas

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado utilizando refratômetro (modelo Bellingham & Stanley Limited) e acidez titulável total com NaOH 0,1 M, os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico, usando fenolftaleína como indicador de acordo com o delineamento experimental (Tabela 3). O perfil microbiológico do suco de caju foi

realizado conforme Silva (1997) compreendendo em *Bacillus cereus*, coliformes fecais e totais, *Salmonella* sp., bolores, leveduras e *escherichia coli*. A eficiência da clarificação do suco foi avaliada em viscosímetro (Brookfield) expressa em mPas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Conversão de celulose

Dos métodos de pré-tratamentos utilizados para despolimerizar, solubilizar ou remover a lignina presente nos materiais lignocelulolíticos, o processo de explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina tem sido um dos mais promissores para o fracionamento dos três constituintes principais da fitomassa paralelamente a um aumento significativo da susceptibilidade da celulose a sacarificação enzimática (RAMOS, 2003).

Nos resultados obtidos, observou-se que após 3 dias de reação conduzida com 0,75 mg/mL de extrato bruto, ocorreu um aumento de cerca de 25 % de conversão do bagaço de cana, dobrando este valor a partir de 4 dias de reação, permanecendo constante ao longo do tempo estudado. No entanto, no mesmo período a reação conduzida com 0,5 mg/mL apresentou apenas aproximadamente 13 % de conversão, ocorrendo um aumento de cerca de 22 % após 4 dias permanecendo estável ao longo do tempo (Figura 1).

Em se tratando do uso de um complexo enzimático, não se pode afirmar que a produção de açúcares redutores presente no meio se deve somente a ação do complexo celulolítico, podendo ocorrer à ação de outros complexos enzimáticos, como as xiloglucanases que atuam na hidrólise da celulose. A estabilidade de velocidade de reação em ambas as concentrações pode estar relacionada à sua estabilidade operacional, uma vez que após um longo período a estabilidade térmica enzimática vai sendo diminuída.

Um dos principais problemas na hidrólise enzimática reside na necessidade de alta estabilidade térmica das enzimas para trabalhar com altas temperaturas e assim atingir altas velocidades de reação e solubilização dos reagentes.

Em relação a concentração e tempo de conversão do bagaço de cana, pode-se afirmar que a concentração do extrato enzimático possui grande influência na conversão do bagaço de cana-de-açúcar.

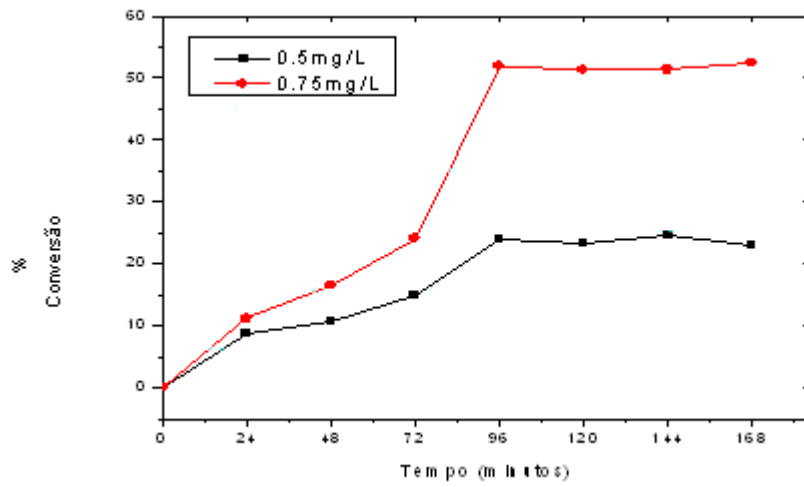


Figura 1. Conversão do bagaço de cana a partir do extrato bruto a 0.5 mg/mL (■) e 0.75 mg/L (●)

4.3.2 Clarificação de suco integral de caju

A partir dos dados obtidos em gráfico dos ensaios de concentração de extrato e tempo de clarificação, pode-se observar que o tempo ótimo encontrado de clarificação e concentração de extrato, foram de 25,9 minutos e 228, 22 ppm respectivamente. Figura 2 e 3.

