



**Universidade de Brasília**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Instituto de Biologia

**Perfil e caracterização de holocelulases  
secretadas por *Penicillium fellutanum* com  
ênfase em mananase.**

Helder Andrey Rocha Gomes

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

**Brasília, Fevereiro/2014**



**Perfil e caracterização de holocelulases  
secretadas por *Penicillium fellutanum* com  
ênfase em mananase.**

**Helder Andrey Rocha Gomes**

**Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação da Universidade de  
Brasília como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de mestre em  
Biologia Microbiana.

**Brasília, Fevereiro/2014**

**Perfil e caracterização de holocelulases secretadas  
por *Penicillium fellutanum* com ênfase em  
mananase.**

**Helder Andrey Rocha Gomes**

**Banca examinadora:**

- ✓ **Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau – Membro Externo**
- ✓ **Prof. Dr. Helson Mário Martins do Vale – Membro Interno**
- ✓ **Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart – Suplente**

**Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho – Orientador**

**Brasília, Fevereiro/2014**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre me protegendo. E a N.S. Aparecida, pela poderosa intercessão;

A minha família, em especial minha Mãe Dione, que não hesitou em me apoiar neste projeto. Muito obrigado por tudo, Mãe!

Ao Prof. Edivaldo Ximenes pela confiança, pelo apoio, pelos ensinamentos valiosos, pela excelente orientação, pela paciência, e pela amizade;

A D. Conchita Madureira, pelo acolhimento;

Aos meus colegas de laboratório: Paula Jaramillo, Juliana Infante, Antonielle Monclaro, Leonora, Bárbara, Caio Gorgulho, Marcela, Débora, Guilherme, Beth, Gilvan. Agradeço pelos momentos divertidos, por vocês terem me acolhido tão bem, por me aturarem, e por terem me ensinado com a melhor disposição!

À Prof<sup>a</sup> Eliane Noronha, pelos ensinamentos e pelos momentos divertidos;

Ao Prof. Carlos Roberto Félix, pelos ensinamentos;

A todos os estagiários do grupo da Prof<sup>a</sup>. Eliane, pelos momentos divertidos e pelo companheirismo. Meus agradecimentos especiais à Brenda Camargo, Karen Osiro, Francilene Lopes e Pedro Hamann, pelas contribuições importantes que sempre me deram;

Agradeço especialmente a Paula Jaramillo e Francilene Lopes, pela amizade e apoio;

Agradeço especialmente à Leonora, que gentilmente revisou meu trabalho;

Agradeço ao Guilherme pelo apoio, paciência e momentos divertidos. Ao final disso tudo, Guilherme, uma conclusão: *Vida de Negro é difícil, é difícil como o que?*

Às técnicas Marisia e Margarete pelo apoio e pelos momentos hilários;

Ao Adelson, pela parceria, confiança e companheirismo. Ao Nicholas pelo valioso apoio. À Anne Dias, pela boa vontade em nos ensinar a tripsinizar as amostras do BN-PAGE. Ao Prof. Carlos André O. Ricart (Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas/IB/UnB) pelos ensinamentos e pela confiança.

À Prof. Pérola Magalhães e ao Prof. Maurício Homem de Melo, da Faculdade de Farmácia, pela confiança e pelos ensinamentos;

Aos membros da banca examinadora, por terem prontamente aceitado o convite;

Às Secretárias Ana e Luciana, pelo bom atendimento;

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana;

## **Apoio Financeiro**

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro da CAPES ,por meio de concessão de bolsa de estudos. E pelos projetos de pesquisa: Rede Sisbiota (CNPq/563260/2010-6), Rede Centro Oeste (CNPq/563823/2010-0 e FAPDF/193.000.470/2011) Universal (CNPq/470265/2011-6), Pronex (FAPDF/193000584/2009) e INCT do Bioetanol/CNPq.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Estrutura e Composição da Parede Celular.....	2
2.1.1 Celulose .....	3
2.1.2 Hemicelulose.....	4
2.1.3 Pectina .....	6
2.1.4 Lignina.....	8
2.2 Holocelulases.....	9
2.2.1 Celulases .....	9
2.2.2 Hemicelulases.....	11
2.2.3 Pectinases.....	14
2.3 IMPORTÂNCIA DAS HOLOCELULASES .....	15
2.4 COMPLEXOS MULTIENZIMÁTICOS.....	17
2.5 PIOLHO-DE-ALGODÃO .....	21
2.6 <i>Penicillium fellutanum</i> .....	22
3 JUSTIFICATIVA.....	23
4 OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVO GERAL .....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1 ISOLADO .....	25
5.2 REAGENTES E COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	25
5.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM DIVERSAS FONTES DE CARBONO.....	25
5.4 PROSPECÇÃO POR COMPLEXOS ENZIMÁTICOS.....	27
5.5 CURVA DE INDUÇÃO ENZIMÁTICA .....	28
5.6 FRACIONAMENTO E CONCENTRAÇÃO DA ATIVIDADE DE MANANASE ....	28
5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E PH .....	29
5.8 TERMOESTABILIDADE.....	29
5.9 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA MANANASE .....	29
5.10 CARACTERIZAÇÃO DAS MANANASES SEMI-PURIFICADAS.....	30
5.11 EFEITO DE ÍONS.....	30

5.12 EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	30
5.13 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.....	31
5.14 ELETROFORESE E ZIMOGRAMA .....	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
6.1 PERFIL DE HOLOCELULASES SECRETADAS EM DIVERSAS FONTES DE CARBONO.....	31
6.2 PROSPECÇÃO POR COMPLEXOS ENZIMÁTICOS.....	38
6.3 PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DAS MANANASES .....	39
7 CONCLUSÕES.....	52
8 PERSPECTIVAS .....	53
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da parede celular vegetal. Extraído e adaptado de SIQUEIRA & FERREIRA FILHO ( 2010).....03
- Figura 2.** Estrutura das principais hemiceluloses. Extraído e adaptado de SCHELLER & ULVSKOV (2010).....05
- Figura 3.** Estrutura da homogalacturonana .....07
- Figura 4.** Interação entre os resíduos ácidos da homogalacturonana e íons de Cálcio, segundo o modelo de “caixa de ovos”.....07
- Figura 5.** Esquema das pontes de borato estabelecidas entre os resíduos de apiosil de cadeias diferentes de ramnogalacturonana II.....08
- Figura 6.** Hidroxicinamatos constituintes da lignina: coniferil (1), sinapil (2) e coumaril (3) .....09
- Figura 7.** Enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da celulose. BGL:  $\beta$ -glicosidase ; CBH: celobiohidrolase (exoglicanase) ; EGL:  $\beta$ -1,4 endoglicanase. Extraído de VAN DEN BRINCK & DE VRIES, 2011.....10
- Figura 8.** Enzimas envolvidas na degradação da xilana. 1: endoxilanase ; 2:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ; 3:  $\alpha$ -glicuronidase ; 4: feruloil e cumaroil-esterases ; 5: acetil-xilana esterase. Extraído de CHÁVEZ *et al.* (2006).....13
- Figura 9.** Enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da manana. Extraído e adaptado de SHALLOM & SHOHAM (2003).....14
- Figura 10.** Enzimas pectinolíticas. PMGL: polimetilgalacturonato liase ; PMG: polimetilgalacturonase . PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase) ; PGL: poligalacturonato liase ; PG: poligalacturonase. Extraído de SHARMA *et al.* (2012).....15
- Figura 11.** Esquema de funcionamento de um gel bidimensional BN/SDS-PAGE. A. Primeira dimensão, em que os complexos proteicos são solubilizados e separados em condições nativas. B. Segunda dimensão, onde inicialmente a tira de gel extraída do gel de primeira dimensão e que contém os complexos separados é tratada em condições desnaturantes, e os constituintes dos complexos podem ser separados de maneira similar a um SDS-PAGE convencional. (Extraído de Eubel *et al.*, 2005).....20
- Figura 12.** Determinação das atividades de mananase (a), xilanase (b), pectinase (c), CMCase (d), e FPAse (e) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em diversas fontes de carbono lignocelulósicas. Cada barra representa a média obtida para uma replicata biológica, sendo apresentados os desvios-padrão correspondentes.....33

**Figura 13.** Determinação das atividades específicas de mananase (a), xilanase (b), pectinase (c), CMCase (d), e FPase (e) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em diversas fontes de carbono lignocelulósicas. Cada barra representa a média obtida para uma replicata biológica, sendo apresentados os desvios-padrão correspondentes.....34

**Figura 14.** Curva de indução para as atividades de mananase (a), xilanase (b) e pectinase (c) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em meio contendo piolho-de-algodão sujo como única fonte de carbono. São apresentadas as médias de cada replicata biológica (Frascos A, B e C), bem como os desvios-padrão representados por barras.....36

**Figura 15.** Curva de indução para as atividades específicas de mananase (a), xilanase (b) e pectinase (c) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em meio contendo piolho-de-algodão sujo como única fonte de carbono. São apresentadas as médias de cada replicata biológica (Frascos A, B e C), bem como os desvios-padrão representados por barras.....37

**Figura 16.** Gel BN-PAGE ilustrando perfil eletroforético de proteínas presentes em cultivos de *P. fellutanum*. Primeira coluna: marcador de peso molecular em KiloDaltons (KDa). São apresentadas as amostras de extratos brutos dos cultivos em casca de maracujá (a), casca do grão de soja (b), piolho-de-algodão sujo (c), engaço de bananeira (d), bagaço de cana-de-açúcar (e), casca de laranja (f) e composição de casca de soja:piolho-de-algodão sujo:casca de laranja 1:1:1 (g). Em cada poço foram aplicados 50 µg de proteína total.....38

**Figura 17.** Efeito da temperatura sobre a atividade de mananase presente no extrato bruto concentrado. As barras representam os desvios-padrão.....40

**Figura 18.** Efeito do pH sobre a atividade de mananase presente no extrato bruto concentrado. As barras representam os desvios-padrão.....41

**Figura 19.** Termoestabilidade da atividade de mananase a 40°C presente no extrato bruto concentrado. As barras representam os desvios-padrão.....41

**Figura 20.** Termoestabilidade da atividade de mananase presente no extrato bruto nas temperaturas de 50°C e 55°C. As barras representam os desvios-padrão.....42

**Figura 21.** Cromatograma do extrato bruto concentrado aplicado em coluna Sephacryl S100.....43

**Figura 22.** Eletroforese SDS-PAGE (A) e zimograma (B) das frações com atividade de mananase eluídas pela cromatografia em coluna de Sephacryl S-100. As setas em B indicam as bandas correspondentes às mananases. Além da identificação das frações, são identificados também a massa molecular (em kDa) dos marcadores moleculares utilizados (MM).....44

**Figura 23.** Cromatograma das frações com atividade de mananase obtidas a partir da coluna S100 aplicadas em coluna Q Sepharose Fast Flow (QFF)....45

**Figura 24.** Eletroforese SDS-PAGE (A) e zimograma (B) das frações semi-purificadas de mananases obtidas por cromatografia S100, bem como por cromatografia de troca iônica em coluna aniônica QFF: frações 2 (F2), 3 (F3), 16 (F16) e 17 (F17). Além da identificação das frações, são identificados também a massa molecular (em KDa) dos marcadores moleculares utilizados (MM).....46

**Figura 25.** Efeito da temperatura sobre a atividade de mananase semi-purificada. As barras representam os desvios-padrão.....47

**Figura 26.** Efeito do pH sobre a atividade de mananase semi-purificada. As barras representam os desvios-padrão.....47

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Resultados obtidos a partir da ultrafiltração do extrato bruto de *P. fellutanum* cultivado em piolho-de-algodão sujo. Os resultados de atividade e atividade específica são acompanhados dos respectivos desvios-padrão.....39

**Tabela 2.** Efeito de íons sobre a atividade de mananase semi-purificada. Os valores de atividades são apresentados juntamente com os respectivos desvios-padrão.....48

**Tabela 3.** Efeito de inibidores fenólicos sobre a atividade de mananases semi-purificadas.....49

**Tabela 4.** Especificidade ao substrato das mananases semi-purificadas. São apresentadas as atividades e os respectivos desvios-padrão.....50

## RESUMO

As holocelulases compreendem as enzimas que atuam na degradação dos polissacarídeos da parede celular vegetal, e apresentam várias aplicações em processos que empregam a biomassa vegetal como matéria-prima. Neste trabalho, *Penicillium fellutanum* foi cultivado, por 7 dias, em 6 diferentes fontes de carbono lignocelulósicas: casca de maracujá, casca do grão de soja, piolho de algodão sujo, engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar e casca de laranja. Cultivos de 15 dias nos mesmos substratos e mais uma composição de piolho de algodão, casca de soja e casca de laranja (1:1:1) foram avaliados quanto à presença de complexos pela técnica de BN-PAGE. Os extratos brutos foram pesquisados quanto às atividades de mananase, xilanase, pectinase, carboximetilcelulase (CMCase) e avicelase. O isolado de *P. fellutanum* demonstrou a capacidade de secretar holocelulases nas fontes de carbono avaliadas, e o perfil de enzimas secretadas foi influenciado pela fonte de carbono. Também foram detectados complexos putativos em todos os cultivos avaliados, sendo a presença de alguns deles específica em função do substrato lignocelulósico utilizado. O extrato bruto de cultivos de 5 dias em piolho-de-algodão sujo foram concentrados por ultrafiltração, e a atividade de mananase presente na fração concentrada foi parcialmente purificada por cromatografia de exclusão molecular (S100) e troca iônica (QFF) e caracterizada. Foram detectadas duas enzimas na fração semi-purificada, de tamanhos entre 45 e 66 kDa. As enzimas apresentaram atividade máxima a 55°C e 65°C, e em pH de 3,5. A atividade enzimática foi fortemente inibida pelos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , e ativada por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ . A atividade enzimática não foi afetada pela maioria dos compostos fenólicos empregados, e foi fortemente ativada em presença de ácido ferúlico. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram  $1,16\pm 0,21$  mg/mL e  $0,312\pm 0,015$  U.l/mL, respectivamente. Os complexos protéicos detectados serão posteriormente identificados. A atividade de mananase parcialmente purificada a partir de cultivos em piolho-de-algodão sujo demonstrou potencial para aplicação como aditivo em rações animais, em função de seu caráter ácido.

**Palavras-chave:** *Penicillium fellutanum*, resíduos lignocelulósicos, complexos protéicos, mananase.

## ABSTRACT

Holocellulases comprise a group of enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides, and they have several applications in processes employing plant biomass as feedstock. In this work, *Penicillium fellutanum* was grown during seven days in six different lignocellulosic carbon sources: passion fruit peel, soybean hull, dirty cotton gin waste, banana stalk, sugarcane bagasse and orange peel. Fifteen days cultures on the same substrates plus a composition of dirty cotton gin trash, soybean hulls and orange peel (1:1:1) were evaluated for the presence of complexes through BN-PAGE technique. Crude extracts were screened for mannanase, xylanase, pectinase, carboxymethylcellulase (CMCase) and avicelase activities. The strain of *P. fellutanum* was able to secrete holocellulases on evaluated carbon sources and the profile of secreted enzymes was influenced by the carbon source. Putative complexes were also detected in all cultures evaluated, and their presence was dependent on the lignocellulosic substrate used. Five days cultures on dirty cotton gin trash were concentrated by ultrafiltration, and mannanase activity present in the concentrated fraction was partially purified by size exclusion chromatography (Sephacryl S-100) and ion exchange (QFF) and characterized. Two enzymes of sizes between 45 and 66 kDa were detected in semi-purified fraction. The enzymes showed maximum activity at 55°C and 65°C and pH 3.5. The activity was strongly inhibited by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ , and activated by  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$ . The activity was not affected by most of the phenolic compounds employed, and interestingly was strongly activated in the presence of ferulic acid.  $K_m$  and  $V_{max}$  values were found to be  $1.16 \pm 0.21$  mg / mL and  $0.312 \pm 0.015$  IU / mL, respectively. The protein complexes detected will be subsequently identified. Partially purified mannanase activity from cotton gin waste crude extracts demonstrated potential for application as additive in animal feed, due to its acidic character.

**Keywords:** *Penicillium fellutanum*, lignocellulosic residues, proteic complexes, mannanase.

## 1. INTRODUÇÃO

A capacidade dos vegetais em armazenar a energia obtida do Sol na forma de ligações químicas é de extrema importância para a existência das formas de vida na biosfera. Grande parte dessa energia é alocada para a síntese de polissacarídeos estruturais da parede celular e, portanto, a biomassa vegetal constitui uma grande fonte de energia renovável, embora a tecnologia para a sua utilização ainda não esteja bem estabelecida.

A biomassa vegetal apresenta potencial como matéria-prima para vários processos industriais. Daí surge o conceito de biorrefinaria, que pode ser definida como “uma instalação que integra equipamentos e processos de conversão de biomassa para a produção de combustíveis, energia e químicos a partir de biomassa. O conceito de biorrefinaria é análogo ao conceito atual de uma refinaria de petróleo, que produz vários combustíveis e produtos a partir do petróleo.” (NREL, 2009).

A parede celular vegetal é composta, principalmente, pela holocelulose e lignina. A holocelulose compreende todos os polissacarídeos, ou seja, celulose, hemicelulose e pectina (ZHANG *et al.*, 2006). Todos os componentes da parede celular podem ser aproveitados para a geração de uma ampla gama de produtos de interesse (SANNIGRAHI *et al.*, 2010; KAMM *et al.*, 2006; ALONSO *et al.*, 2013; OLCAY *et al.*, 2013 ; AZADI *et al.*, 2013). Em praticamente todos os processos a biomassa deve ser reduzida aos seus monômeros constituintes, que são utilizados como substrato para a obtenção de produtos de interesse. É o que acontece, por exemplo, em processos fermentativos, onde os micro-organismos fermentam os açúcares derivados da degradação da biomassa e geram os produtos de interesse, como etanol, solventes, biomassa, dentre muitos outros.

A hidrólise da biomassa pode ser alcançada a partir de métodos físico-químicos ou enzimáticos (SARKAR *et al.*, 2012). Um dos métodos mais comumente utilizados é a hidrólise ácida, realizada a temperaturas elevadas. Apesar da eficiência, este método ocasiona a geração de grande quantidade de poluentes, além de inibidores de crescimento microbiano, como os furfurais. Em contraponto, a hidrólise enzimática apresenta-se mais vantajosa, pois a

especificidade das enzimas permite a formação quase que exclusiva de açúcares, além da catálise requerer condições mais amenas. Entretanto, o custo de produção dos coquetéis enzimáticos aplicáveis à degradação de biomassa ainda apresentam elevado custo, e muitas vezes demonstram pouca eficiência de hidrólise.

A utilização de resíduos lignocelulósicos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas secretadas por fungos filamentosos tem sido uma alternativa proposta no intuito de se obter coquetéis enzimáticos mais baratos (SIQUEIRA *et al.*, 2010 ; SIQUEIRA & FERREIRA FILHO 2010). Estes resíduos compreendem os restos gerados pela atividade agrícola e ainda são subutilizados, e sua deposição representa um sério problema ambiental.

O fungo *Penicillium fellutanum* encontra-se largamente distribuído no meio ambiente, tendo sido relatado como habitante do trato intestinal de peixes marinhos, bem como associado a insetos e com potencial de biocontrole entomológico. Também são relatados metabólitos secundários de importância produzidos por essa espécie, bem como algumas micotoxinas. Entretanto, o potencial de produção de enzimas holocelulolíticas em cultivos com fontes de carbono complexas ainda é pouco abordado.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

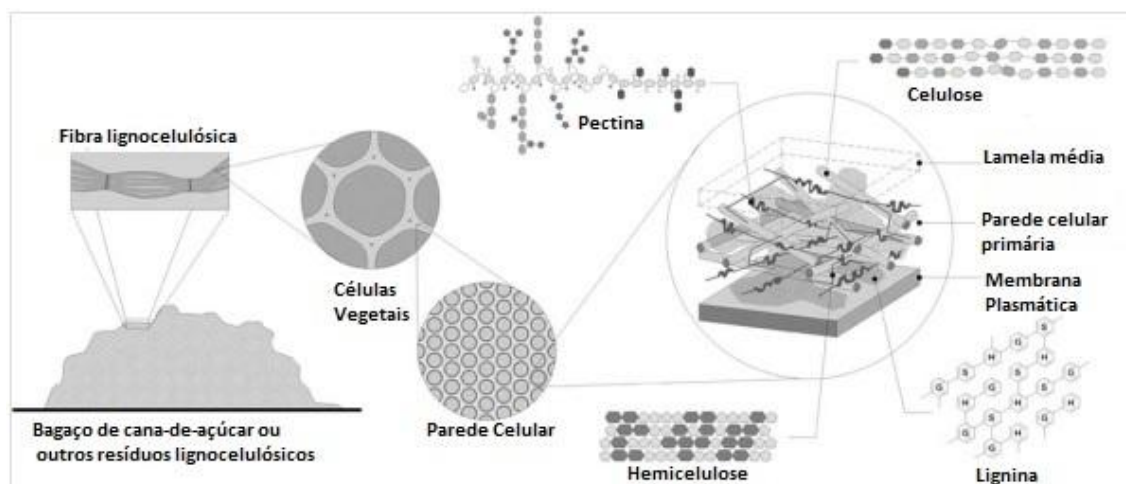
### **2.1 Estrutura e Composição da Parede Celular**

A parede celular consiste em uma estrutura rígida e organizada, responsável por conferir resistência e proteção à célula vegetal (LAGAERT *et al.*, 2009) . É constituída, principalmente, por celulose, hemiceluloses, pectinas e lignina, sendo que o tipo e a proporção de cada um desses componentes são variáveis em função da espécie vegetal considerada.

Os polímeros constituintes da parede encontram-se associados por diversos tipos de interações, como pontes salinas, ligações de hidrogênio, ligações covalentes, forças de Van der Waals, dentre outras. Estas interações são de extrema importância para a manutenção da estrutura da parede celular (SOMERVILLE *et al.*, 2004 ; ZYKWINSKA *et al.*, 2005 ; ZYKWINSKA *et al.*,



2007 ; ISHII & MATSUNAGA, 2001). A estrutura da parede celular, de uma forma geral, é esquematizada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura da parede celular vegetal. Extraído e adaptado de SIQUEIRA & FERREIRA FILHO (2010).

### 2.1.1 Celulose

A celulose é um polímero constituído por unidades de glicose unidas entre si por ligações do tipo  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4.

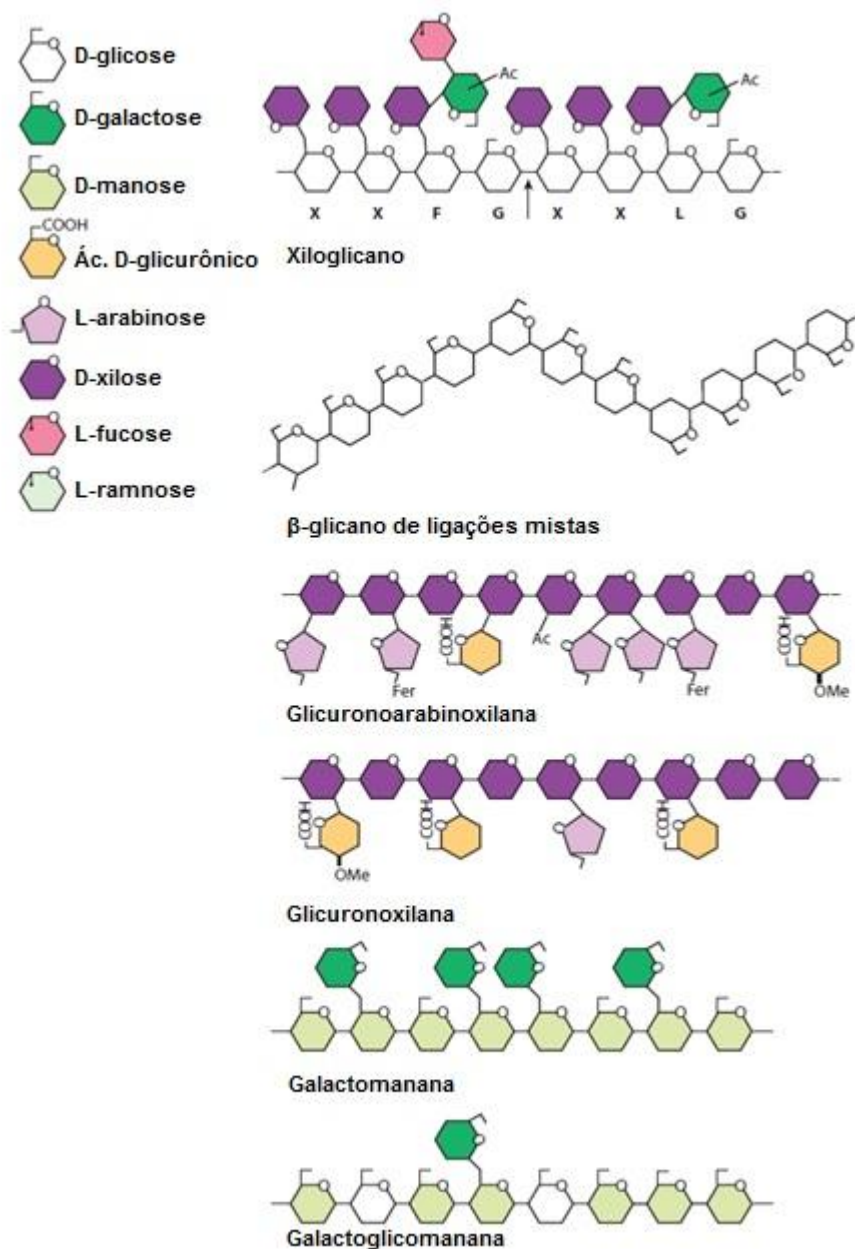
Na parede celular vegetal, a celulose é organizada na forma de microfibrilas, que correspondem à associação lateral de cadeias glicosídicas através de ligações de hidrogênio, ocasionando a formação de uma estrutura cristalina contínua e estável (NISHIYAMA, 2009 ; NISHIYAMA *et al.*, 2002). Além de conferir a rigidez característica da celulose, este tipo de organização contribui para a recalcitrância desse material. Isso decorre do alto grau de organização das moléculas de água na superfície da microfibrila cristalina, o que dificulta a difusão de substâncias (MATTHEWS *et al.*, 2006). Entretanto, em algumas porções dessa estrutura são encontradas falhas, nas quais as cadeias de glicose estão mais fracamente associadas, permitindo uma exposição maior da estrutura celulósica (NISHIYAMA, 2009). Essas regiões caracterizam a porção amorfa do polímero, e apresentam uma maior reatividade quando comparada com a estrutura cristalina (MAZEAU & HEUX, 2003).