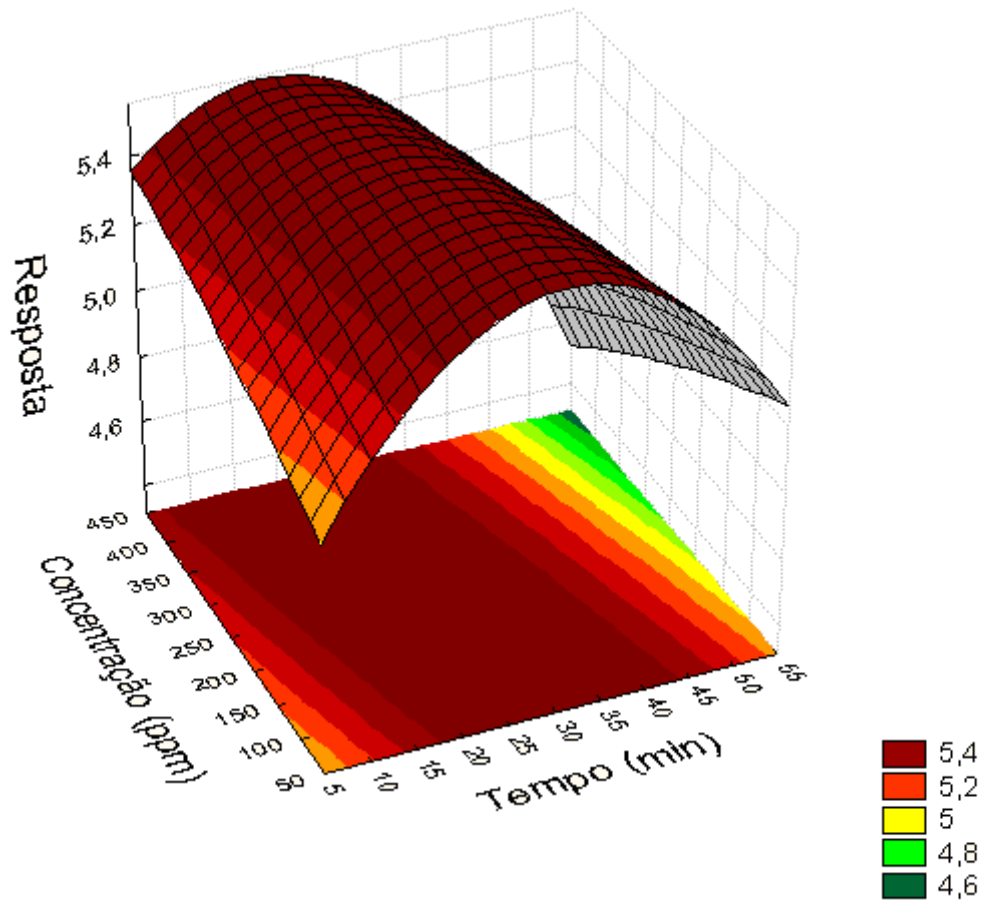


Figura 2: efeito da clarificação do suco de caju. O ponto central em vermelho indica a influencia da concentração de extrato enzimático em relação tempo de clarificação.