### 2.1.2 Hemicelulose

Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta-se mais diversa constitutiva e estruturalmente. Essa fração representa cerca de 20-35% da lignocelulose, e é composta por resíduos de pentoses, hexoses, bem como resíduos de açúcares ácidos (SAHA, 2003). A cadeia principal das hemiceluloses é composta por açúcares unidos por ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ , com uma configuração equatorial (SCHELLER & ULVSKOV, 2010). A estrutura das principais hemiceluloses é esquematizada na Figura 2.

Os xiloglucanos correspondem a polímeros de resíduos de glicose associadas por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ , no qual alguns resíduos apresentam como ramificações resíduos de D-xilose que se ligam por ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Estas ramificações de xilose ainda podem se associar pelo átomo de oxigênio O-2, a resíduos de D-Galactose ou L-Fucose. Os xiloglucanos, assim como as xilanas, apresentam-se mais solúveis quando mais ramificados, e quando menos ramificados podem se ligar a celulose por ligações de hidrogênio, contribuindo para a manutenção da estrutura da parede celular, e ao mesmo tempo, impedindo a associação entre as microfibrilas de celulose (SCHELLER & ULVSKOV, 2010 ; ISHII & SHIMIZU, 2001).

As xilanas correspondem a um grupo de polissacarídeos, que apresentam em comum o esqueleto da cadeia principal composto por unidades de D-xilose unidas por ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . Resíduos de xilose podem se associar a moléculas de glicuronosil ou 4-O-metilglicurosonil através dos O-2 ou O-3, constituindo as glicuronoxilanas, principais hemiceluloses presentes nas paredes celulares secundárias da madeira de angiospermas – *hardwood* (WILLFOR *et al.*, 2005a). As arabinoxilanas e glicuroarabinoxilanas apresentam resíduos de arabinose associados lateralmente à cadeia principal de xilana. Estes polímeros correspondem às hemiceluloses majoritárias das paredes celulares de dicotiledôneas. Resíduos de ácido ferúlico e ácido p-cumárico podem estar esterificados ao O-5 das arabinoses. Estes compostos fenólicos podem se condensar em dímeros, permitindo a ligação da xilana com outros componentes hemicelulósicos, pectina e lignina. Estas pontes são de extrema



**Figura 2.** Estrutura das principais hemiceluloses. Extraído e adaptado de SCHELLER & ULVSKOV (2010).

importância para a manutenção da estrutura da parede celular vegetal, e são fatores que contribuem para a recalcitrância da lignocelulose. Resíduos de xilose podem também se apresentar esterificados a radicais acetila a partir do O-3 (SCHELLER & ULVSKOV, 2010 ; ISHII & SHIMIZU, 2001).

As mananas são hemiceluloses cuja cadeia principal é constituída por unidades de manose unidas entre si por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ , sendo que algumas dessas unidades podem estar associadas lateralmente a resíduos de D-galactose, originando as galactomananas. A cadeia principal pode ser

constituída por unidades de glicose e manose sem um padrão de repetição, originando as glicomananas e galactoglicomananas (SCHELLER & ULVSKOV, 2010). As glicomananas são os principais componentes hemicelulósicos da madeira de gimnospermas - *softwood* (WILLFOR *et al.*, 2005b). As mananas são constituintes das gomas, que são utilizadas como espessantes em vários alimentos e cosméticos. Também constituem reservas das sementes de muitas espécies vegetais (JINDAL *et al.*, 2013 ; MOREIRA & FERREIRA FILHO, 2008)

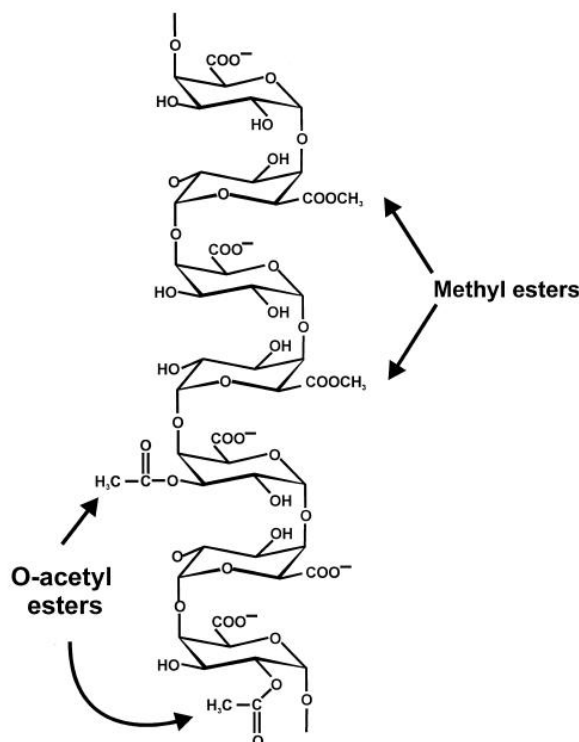
Os glicanos de ligações mistas apresentam uma cadeia principal constituída por resíduos de glicose, mas nessa estrutura as ligações que unem esses resíduos são as ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow3)$ . De forma geral, não há um padrão definido para a distribuição dessas ligações, mas alguns blocos de glicose unidos por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  apresentam-se truncados por ligações  $\beta(1\rightarrow3)$ . Estes polissacarídeos peculiares são típicos de gramíneas (ordem Poales), e sua presença está associada à fase de crescimento celular vegetal (SCHELLER & ULVSKOV, 2010).

### 2.1.3 Pectina

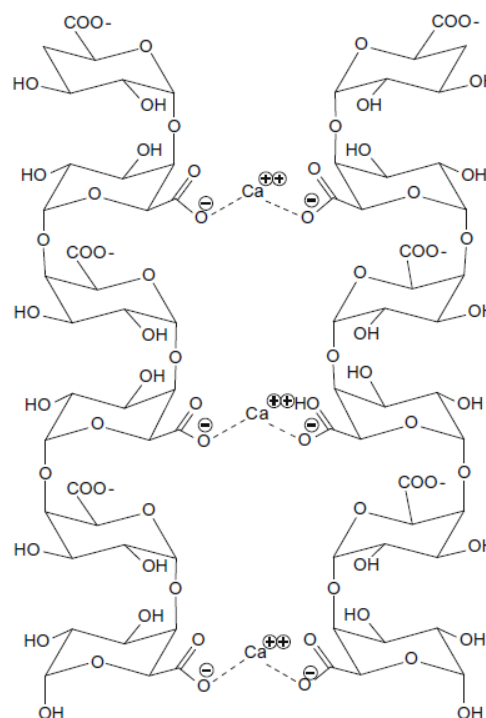
As pectinas são polissacarídeos presentes principalmente nas paredes celulares primárias e lamelas médias. O principal monossacarídeo constituinte desses polímeros é o ácido galacturônico (ISHII & SHIMIZU, 2001). Com base em características estruturais, as pectinas são classificadas em homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II.

A homogalacturonana consiste em uma cadeia formada por moléculas de ácido  $\alpha$ -D-galactopiranosilurônico unidas entre si por ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Alguns dos resíduos galacturonosil apresentam seus resíduos ácidos metil-esterificados, bem como O-acetilações nos carbonos C-2 e/ou C-3, conforme ilustrado na figura 3 (RIDLEY *et al.*, 2001). Tais substituições variam com a espécie vegetal, assim como com o estágio de desenvolvimento das células. Os resíduos ácidos não esterificados interagem com íons  $\text{Ca}^{2+}$ , o que permite a formação de um gel em decorrência da associação de várias cadeias de homogalacturonana, um modelo conhecido como caixa de ovos (Figura 4). Além dessa interação, as homogalacturonanas podem se associar às ramnogalacturonanas II e xiloglucanos por ligações covalentes, contribuindo

para a manutenção da estrutura da parede celular (CAFFALL & MOHNEN, 2009).



**Figura 3.** Estrutura da homogalacturonana. Extraído de RIDLEY *et al.* (2001).

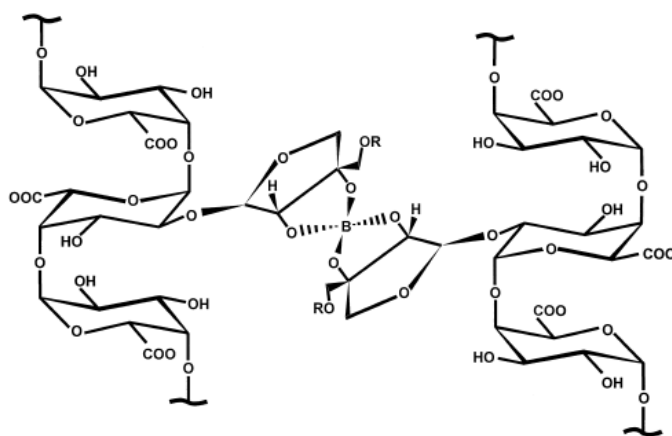


**Figura 4.** Interação entre os resíduos ácidos da homogalacturonana e íons de Cálcio, segundo o modelo de "caixa de ovos". Extraído de CAFFALL & MOHNEN (2009).

Cadeias de galacturonanas podem apresentar substituições laterais, como é o caso das xilogalacturonanas, que apresentam resíduos  $\beta$ -D-xilosil associados ao carbono C-3 das moléculas de ácido galacturônico da cadeia principal. No mesmo grupo se encontram as apiogalacturonanas, que apresentam resíduos de  $\beta$ -D-apiofuranose ou dissacarídeo desse açúcar ligados ao carbono C-2 ou C-3 do ácido galacturônico. Esse último polímero é encontrado principalmente em algumas espécies vegetais aquáticas (RIDLEY *et al.*, 2001).

A cadeia principal das ramnogalacturonanas I consiste de repetições do dissacarídeo [ $\rightarrow\alpha$ -D-GalpA-1,2- $\alpha$ -L-Rhap-1,4 $\rightarrow$ ]. Os resíduos de ácido galacturônico podem estar O-acetilados nos carbonos C-2 e/ou C-3, e cerca de 20 a 80% dos resíduos de ramnose apresentam substituições compostas principalmente por resíduos de arabinose e galactose, podendo se apresentar como unidades simples ou pequenas cadeias ramificadas (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

Da mesma forma que as xilo e apiogalacturonanas, as ramnogalacturonanas II são consideradas galacturonanas substituídas. As substituições laterais desses polímeros são complexas, mas definidas. As cadeias laterais A e B são compostas por, respectivamente, oito e nove unidades de açúcar, e se associam ao carbono C-2 de alguns resíduos de ácido galacturônico da cadeia principal. As cadeias laterais C e D, por sua vez, se associam ao carbono C-3 do ácido galacturônico. Da mesma forma como ocorre com as homogalacturonanas, as ramnogalacturonanas II podem se associar entre si e constituir géis a partir de pontes de borato (Figura 5) estabelecidas entre as hidroxilas OH-2 e OH-3 dos resíduos apiosil de cadeias distintas. (RIDLEY *et al.*, 2001).



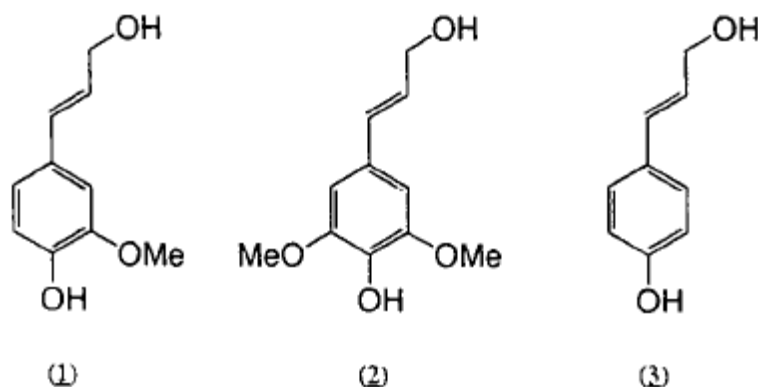
**Figura 5.** Esquema das pontes de borato estabelecidas entre os resíduos de apiosil de cadeias diferentes de ramnogalacturonana II. Extraído de RIDLEY *et al.* (2001).

### 2.1.4 Lignina

A lignina corresponde ao segundo complexo mais abundante da natureza. Este complexo fenólico está presente nas paredes celulares secundárias de algumas células, aumentando a impermeabilidade e resistência dos tecidos vegetais. Além do mais, a lignina atua na proteção contra ataques de patógenos (BOERJAN *et al.*, 2003).

A lignina é um complexo composto por moléculas aromáticas. As principais unidades constituintes são o guaiacil, siringil e o p-hidroxifenil, derivados, respectivamente, dos alcoóis hidroxicinâmicos coniferil, sinapil e p-coumaril (Figura 6). As proporções dessas unidades variam entre as espécies vegetais, sendo que a lignina das *softwood* contém principalmente resíduos de

guaiacil, a lignina das *hardwood*, por sua vez, apresenta-se constituída principalmente por resíduos de guaiacil e siringil, e a lignina das gramíneas apresenta uma contribuição mais uniforme dos três resíduos (SAKAKIBARA & SANO, 2001 ; BOERJAN *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Hidroxicinamatos constituintes da lignina: coniferil (1), sinapil (2) e p-coumaril (3). Extraído de SAKAKIBARA & SANO, 2001.

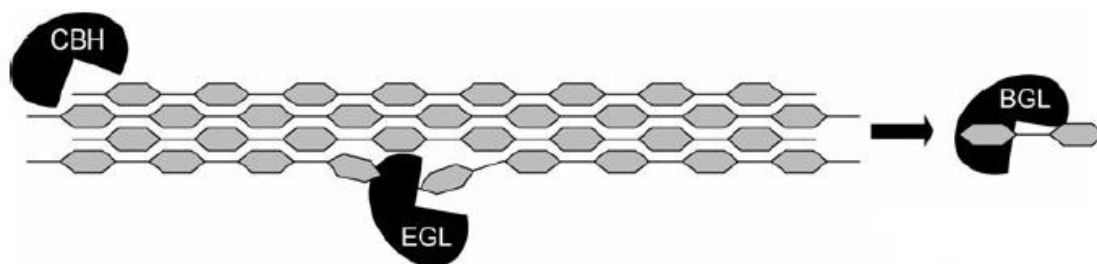
## 2.2 Holocelulases

### 2.2.1 Celulases

Dada a complexidade e recalcitrância da estrutura cristalina da celulose, a desconstrução desse polímero requer a ação coordenada de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

A hidrólise enzimática é catalisada por três principais grupos de enzimas: endoglicanases (EC 3.2.1.4); exoglicanases, também denominadas celobiohidrolases (EC 3.2.1.91); e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglicanases clivam as ligações do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  localizadas nas porções amorfas internas da cadeia de celulose, ao passo que as exoglicanases efetuam a clivagem dessas ligações a partir das extremidades do polímero, podendo atuar sobre as terminações redutoras ou não-redutoras das cadeias glicosídicas. As endoglicanases liberam celooligômeros de diversos graus de polimerização, ao passo que as exoglicanases liberam predominantemente glicose ou celobiose. Celobiose e celooligômeros são hidrolisados a glicose

pelas  $\beta$ -glicosidasases completando, assim, a degradação da celulose (LYND *et al.*, 2002). As enzimas celulolíticas são apresentadas na Figura 7.



**Figura 7.** Enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da celulose. BGL:  $\beta$ -glicosidase ; CBH: celobiohidrolase (exoglicanase) ; EGL:  $\beta$ -1,4 endoglicanase. Extraído de VAN DEN BRINCK & DE VRIES, 2011.

A ação dessas enzimas hidrolíticas é dita sinérgica, ou seja, a atividade observada quando as enzimas atuam conjuntamente no substrato é maior que o somatório das atividades das enzimas quando consideradas separadamente. Dessa forma, a ação das endoglicanases expõe as extremidades de cadeias glicosídicas, ampliando a disponibilidade de sítios para atuação das exoglicanases. Estas últimas aumentam, por sua vez, o número de moléculas de celobiose e celooligossacarídeos disponível para ataque pelas  $\beta$ -glicosidasases. Além do mais, as  $\beta$ -glicosidasases atuam sinergicamente com as glicanases ao promover a hidrólise da celobiose e dos celooligômeros, que são, muitas vezes, inibidores destas enzimas.

As endo e exoglicanase atuam sobre um substrato insolúvel. Dessa forma, muitas dessas enzimas são modulares, constituídas por um módulo catalítico, e um outro domínio que favorece a ligação ao substrato (CBM – *Carbohydrate Binding Module*). Tais domínios tem por função principal a concentração das moléculas de enzima na superfície do substrato, bem como permitir a ligação do catalisador especificamente ao seu substrato. Apesar de não possuírem atividade catalítica, os CBMs promovem tensões na estrutura da celulose, permitindo a maior exposição de cadeias de glicose ao ataque enzimático (ARANTES & SADDLER, 2010).

A degradação da celulose não é um fenômeno restrito apenas a ação de hidrolases. Outras enzimas participam do processo, catalisando reações de oxirredução. É o caso, por exemplo, das celobiose-desidrogenases. Essas enzimas são constituídas por dois domínios, um deles contendo flavina e o



outro um grupamento heme, um arranjo estrutural único entre proteínas secretadas (HENRIKSSON & JOHANSSON, 2000). A reação catalisada por essa enzima envolve a oxidação do Carbono C1 do açúcar em uma molécula de celobiose, com a formação de ácido celobiônico, e a remoção de dois elétrons. Essa etapa oxidativa ocorre na subunidade contendo flavina, e os elétrons são então transferidos para o grupamento heme, e podem ser utilizados na redução de diversos compostos. O papel biológico das celobiose-desidrogenases ainda não é muito bem compreendido. Uma das hipóteses atribui à redução de compostos orgânicos com a formação de radicais hidroxil, que atacariam as moléculas de celulose às quais as enzimas estivessem ligadas, contribuindo para a desestabilização da estrutura do polímero (ZAMOCKY *et al.*, 2006).

Até recentemente, as glicosil-hidrolases da família 61 (GH61) eram consideradas proteínas desprovidas de atividade hidrolíticas, mas presentes no conjunto protéico secretado por fungos lignocelulolíticos. Entretanto, estudos demonstraram que tais enzimas, na verdade, são monooxigenases cobre-dependentes, envolvidas na degradação da porção cristalina da celulose a partir de reações envolvendo oxigênio molecular e um doador de elétrons (HORN *et al.*, 2012). Essas enzimas apresentam, portanto, grande potencial de aplicação na degradação de biomassa, uma vez que poderiam permitir um maior acesso de glucanases às cadeias glicosídicas da porção cristalina da celulose. PHILLIPS *et al.* (2011) verificaram que a enzima GH61 cobre-dependente pode receber elétrons fornecidos pela celobiose-desidrogenase, evidenciando que essas duas enzimas atuam conjuntamente na degradação da celulose.

### **2.2.2 Hemicelulases**

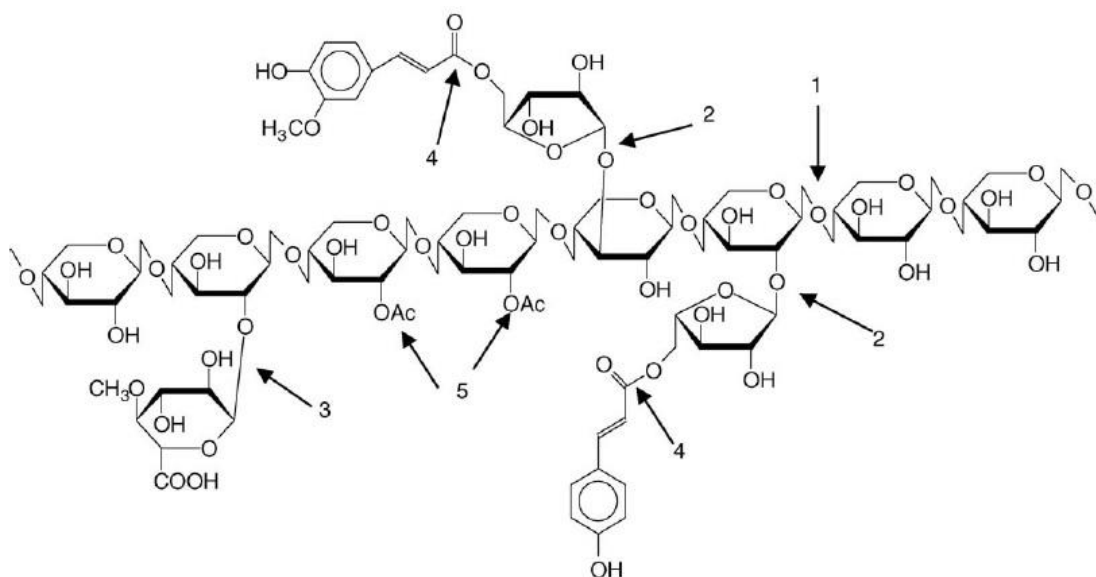
A hemicelulose apresenta uma maior diversidade de constituintes e ligações em relação à celulose, característica essa que reflete no arsenal enzimático necessário para a completa degradação desta fração da biomassa lignocelulósica. Uma vez que a hemicelulose encontra-se disposta de tal forma que reveste as microfibrilas de celulose, a ação das hemicelulases é de

extrema importância para garantir o acesso das celulases ao seu substrato (GOTTSCHALK *et al.*, 2010 ; HU *et al.*, 2011).

A existência de cadeias laterais constitui, na maioria das vezes, um impedimento estérico para a ação de enzimas cujo substrato é a cadeia principal. Portanto, a remoção de tais substituintes é uma etapa importante para garantir a hidrólise eficiente da hemicelulose, fato este que é bem observado em estudos que avaliam o sinergismo entre enzimas que atuam nas cadeias laterais, e as enzimas que atuam nas cadeias principais (SELIG *et al.*, 2009).

A degradação da xilana exige a ação coordenada e sinérgica de glicosil-hidrolases e esterases. As endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (E.C 3.2.1.8) atuam sobre as ligações existentes na porção interna da cadeia principal da xilana. O produto de hidrólise liberado por tais enzimas consiste, principalmente, de xilooligômeros. As  $\beta$ -xilosidases (E.C. 3.2.1.37) atuam sobre estes xilooligômeros, degradando-os à xilose. Já as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidades (E.C. 3.2.1.55) e  $\alpha$ -D-glicuronidasas (E.C 3.2.1.139) correspondem às enzimas que atuam sobre as cadeias laterais da xilana, removendo os resíduos de arabinose e ácido glucurônico/ácido metilglucurônico, respectivamente. Ainda no grupo das enzimas que promovem a desramificação da xilana, incluem-se as enzimas que atuam sobre ligações éster pelas quais se ligam resíduos acetil (acetil-xilana esterases – E.C 3.1.1.72) e compostos fenólicos associados a resíduos de arabinose (feruloil-esterase – 3.1.1.73, e cumaril-esterases –3.1.1-) (CHÁVEZ *et al.*, 2006). As enzimas xilanolíticas são esquematizadas na Figura 8.

Como descrito anteriormente, as interações sinérgicas são determinantes para a desconstrução eficiente da xilana. As  $\alpha$ -D-glicuronidasas e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidades atuam sobre resíduos situados na porção terminal não-redutora de xilooligômeros, e portanto, dependem da ação das acetil-xilana esterases e endoxilanasas. Estas últimas enzimas, por sua vez, liberam os oligossacarídeos, aumentando a disponibilidade de substrato para as  $\beta$ -xilosidases. Levando-se em conta estas características, DODD & CAN (2009) propuseram um modelo de ação enzimática cooperativa e sequencial, visando à degradação da xilana. Segundo tal modelo, o ataque inicial ao polímero

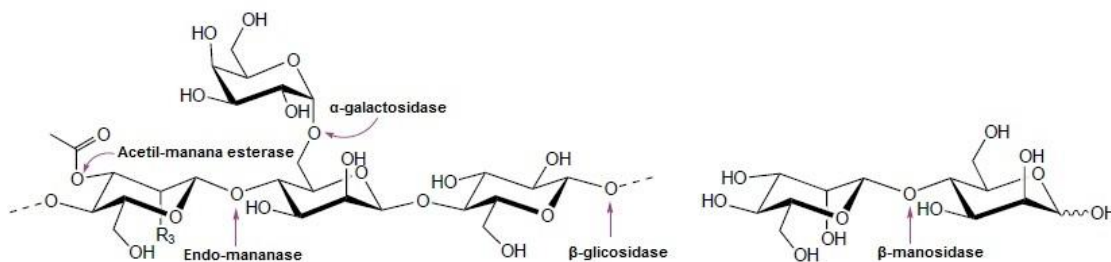


**Figura 8.** Enzimas envolvidas na degradação da xilana. 1: endoxilanase ; 2:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ; 3:  $\alpha$ -glicuronidase ; 4: feruloil e cumaroil-esterases ; 5: acetil-xilana esterase. Extraído de CHÁVEZ *et al.* (2006).

ficaria a cargo das endoxilanases, acetil-xilana esterases e feruloil/cumaroil-esterases. Como consequência, os resíduos acetil, responsáveis pelo impedimento estérico a várias enzimas xilanolíticas, seriam removidos, bem como as pontes de ácido ferúlico e ácido cumárico seriam rompidas, aumentando a degradabilidade do material ao reduzir sua complexidade. Os xilooligômeros substituídos liberados seriam, portanto, substratos para a ação das  $\alpha$ -D-glicuronidas e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidas. Após a remoção das cadeias laterais, os xilooligômeros lineares seriam convertidos à xilose pelas  $\beta$ -xilosidas, concluindo assim o processo de degradação da xilana.