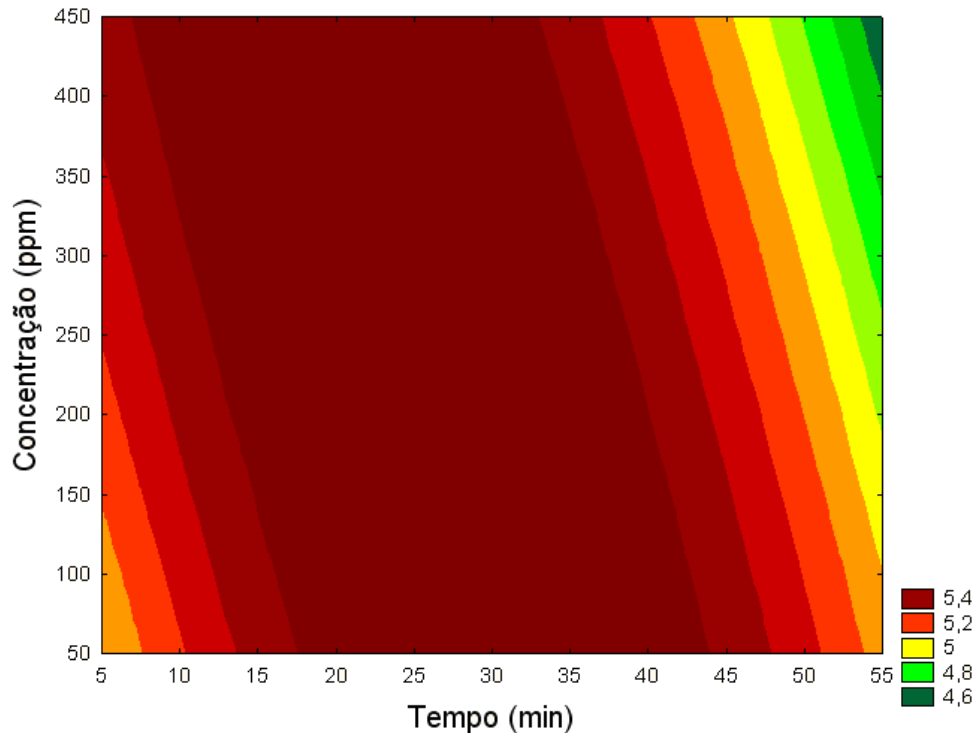


Figura 3. Efeito da clarificação do suco de caju em função do tempo de clarificação e concentração de extrato utilizado.

O uso de enzimas de origem fungica na clarificação de suco é uma tecnologia de grande vantagem industrial, devido principalmente à alta eficiência na liquefação dos materiais insolúveis presentes no suco, redução do tempo de clarificação e baixo custo de obtenção. Os resultados obtidos podem não se referir apenas à ação do complexo celulolítico, uma vez que o fungo *M. perniciososa* pode produzir outros complexos enzimáticos que atuam na liquefação dos polissacarídeos presentes no suco.

A turbidez dos sucos é devida a presença de materiais insolúveis como fragmentos celulares provenientes diretamente do tecido polposo e ou componentes não perfeitamente dissolvidos. Esses materiais insolúveis, responsáveis por muitas das características de sabor, aromas e cor do suco, variam de tamanho indo da ordem micra até grandes fragmentos de polpa. A utilização de enzimas pode aumentar o rendimento e auxiliar na clarificação do suco de uma ampla gama de frutas (SANTIN et al., 2003).

As celulases são aplicadas na indústria de sucos, tanto na clarificação como na extração em combinação com pectinases e hemicelulases. O efeito sinérgico da combinação dessas enzimas é um processo crucial no tratamento enzimático da polpa para uma quase completa liquefação das frutas e dos vegetais, reduzindo os custos e melhorando o rendimento do produto final (OLIVEIRA et al, 2006).

No suco de limão a clarificação ocorre na presença de celulases e pectinases. No suco de maçã, o uso do complexo contendo celulases e pectinases é fundamental para hidrolisar a pectina que ocorre em grande quantidade (SANTINI et al, 2003). O uso de celulases no suco de laranja em diferentes concentrações influenciaram em 80% da viscosidade com 200 ppm da enzima durante 15 minutos (CLOTTEU et al, 2002).

A concentração de sólidos solúveis foi reduzida a 10°Brix após os tratamentos enzimáticos. No entanto, este valor permaneceu durante todo processo, não ocorrendo alterações em função do tempo de reação e concentração do extrato bruto. Quanto mais solutos (açúcar) estão dissolvidos na solução, maior o aumento da viscosidade (CONSTENLA et al, 1989).

Quanto à acidez total do suco, em nenhum dos tratamentos enzimáticos utilizados apresentaram alterações. As análises microbiológicas não revelaram presença de microrganismos no suco.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Instrução normativa nº1 de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de caju com alto teor de polpa. **Diário oficial a republica federativa do Brasil**, Brasília, 2000.

COELHO, M. X; LEITE, S. G, F; ROSA, M, F. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *CEPP* v.19, n.1, p.33-42, 2001.