A degradação enzimática da manana ocorre de forma similar à da xilana. As  $\beta$ -mananases (E.C 3.2.1.78) atuam na hidrólise das ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  internas da cadeia principal, liberando manooligômeros. Estes são substratos para a ação das  $\beta$ -manosidas, que atuam na remoção de resíduos de manose a partir da extremidade não-redutora. A remoção de resíduos de glicose a partir da extremidade não-redutora de oligossacarídeos liberados durante a digestão das glucomananas/galactoglucomananas é catalisada por  $\beta$ -glicosidas. As  $\alpha$ -galactosidas (E.C 3.2.1.22) e acetil-manana esterases (E. C 3.1.1.6) atuam na remoção dos substituintes laterais, e atuam em sinergismo com as enzimas que atuam sobre a cadeia principal (SHALLOM & SHOHAM, 2003 ; MOREIRA & FILHO, 2008 ; VAN ZYL *et al.*, 2010). As

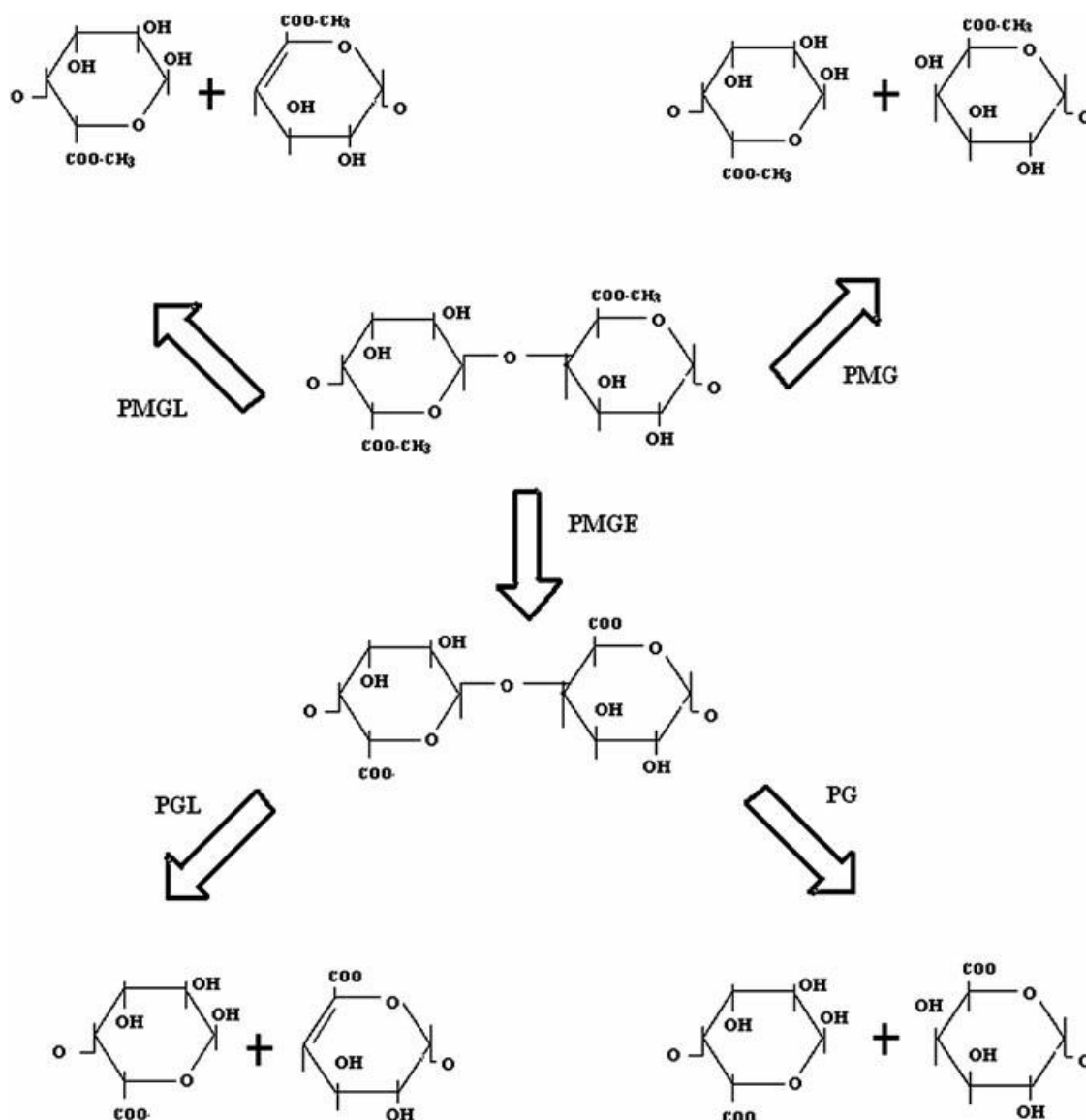
enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da manana são apresentadas na Figura 9.



**Figura 9.** Enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da manana. Extraído e adaptado de SHALLOM & SHOHAM (2003).

### 2.2.3 Pectinases

A quebra das ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre os resíduos de ácido galacturônico pode ocorrer a partir de dois mecanismos: hidrólise e/ou trans-eliminação. A hidrólise de tais ligações é catalisada pelas endo-poligalacturonases (E.C 3.2.1.15) e exo-poligalacturonases (E.C 3.2.1.67), quando atuam nas porções internas da cadeia e a partir da extremidade não-redutora, respectivamente. Quando o substrato em questão é o ácido poli-metilgalacturônico, a hidrólise é catalisada pelas endo-polimetilgalacturonases e exo-polimetilgalacturonases. As liases compreendem o grupo de enzimas responsáveis pela clivagem da cadeia de ácido galacturônico a partir de reações de trans-eliminação. Como produto da ação dessas enzimas tem-se ácido galacturônico, bem como um galacturonato contendo uma insaturação entre os carbonos C4 e C5. As liases incluem: endo-poligalacturonato liase (E.C 4.2.2.2), exo-poligalacturonato liase (E.C 4.2.2.9), endo-polimetilgalacturonato liase (E.C 4.2.2.10), e exo-polimetilgalacturonato liase (JAYANI *et al.*, 2005 ; KASHYAP *et al.*, 2001). Seguindo a mesma lógica do grupo de enzimas que atuam sobre a cadeia de ácido galacturônico, destaca-se, também, degradação enzimática das ligações entre resíduos de ramnose e ácido galacturônico nas cadeias de ramnogalacturonano I através de reações hidrolíticas (endo e exoramnogalacturonase) ou de trans-eliminação (ramnogalacturonano liases). (VAN DEN BRINK & DE VRIES, 2011). A figura 10 ilustra a ação das enzimas pectinolíticas.



**Figura 10.** Enzimas pectinolíticas. PMGL: polimetilgalacturonato liase ; PMG: polimetilgalacturonase . PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase) ; PGL: poligalacturonato liase ; PG: poligalacturonase. Extraído de SHARMA *et al.* (2012).

### 2.3 IMPORTÂNCIA DAS HOLOCELULASES

O beneficiamento da biomassa vegetal é a base de diversas atividades econômicas. Na maioria das vezes, a utilização das enzimas é preferível pela capacidade destas proteínas de catalisar reações químicas de forma eficiente, e em condições amenas.

As holocelulases, principalmente pectinases, apresentam grande importância no processo de produção de sucos, polpas e purês de frutas. A degradação da pectina previne a formação de géis, bem como permite a redução da viscosidade do produto, o que facilita outras etapas do processo,

como filtração e o transporte pela linha de produção. O tratamento com pectinases reduz, também, a quantidade de sólidos em suspensão, evitando a sedimentação de partículas que comumente comprometem o aspecto visual de sucos. Além do mais, a aplicação de pectinases e outras holocelulases ao processo de maceração de frutas, como maçãs e peras, permite o enfraquecimento da estrutura da parede celular, favorecendo a maior extração de suco (RIBEIRO *et al.*, 2010 ; KASHYAP *et al.*, 2001).

O biopolimento (*biopolishing*) consiste na aplicação de celulases para a remoção de pilosidade na superfície de tecidos de algodão. A remoção destas pequenas fibras melhora a aparência do produto, bem como evita a formação de pelotamento. As celulases são também utilizadas para a obtenção do efeito de desbotamento em tecidos a base de algodão, como é o caso do denim, a partir do qual são confeccionadas peças em jeans. As celulases atuam na remoção superficial das fibras de algodão tingidas de azul, expondo as fibras brancas, e conferindo o efeito de envelhecimento desejado. O processo era anteriormente feito a partir do uso de pedra pomes (stone-washing), mas o desbotamento enzimático apresenta-se menos agressivo ao ambiente, bem como mais viável em termos de processo, uma vez que as pedras pomes ocasionam danos ao maquinário. O algodão é composto principalmente por celulose, mas apresenta também impurezas compostas, principalmente, por pectinas, ceras, proteínas e corantes. A remoção destes contaminantes é fundamental para o aumento da umectabilidade das fibras, bem como a tornar o tecido mais receptivo aos tratamentos de acabamento final. Este processo é denominado purga. A purga convencional é realizada a partir da lavagem do material com hidróxido de sódio em altas temperaturas. Entretanto, tal processo gera poluentes, além de consumir grande quantidade de água. A purga enzimática, ou biopurga, tem sido uma alternativa. Nesse processo, a ação principalmente de pectinases e lipases resultou em uma efetividade de limpeza similar a purga convencional (ANDREAUS & CAVACO-PAULO, 2008).

O branqueamento da polpa de celulose é um processo de extrema importância para a obtenção de papel e derivados de qualidade, mas gera quantidades consideráveis de poluentes. O objetivo desta etapa é a remoção de lignina residual e outros contaminantes da polpa. O processo tradicional é realizado com a utilização de gás cloro e dióxido de cloro. Entretanto, nesse

processo são geradas substâncias potencialmente poluentes e prejudiciais à saúde humana, como os organoclorados. O processo foi substituído por compostos oxigenados, entretanto a eficiência no branqueamento não é tão alta quanto no processo convencional, além de afetar as propriedades das fibras de celulose. O uso de xilanases, em especial endo-xilanases, tem se mostrado uma alternativa interessante. O biobranqueamento enzimático, além de reduzir a geração de poluentes, é considerado economicamente viável. Uma vez que a xilana se apresenta ligada tanto à celulose quanto a lignina, a sua remoção permitiria o uso de uma menor quantidade de compostos na remoção dos compostos aromáticos (DURAN *et al.*, 2008).

Algumas enzimas holocelulolíticas apresentam destaque também como componentes de formulações detergentes. As celulasas são utilizadas com o objetivo de remover as pilosidades que aparecem com o uso de tecidos de algodão, bem como para facilitar a remoção de sujidades particuladas do tecido. As mananases também são utilizadas na remoção de gomas constituídas por galactomananas. Estas substâncias são capazes de estabelecer interações persistentes com tecidos de algodão, permitindo a adesão de sujidades particuladas. As endo-mananases são, portanto, agentes de importância na remoção de tais materiais (AEHLE, 2007).

Embora o polímero de maior interesse seja a celulose devido ao fato de que o uso de glicose em processos fermentativos já é bem estabelecido, a degradação da biomassa envolve a ação coordenada de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas. Isso decorre da complexa organização da parede celular, onde as pectinas e hemicelulose formam uma rede bem estruturada e que, caso não seja desfeita, dificulta o acesso das celulasas ao seu substrato (SELIG *et al.*, 2009 ; VÁRNAI *et al.*, 2011 ; SELIG *et al.*, 2008 ; VARDAKOU *et al.*, 2004). Além disso, tem-se interesse na obtenção de todos os açúcares redutores constituintes da parede celular, uma vez que todos podem ser aproveitados em uma biorrefinaria.

## **2.4 COMPLEXOS MULTIENZIMÁTICOS**

Conforme discutido anteriormente, o sinergismo exibido por diferentes enzimas é um fenômeno crucial para a eficiente digestão da biomassa

lignocelulósica. Em certos casos, tais enzimas apresentam-se organizadas na forma de complexos multienzimáticos, e a principal vantagem deste tipo de estrutura consiste na proximidade espacial existente entre as enzimas, o que favorece a ação sinérgica das mesmas. Isto fica evidente quando se compara as taxas de hidrólise obtidas com a utilização de complexos multienzimáticos e enzimas livres, que são superiores na primeira condição (ZHANG, 2011).

Alguns organismos anaeróbicos, em especial bactérias do gênero *Clostridium*, apresentam holocelulases organizadas em complexos multienzimáticos denominados celulosomas. Este complexo é estruturado basicamente em torno de uma proteína não-catalítica denominada escafoldina. Associadas a escafoldina encontram-se outras proteínas do tipo coesinas. Estas coesinas apresentam capacidade de associação com doquerinas, proteínas presentes em domínios de muitas glicosil-hidrolases. As doquerinas também se encontram na superfície celular destes microrganismos, permitindo a ancoragem dos celulosomas (FONTES & GILBERT, 2010).