CLOTTEAU, M. S; CABRAL, L. M. C; MODESTA, R. C. D; GOMES, F. S; VENTURINI, W, PALLET, D; DORNIER, M; REYNES, M. Enzymatic treatment using a polygalacturonase (Clarex Citrus 8 XL) and a cellulase (Rapidase TF). In: **XVIII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, 2002.

CONSTENLA, D.T; LOZANO, J. E; CAPRISTE, G. H. Thermophysical properties clarified apple juice as a function of concentration and temperature. **Journal of Food Science**, v.54, n. 3, p.663-668, 1989.

GURGEL, P.V; FURLAN, S. A; MARTINEZ, S. E. R; MANCILHA, I. M. Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzante treatments for xylitol production. **Braz. J. Chem. Eng.** v.15, p.3, 1998.

HUA-LI and JING-CHEN and ANNA-LI and DUO-CHUAN LI, Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*, **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p.1297–130, 2007.

MARTINS, R. E. Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana. Dissertação submetida ao programa de engenharia química da universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

MENEZES e AGUIAR. Conversão enzimática do bagaço de cana-de açúcar. **Biotecnologia, Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 26, 2002.

MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. **Analytical Chemitry**, v. 31 3, p. 426-428, 1959.

OLIVEIRA, M. C. S; SILVA, N. C. C; NOGUEIRA, A; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v. 26, n.4, p. 906-915, 2006.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the treatment of ligncellulsic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

SANTIN, M. M; VALDUGA, E; TREICHEL, H, DI LUCCIO, M. estudo do processo de hidrolise enzimático de polpa de pêssego, **Revista de pesquisa e Pós-graduação – Santo Ângelo**, 2003.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

WOLKOFF, D. B; SILVA, L. F. M; MORETTI, R. H; MATTA, V. M. Avaliação da estabilidade de bebida repositora hidroeletrolítica à base de sucos microfiltrados de acerola e caju. In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS. **Programas e resumos**, UTFSM, n. 4, p. 199, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação à produção de celulases de *M. pernicioso* em meio líquido, os resultados obtidos, através do delineamento experimental, mostram que o extrato de levedura apresentou um bom substrato para produção de enzimas do complexo celulolítico produzidos por *M. pernicioso*.

A enzima apresentou pH 7,2 e temperatura de 47°C como ótimo de atividade, o que pode ser comparado a similaridade dos resultados com a literatura. A enzima demonstrou ser eficiente para aplicação industrial devido a sua estabilidade térmica.

A enzima manteve sua atividade quando estudada na presença de diferentes sais. A presença de cloreto de potássio e brometo de potássio apresentou-se eficientes sobre a atividade de celulase, podendo ser utilizados como ativadores da enzima em processos industriais.

Os estudos cinéticos mostraram que a enzima apresentou grande afinidade pelo substrato CMC, quando comparado a outros organismos.

O complexo celulolítico foi eficiente na hidrólise do bagaço-de-cana de açúcar e na redução da viscosidade do suco de caju, tendo perspectivas de usos em processos de interesse industrial.

A sequência obtida no banco de dados do projeto genoma de *M. pernicioso* possui 2.193 pares de bases e 731 resíduos de aminoácidos. Esta sequência apresenta regiões conservadas com identidade com sequências da celulase de outros fungos depositados no Genbank, apresentando maior grau de identidade com CBH II da família 6 (63%).

Na busca de um molde utilizando a ferramenta BLASTp, contra o banco de dados PDB, encontrou-se apenas duas estruturas. Para a construção do modelo escolheu-se como homólogo o molde 2CN3 por apresentar maior grau de identidade (43%).

Utilizando a proteína molde foi possível determinar resíduos citados na literatura como catalíticos presentes no modelo de celulase e estudos posteriores de interações entre ligante-receptor por *docking* poderão levar à obtenção de estruturas capazes de inibir o fungo e deste modo obter a um controle efetivo da praga da vassoura-de-bruxa.

Em resumo, *M. pernicioso* demonstrou ser uma excelente fonte de produção de enzimas do complexo celulolítico e um promissor em diferentes processos industriais, sendo interessante a realização de estudos posteriores com as demais enzimas.