O sistema holocelulolítico de fungos filamentosos e bactérias aeróbios comumente é caracterizado por consistir de enzimas livres. Entretanto, diversos trabalhos demonstraram a existência de complexos multi-enzimáticos relacionados à degradação de biomassa lignocelulósica. JIANG *et al.* (2010) e OHTSUKI *et al.* (2005) caracterizaram xilanossomas secretados por *Streptomyces olivaceoviridis* e *Chaetomium* sp., respectivamente. Estes complexos são caracterizados pela presença de enzimas relacionadas à digestão da xilana. CONELLY *et al.* (1991) identificaram um complexo composto por atividades de  $\beta$ -glicosidase, laminarinase e liquenase secretado por *Penicillium capsulatum*. Estas estruturas, entretanto, não apresentam as proteínas estruturais típicas de celulosomas. Mas algumas proteínas estruturais relacionadas à celulosomas foram descritas em complexos secretados por fungos anaeróbicos integrantes da microbiota do rúmen, como *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces* sp., e *Orpinomyces* sp. (WILSON & WOOD, 1991 ; STEENBAKKERS *et al.*, 2001).

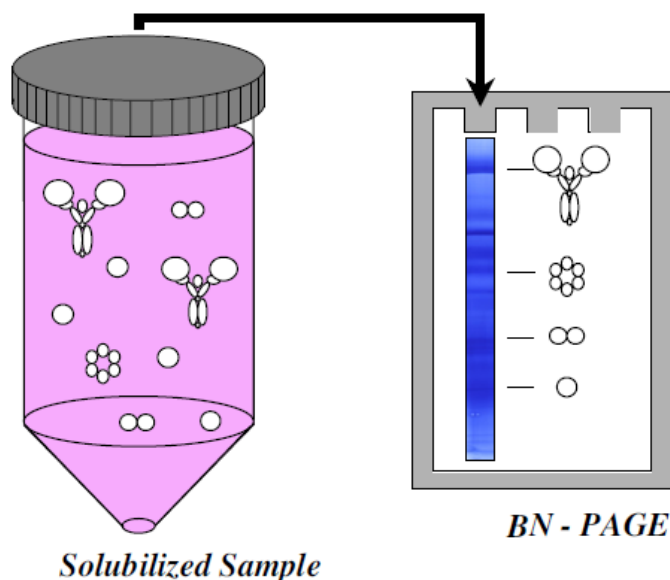
Abordagens recentes utilizando a técnica de *Blue Native PAGE* tem revelado a presença de complexos multienzimáticos secretados por fungos



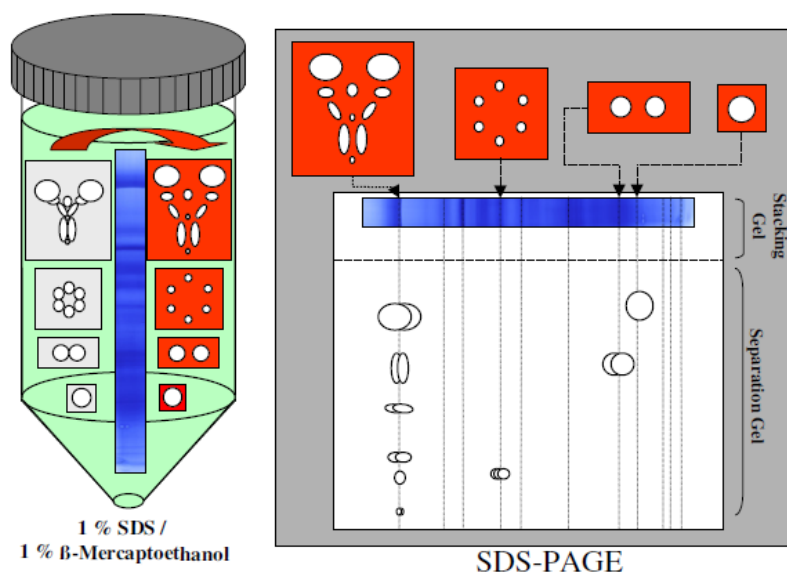
filamentosos cultivados em fontes de carbono lignocelulósicas. GONZALEZ-VOGEL *et al.* (2010) demonstraram a presença de complexos multienzimáticos secretados por *Penicillium purpurogenum* cultivado em meios líquidos contendo polpa de beterraba, sabugo de milho ou xilana acetilada como fontes de carbono. Estes mesmos autores ressaltam que a composição de tais complexos está relacionada à fonte de carbono utilizada pelo microrganismo. SILVA *et al.* (2012) também identificaram complexos formados por celulasas e hemicelulasas secretados por *Trichoderma harzianum* cultivado em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar. A técnica de BN-PAGE, portanto, apresenta-se promissora para a pesquisa por complexos secretados por fungos filamentosos cultivados em meios contendo fontes de carbono lignocelulósicas.

A técnica de Blue Native PAGE (BN-PAGE) foi proposta por SCHAGGER & VON JAGGER (1991) para a avaliação em gel de complexos proteicos de membrana intactos. A prévia solubilização dos complexos hidrofóbicos com detergentes não-iônicos e o uso do corante aniônico azul de Coomassie permitem condições brandas o suficiente para garantir a integridade dos complexos, bem como sua migração eletroforética, e reduzir as chances de agregação inespecífica. A solubilidade das estruturas proteicas hidrofóbicas ao longo da corrida eletroforética é mantida pela presença de compostos zwitteriônicos, como o ácido aminocapróico, que apresentam baixa mobilidade nas condições de pH estabelecidas durante o procedimento. Os complexos revelados podem ser decompostos em uma segunda dimensão sob condições desnaturantes, em um gel de Tricina-SDS-PAGE. O esquema de um BN-SDS-PAGE é ilustrado na Figura 11.

A) 1st Dimension - BN-PAGE



B) 2nd Dimension: SDS-PAGE



**Figura 11.** Esquema de funcionamento de um gel bidimensional BN/SDS-PAGE. A. Primeira dimensão, em que os complexos proteicos são solubilizados e separados em condições nativas. B. Segunda dimensão, onde inicialmente a tira de gel extraída do gel de primeira dimensão e que contém os complexos separados é tratada em condições desnaturantes, e os constituintes dos complexos podem ser separados de maneira similar a um SDS-PAGE convencional. (Extraído de Eubel *et al*, 2005).

Proposta inicialmente para a avaliação de complexos proteicos associados a membranas (hidrofóbicos), esta técnica também permite investigar interações existentes entre proteínas hidrofílicas citoplasmáticas. O uso do BN-PAGE tem permitido a elucidação do papel fisiológico de diversas interações proteicas, bem como a relação de tais associações com os mais

variados processos patológicos e distúrbios metabólicos (WITTIG & SCHAGGER, 2008).

## 2.5 PIOLHO-DE-ALGODÃO

A cultura do algodão emprega quatro espécies pertencentes ao gênero *Gossypium* (Malvaceae): *G. herbaceum*, *G. arboreum*, *G. barbadense* e *G. hirsutum*, sendo esta última espécie a mais utilizada para plantio. Não há consenso sobre a origem do gênero *Gossypium*, mas acredita-se que tenha ocorrido entre 10-20 milhões de anos atrás, com a separação do paleocontinente Gondwana. Ancestrais das espécies do gênero teriam se concentrado principalmente na Austrália, África-Arábia e Mesoamérica (BRUBAKER *et al.*, 1999 ; WENDEL & ALBERT, 1992).

No ano de 2011, o Brasil era o quinto maior produtor mundial de algodão em caroço e em pluma, estando atrás da China, Índia, Estados Unidos e Paquistão (FAO, 2011). Nesse mesmo ano, a produção brasileira alcançou 5 milhões de toneladas de algodão em caroço, destacando-se como maiores produtores os estados de Mato Grosso e Bahia, contribuindo com 2,5 e 1,5 milhão de toneladas, respectivamente (BRASIL, 2011).

Os resíduos gerados durante o beneficiamento industrial do algodão apresentam grande potencial de impactos ambientais. Estima-se que no ano de 2010, a quantidade desses resíduos tenha alcançado quase 600 mil toneladas (DIAS *et al.*, 2012).

O piolho-de-algodão consiste de uma mistura complexa de resíduos formados principalmente por fragmentos de caroços, cascas, folhas e pequenas fibras entrelaçadas, gerados durante o processo de descaroçamento do algodão (MINAS GERAIS, 2004 ; AGBLEVOR *et al.*, 2003). Estima-se que a cada fardo (cerca de 230 Kg) de algodão processado sejam gerados entre 37 e 147 Kg de piolho-de-algodão, valor que pode alcançar 317 Kg, dependendo da tecnologia de colheita empregada (THOMASSON, 1991).

Diversas alternativas têm sido avaliadas com o intuito de agregar valor a estes resíduos, as quais incluem: compostagem, insumo para a alimentação animal, adubação do solo, substrato para o crescimento de cogumelos

comestíveis, e produção de briquetes (THOMASSON, 1991 ; SHARMA-SHIVAPPA & CHEN, 2008). O potencial do piolho-de-algodão como fonte de carbono para a produção de etanol lignocelulósico também tem sido investigado. Cerca de 30-50% da composição deste resíduo correspondem a carboidratos, sendo a celulose e a xilana os mais representativos (80-90%) (AGBLEVOR *et al.*, 2003). O uso do piolho-de-algodão como substrato para a produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos filamentosos, entretanto, ainda é pouco estudado. DUARTE *et al.* (2012) relataram a capacidade de *Aspergillus oryzae* de secretar xilanases quando cultivado em meio contendo piolho-de-algodão sujo como única fonte de carbono.

## **2.6 *Penicillium fellutanum***

Os fungos filamentosos apresentam grande importância industrial, sendo utilizados como biofábricas para a obtenção de uma vasta gama de produtos de interesses, como antibióticos, enzimas, etc. Uma característica dos fungos que favorece sua utilização em processos fermentativos é a capacidade de secreção de proteínas e outros compostos que estes microrganismos apresentam (KUMAR *et al.*, 2008).

Os fungos são agentes fundamentais nos processos de decomposição da matéria orgânica na natureza, especialmente em função dos sistemas enzimáticos que secretam para a digestão dos compostos da parede celular vegetal. Portanto, tais organismos apresentam potencial para a produção de enzimas a serem utilizadas em biorrefinarias (LANGE, 2010). Neste cenário, as espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* ganham destaque na produção de enzimas holocelulolíticas (GUSAKOV, 2011).

*Penicillium fellutanum* (sinônimo *Penicillium dierckxii* Biourge 1923) classifica-se na família Trichocomaceae (INDEX FUNGORUM). Esta família, que também congrega espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, caracteriza-se por organismos predominantemente saprófitas (HOUBRAKEN & SAMSON, 2011).

Vários estudos relatam a presença de *P. fellutanum* associado a espécies de insetos, alguns dos quais avaliam seu potencial como agente de

controle entomológico (SALES *et al.*, 2002 ; COSTA & OLIVEIRA, 1998 ; COSTA *et al.*, 1998).

Diversos metabólitos secundários produzidos por *P. fellutanum* apresentam importância clínica e toxicológica. SHIGEMORI *et al.* (1991) noticiaram o isolamento de peptídeos citotóxicos (Felutamidas A e B) a partir do micélio de um isolado de *P. fellutanum* associado ao trato intestinal de uma espécie de peixe marinha. KOBAYASHI & ISHIBACHI (1993) verificaram que estes compostos demonstraram capacidade citotóxica frente a células cancerígenas *in vitro*. Estes mesmos peptídeos, em um outro estudo, demonstraram capacidade de inibição frente à proteassomas, como o de *Mycobacterium tuberculosis*, bem como capacidade neurotrófica (LIN *et al.*, 2010 ; YAMAGUCHI *et al.*, 1993 ; HINES *et al.*, 2008). Há também relatos que demonstram a capacidade de *P. fellutanum* de produzir certas micotoxinas, como a citrinina, um agente com efeito nefrotóxico (BARKAI-GOLAN, 2008).

Apesar da reconhecida capacidade que a espécie tem de produzir metabólitos secundários bioativos, o potencial de *P. fellutanum* para a produção de enzimas holocelulolíticas ainda é pouco avaliado.

### 3 JUSTIFICATIVA

- A hidrólise da biomassa vegetal é passo importante em diversas atividades industriais, como a produção de biocombustíveis de segunda geração. Esse processo apresenta várias vantagens quando realizado a partir de holocelulases, como a redução da quantidade de energia requerida, a não-formação de agentes inibidores do crescimento de microrganismos, bem como a redução da quantidade de poluentes gerados. Nesse contexto, a prospecção por coquetéis enzimáticos eficientes e mais baratos na hidrólise de diversos tipos de biomassa tem sido tema de diversas linhas de pesquisa;
- A utilização de resíduos agroindustriais como indutores para a secreção de enzimas por fungos filamentosos é uma alternativa interessante, uma vez que tais resíduos apresentam baixo custo e grande disponibilidade;
- O potencial de *Penicillium fellutanum* em produzir e secretar enzimas holocelulolíticas ainda é pouco estudado;

- O isolado de *P. fellutanum* utilizado no presente trabalho foi isolado a partir de amostras de solo do Cerrado. Este bioma apresenta uma grande biodiversidade, ainda pouco explorada.
- A possível organização de enzimas lignocelulolíticas em complexos multienzimáticos, descrita em outros trabalhos envolvendo fungos filamentosos, representa um fenômeno importante para a compreensão dos mecanismos de sinergismo, cruciais para a eficiente hidrólise da biomassa vegetal.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de holocelulases secretadas por *P. fellutanum* cultivado em diversas fontes de carbono lignocelulósicas, bem como caracterizar a atividade de mananase semi-purificada a partir de cultivos em piolho-de-algodão sujo.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Efetuar o cultivo em condições submersas do isolado de *Penicillium fellutanum* em seis fontes de carbono diferentes: casca de maracujá, casca do grão de soja, piolho-de-algodão sujo, engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, casca de laranja;
- Avaliar as atividades de mananase, xilanase, pectinase, carboximetilcelulase (CMCase), atividade sobre papel de filtro (FPase), e avicelase presentes nos cultivos;
- Caracterizar as mananases pré-purificadas a partir de cultivos em piolho-de-algodão sujo;
- Prospecção por complexos secretados por *P. fellutanum* cultivado em diversas fontes de carbono, a partir da técnica de BN-PAGE.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 ISOLADO**

O isolado de *Penicillium fellutanum* foi obtido junto à micoteca do Laboratório de Enzimologia, estabelecida a partir de amostras de solo coletadas do cerrado. As amostras de solo foram coletadas em uma fazenda no entorno do Distrito Federal com uma área de cerrado muito bem preservada (fisionomia cerradão-floresta), situada entre os municípios de Planaltina de Goiás, Água Fria, Padre Bernardo e Mimoso, numa região próxima ao povoado Mato Seco. A identificação do isolado foi realizada por morfologia no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, sob a supervisão do Prof. Luís Roberto Batista. A identificação molecular do isolado está em andamento, numa parceria com o Prof. Robert Neil (Laboratório de Microbiologia – CEL/IB/UnB).

Dentro do âmbito da rede Sisbiota de Fungos Filamentosos, foi concedida a Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético nº 010770/2013-5.

O isolado foi mantido em placas de Ágar Batata Dextrose (BDA) acrescido de Cloranfenicol em concentração final de 200 partes por milhão (PPM) durante o período de experimento.

### **5.2 REAGENTES E COLUNAS CROMATOGRÁFICAS**

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos da SIGMA (St. Louis, MO, EUA). As colunas cromatográficas foram adquiridas da GE Healthcare (Uppsala, Suécia).

### **5.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM DIVERSAS FONTES DE CARBONO**

Foi realizado um *screening* inicial quanto à secreção de enzimas holocelulolíticas por *P. fellutanum* em seis diferentes fontes de carbono: casca de maracujá, casca do grão de soja, piolho-de-algodão sujo, engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, e casca de laranja. Todos os resíduos, com exceção das cascas de laranja e maracujá, foram submetidos à

autoclavagem inicial (121°C/2 horas), seguindo-se à lavagem em água corrente, secagem a 65°C por 72 horas, e moagem em moinho de bancada. O piolho-de-algodão sujo utilizado neste trabalho não foi moído. As frutas foram lavadas em água corrente, descascadas, e as cascas submetidas à secagem em estufa a 60°C, e então moídas. As frutas foram adquiridas do comércio local; o piolho-de-algodão sujo foi fornecido pela indústria de rebeneficiamento de algodão Hantex Resíduos Têxteis (Gaspar/SC); e os demais resíduos foram obtidos junto a fazendas em Goiás e no entorno do Distrito Federal.

O fungo foi cultivado em meio suplementar (g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 7,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0; Extrato de Levedura – 0,6), acrescido da respectiva fonte de carbono na concentração final de 1% m/v. Culturas de *P. fellutanum* em BDA de 30 dias tiveram a sua superfície raspada, com o auxílio de uma lâmina para microscopia, e os esporos transferidos para 50 mL de uma solução salina (NaCl 0,9%), sendo adicionados 1 mL de solução de Tween 80 a 1%. A contagem dos esporos foi realizada em Câmara de Neubauer. A partir de uma suspensão de cerca de  $10^6$ - $10^7$  esporos/mL foi inoculada alíquota equivalente a 1 % do volume do meio de cultivo. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio. Os frascos foram incubados em shaker com agitação a 120 rpm, 28°C, durante 7 dias. Os cultivos foram realizados em triplicata.

Após este período de incubação, os cultivos foram filtrados através de Papel Whatman nº1, e os sobrenadantes, contendo as atividades enzimáticas, foram coletados (essa fração passa a ser denominada extrato bruto) e preservados através da adição de azida sódica na concentração de 0,02%.

Os extratos brutos foram pesquisados quanto às atividades de hemicelulases (mananase e xilanase), pectinase, e celulases (carboximetilcelulase - CMCCase, FPAse e Avicelase). Os substratos utilizados para as atividades de mananase, xilanase, pectinase e CMCCase foram, respectivamente, manana 1% (galactomanana de alfarroba), xilana de aveia 1% em tampão acetato de sódio pH 5,0, pectina de frutas cítricas 1% e carboximetilcelulose 0,5%, todos adquiridos. Os ensaios corresponderam a mistura de 100 µL de cada substrato com 50 µL de extrato bruto, seguindo-se a incubação em banho-maria a 50°C por 30 minutos (FERREIRA FILHO *et al.*, 1993). Para a determinação da atividade de celulase sobre papel de filtro



(FPAse), foram utilizadas como substrato tiras de papel Whatman nº1 de 1x6 cm e 150 µL de extrato bruto, segundo método proposto por GHOSE (1987). Os tubos foram incubados a 50°C durante 1 hora. No ensaio para determinação da atividade de Avicelase, foram incubados 150 µL de Avicel 1% em tampão acetato de Sódio 50 mM pH 4,8 e 150 µL de extrato bruto a 50°C por 2 horas (GHOSE, 1987). Após o período de incubação da enzima com o substrato, foram adicionados 150 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS), e os tubos foram incubados em banho fervente por 10 minutos, para a detecção dos açúcares redutores liberados pela ação enzimática, segundo metodologia descrita por MILLER (1959). As atividades enzimáticas foram expressas em Unidades Internacionais por mililitro de amostra (U.I./mL), sendo que U.I. corresponde a quantidade de enzima responsável pela liberação de 1 micromol de açúcar redutor por minuto. A concentração de proteínas foi determinada como descrito no kit (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA), segundo método proposto por BRADFORD (1976). As atividades específicas foram calculadas e expressas em U.I./mg de proteína total. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os desvios-padrão foram inferiores a 10% da média.

Após a conclusão da etapa de *screening*, foi selecionada uma fonte de carbono para posteriores estudos de purificação e caracterização das principais atividades enzimáticas.

#### 5.4 PROSPECÇÃO POR COMPLEXOS ENZIMÁTICOS

*Penicillium fellutanum* foi cultivado em casca de maracujá, casca do grão-de-soja, piolho-de-algodão sujo, engaço de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, casca de laranja, e uma composição de casca do grão-de-soja, piolho-de-algodão sujo e casca de laranja (1:1:1), de forma semelhante ao procedimento descrito no tópico anterior. Foram inoculados 500 mL de meio de cultivo contendo cada uma das fontes de carbono (em erlenmeyers de 1L), e os frascos foram incubados por 15 dias a 28°C e 120 rpm de agitação.

Após o período de incubação, o material foi concentrado em 10 vezes através de membrana de ultrafiltração com retenção de 10 kDa.

O material concentrado foi dialisado contra água destilado em tubos de diálise (SIGMA) de poro de retenção de 10 kDa. Posteriormente, alíquotas do

material dialisado (1mL) foram precipitadas com ácido Tricloroacético e posteriormente ressuspensas no mesmo volume inicial. A precipitação foi necessária para a remoção de corantes, no intuito de evitar possíveis interferências dos mesmos durante a quantificação de proteínas das amostras, realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology). A escolha deste método para as amostras de BN-PAGE foi a maior sensibilidade, bem como menor chance de interferência de outros compostos presentes nas amostras.

Alíquotas de cada extrato bruto equivalentes a 50 microgramas de proteína total foram aplicadas em gel de poliacrilamida (5-18%), e a migração eletroforética foi realizada a 4°C e corrente constante (15 mA). O tampão anódico foi composto de Bis-Tris HCl pH 7.0 0.05M, e o tampão catódico Tricina 0.05M, Bis-Tris HCl pH 7.0 0.015M e Coomassie Blue CBB G-250 0.02%. Após a eletroforese, os géis foram corados com CBB G-250. Foram utilizados os seguintes marcadores moleculares: Tiroglobulina (669 KDa), Ferritina (440 KDa), Catalase (232 KDa), Lactato desidrogenase (158 KDa) e albumina bovina sérica (BSA- 67 KDa).

## 5.5 CURVA DE INDUÇÃO ENZIMÁTICA

Com o intuito de avaliar a secreção de enzimas por *P. fellutanum* em um período de tempo maior, foram realizados cultivos de 25 dias, em erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL de meio suplementado com piolho-de-algodão sujo, nas mesmas condições de incubação. Diariamente foram coletadas alíquotas de 1 mL para a determinação das atividades enzimáticas e concentração de proteína total. O experimento foi realizado em triplicata biológica (três frascos de cultivo), e os ensaios de cada replicata biológica foram realizados em triplicata.

## 5.6 FRACIONAMENTO E CONCENTRAÇÃO DA ATIVIDADE DE MANANASE

Para a purificação e caracterização da mananase secretada por *P. fellutanum* cultivado em meio contendo piolho-de-algodão sujo por 5 dias, o extrato bruto foi ultrafiltrado através de membrana de 50 kilodáltons (kDa), em sistema de ultrafiltração AMICOM, sendo concentrado 10 vezes.

## **5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E PH**

A atividade de mananase foi avaliada em uma faixa de temperatura variando de 30 a 80°C. Os ensaios foram realizados em microescala em termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA), correspondendo a 10 µL de substrato e 5µL de extrato bruto. Após a reação em cada temperatura correspondente por 30 minutos, foram adicionados 30 µL de DNS. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas SPECTRAMAX (Molecular Devices, USA).

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade de mananase, foram utilizados os respectivos substratos tamponados nas seguintes faixas de pH: Acetato de Sódio (pH 3,5 – 6,0), Fosfato de Sódio (pH 6,0 – 7,5) e Tris (pH 7,5 – 9,0). A concentração final dos tampões foi de 50 mM. Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito anteriormente.

## **5.8 TERMOESTABILIDADE**

Os extratos brutos concentrados foram incubados a 55°C, 50°C e 40°C para avaliar a estabilidade da atividade de mananase ao longo do tempo. Periodicamente, alíquotas eram retiradas e avaliadas por ensaio enzimático, conforme descrito anteriormente.

## **5.9 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA MANANASE**

O extrato bruto contendo a atividade de mananase foi, inicialmente, aplicado em coluna Sephacryl S-100 (3X72 cm) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50mM pH 5.0 contendo cloreto de sódio 0,15M e azida sódica 0,02%. A eluição das frações ocorreu a 0,33 mL/min. As frações contendo atividade de mananase foram reunidas e submetidas a cromatografia de troca iônica.

As frações foram concentradas 5 vezes por ultrafiltração e aplicadas em coluna Q Sepharose Fast Flow (QFF 1mL), acoplada ao sistema de purificação Akta (GE healthcare). A coluna foi pré-equilibrada nas mesmas condições que a coluna S100. A eluição foi iniciada com tampão Acetato de Sódio 50mM pH5.0 a um fluxo de 1 mL/min, seguindo-se a um gradiente de Cloreto de Sódio

(0-1M) sob o mesmo fluxo. As frações semi-purificadas obtidas foram submetidas a caracterização.

### **5.10 CARACTERIZAÇÃO DAS MANANASES SEMI-PURIFICADAS**

As frações semi-purificadas obtidas após a cromatografia de troca iônica foram novamente caracterizadas quanto ao efeito da temperatura e do pH. Também foram verificados os efeitos de íons e compostos fenólicos sobre as atividades enzimáticas, bem como determinados parâmetros cinéticos: Constante de Michaelis-Mentem ( $K_m$ ), e velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x.}$ ).

### **5.11 EFEITO DE ÍONS**

Foi investigado o efeito de íons metálicos ( $Ag^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ), bem como do detergente SDS sobre a atividade de mananase semi-purificada. As amostras foram pré-incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos em presença destes compostos na concentração de 10 mM. Como controle, as amostras foram incubadas em água destilada. Após o período de incubação, as atividades enzimáticas foram avaliadas, conforme ensaio em microescala descrito anteriormente, e os resultados expressos em atividade percentual.

### **5.12 EFEITO DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

A amostra semi-purificada de mananase foi avaliada quanto a inibição de tais enzimas por compostos fenólicos. Acrescentou-se às amostras, na proporção de 1:4, soluções de 1mg/mL dos seguintes compostos fenólicos: vanilina, ácido tânico ácido ferúlico, ácido 4-hidroxi-benzóico, ácido cinâmico e ácido  $p$ -cumárico, sendo os dois primeiros dissolvidos em água, e os demais em etanol. As atividades foram determinadas a partir de ensaio enzimático em microescala, conforme descrito anteriormente, e expressas em atividade relativa. Como controle, foram utilizadas amostras acrescidas de água ou etanol.

### 5.13 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), e da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), foram realizados ensaios em microescala com concentrações de substrato variando de 0,66 a 26,6 mg/mL de manana. A determinação dos parâmetros cinéticos foi feita pelo programa Enzifitter (LEATHERBARROW, 1999).

### 5.14 ELETROFORESE E ZIMOGRAMA

O grau de pureza das enzimas foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo metodologia preconizada por LAEMMLI (1970). As amostras foram precipitadas com Ácido Tricloroacético (TCA). Foram utilizados os marcadores de massa molecular fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (30,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa) (Kit *Low Molecular Weight* Marker, GE Healthcare).

A identificação das atividades enzimáticas em gel (zimograma) foi realizada conforme métodos preconizados por BISCHOFF *et al.* (1998).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

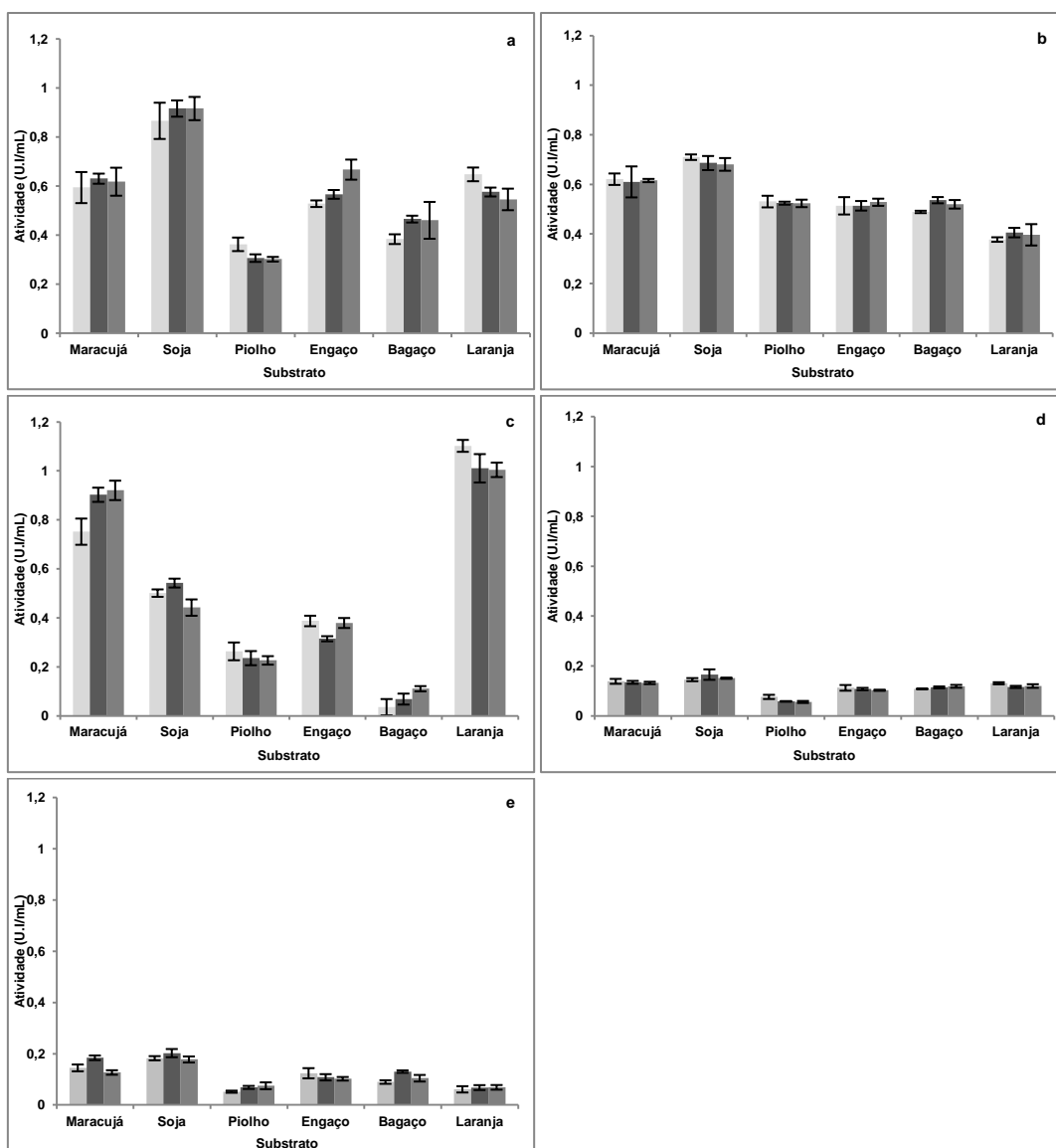
### 6.1 PERFIL DE HOLOCELULASES SECRETADAS EM DIVERSAS FONTES DE CARBONO

As atividades enzimáticas detectadas nos cultivos de *P. fellutanum* em diversas fontes de carbono lignocelulósicas são ilustradas na Figura 12.

Os resultados obtidos no *screening* inicial refletem a influência da constituição do substrato sobre as atividades secretadas. A casca do grão de soja se mostrou o melhor indutor para a atividade de mananase (Figura 12a). Estes resíduos detêm o maior teor de mananas presente no grão de soja e, portanto, apresentam potencial como substrato para a produção dessas enzimas (ODETALLAH, 1997). Os níveis de atividade de xilanase apresentaram menor variação entre os substratos avaliados (Figura 12b). Tal

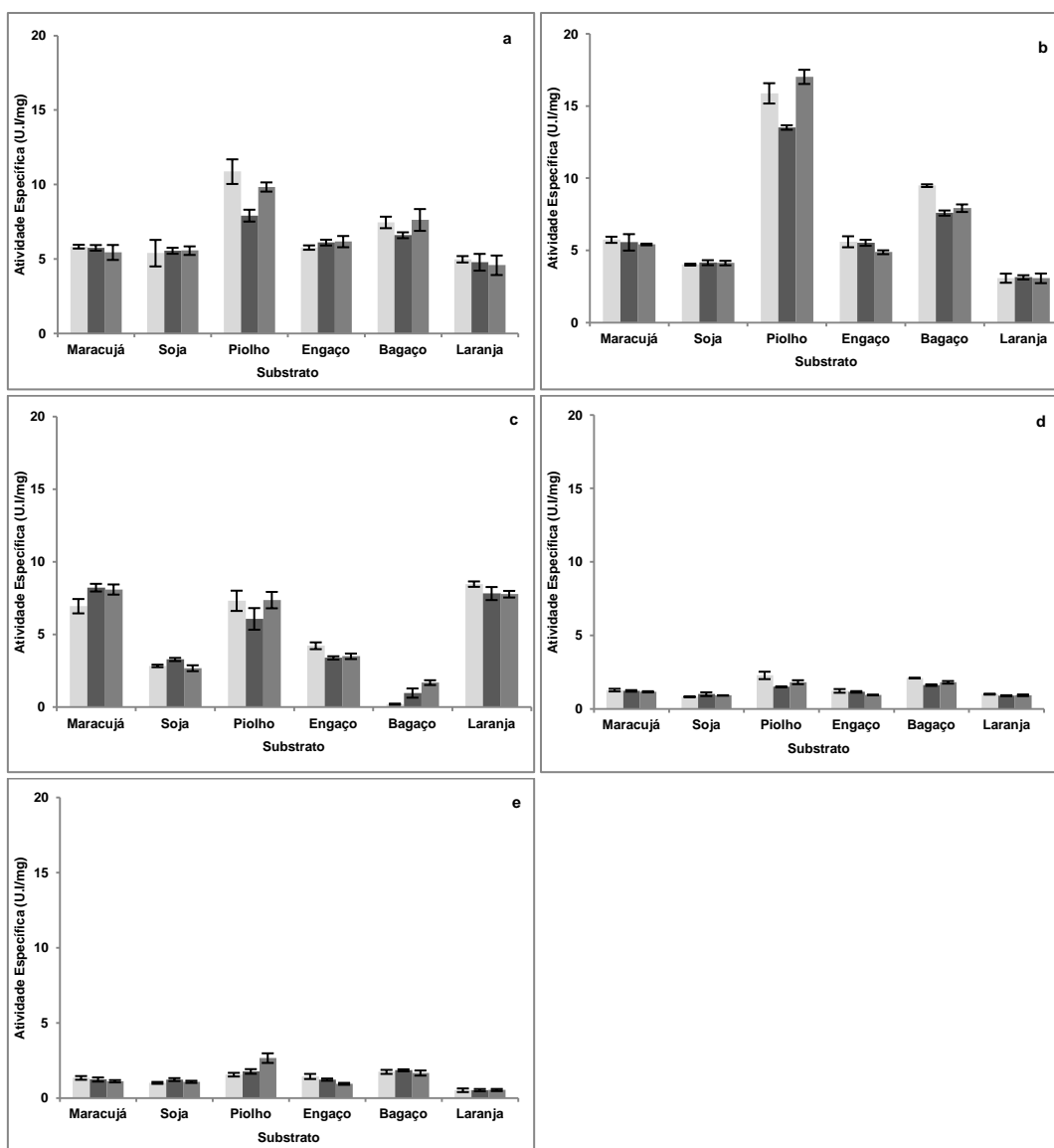
fato pode ser explicado pela presença de xilana como a hemicelulose mais abundante em todos os resíduos testados. Os indutores dos maiores valores de atividade de pectinase (Figura 12c) foram os resíduos de frutas, substratos reconhecidos pela grande quantidade de pectina que os constituem. As pectinas apresentam importante papel no processo do amadurecimento dos frutos (BRUMMELL & HARPSTER, 2001). O nível mais baixo de atividade pectinolítica foi observado em cultivos contendo bagaço-de-cana de açúcar, fato este que é condizente com o baixo teor de pectina presente nas paredes celulares de monocotiledôneas (VOGEL, 2013).

Embora os níveis de atividade celulolítica tenham sido bem inferiores em relação aos níveis de atividade pectinolítica, xilanolítica e mananolítica, estes resultados estão próximos a dados disponíveis na literatura. JØRGENSEN & OLSSON (2006) detectaram níveis de atividade de FPAse da ordem de 0,36 U/mL em cultivos de *Penicillium brasilianum* em fonte de carbono lignocelulósica. Com relação aos níveis de CMCase, os valores encontrados neste trabalho foram inferiores aos encontrados por CASTRO *et al.*(2010), que avaliaram cultivos de *Penicillium funiculosum* em bagaço de cana-de-açúcar e encontraram níveis de atividade enzimática contra CMC da ordem de 1,17 U.I/mL. Os valores de atividade de Avicelase (dados não mostrados) não alcançaram níveis significativos.



**Figura 12.** Determinação das atividades de mananase (a), xilanase (b), pectinase (c), CMCase (d), e FPase (e) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em diversas fontes de carbono lignocelulósicas. Cada barra representa a média obtida para uma replicata biológica, sendo apresentados os desvios-padrão correspondentes.

As atividades específicas são esquematizadas na Figura 13. Como pode ser deduzido pela análise da figura, as atividades específicas de mananase (Fig. 13a) e xilanase (Fig. 13b) foram maiores em cultivos com piolho-de-algodão sujo como única fonte de carbono. A atividade específica de pectinase (Fig. 13c) foi maior em cultivos contendo casca de laranja, casca de maracujá ou piolho-de-algodão sujo como fontes de carbono. Observa-se, portanto, que as maiores atividades específicas para as hemicelulases e pectinases foram, comparativamente, detectadas em cultivos contendo piolho-de-algodão sujo.



**Figura 13.** Determinação das atividades específicas de mananase (a), xilanase (b), pectinase (c), CMCase (d), e FPase (e) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em diversas fontes de carbono lignocelulósicas. Cada barra representa a média obtida para uma replicata biológica, sendo apresentados os desvios-padrão correspondentes.

A atividade específica constitui um parâmetro importante de avaliação da secreção de enzimas em comparação com a quantidade total de proteínas secretadas. Enzimas com atividade específica elevada apresentam, a princípio, seu processo de purificação mais facilitado. Levando-se em consideração a atividade específica, o piolho-de-algodão sujo foi escolhido como indutor para a produção de hemicelulases por *P. fellutanum*, de modo a purificar e caracterizar as atividades enzimáticas mais relevantes: mananase, xilanase e pectinase.

Os resultados aqui apresentados demonstram a capacidade de secreção de hemicelulases e pectinases por *P. fellutanum* em um mesmo substrato, o piolho-de-algodão sujo. Tal fato apresenta importância, uma vez que a partir de

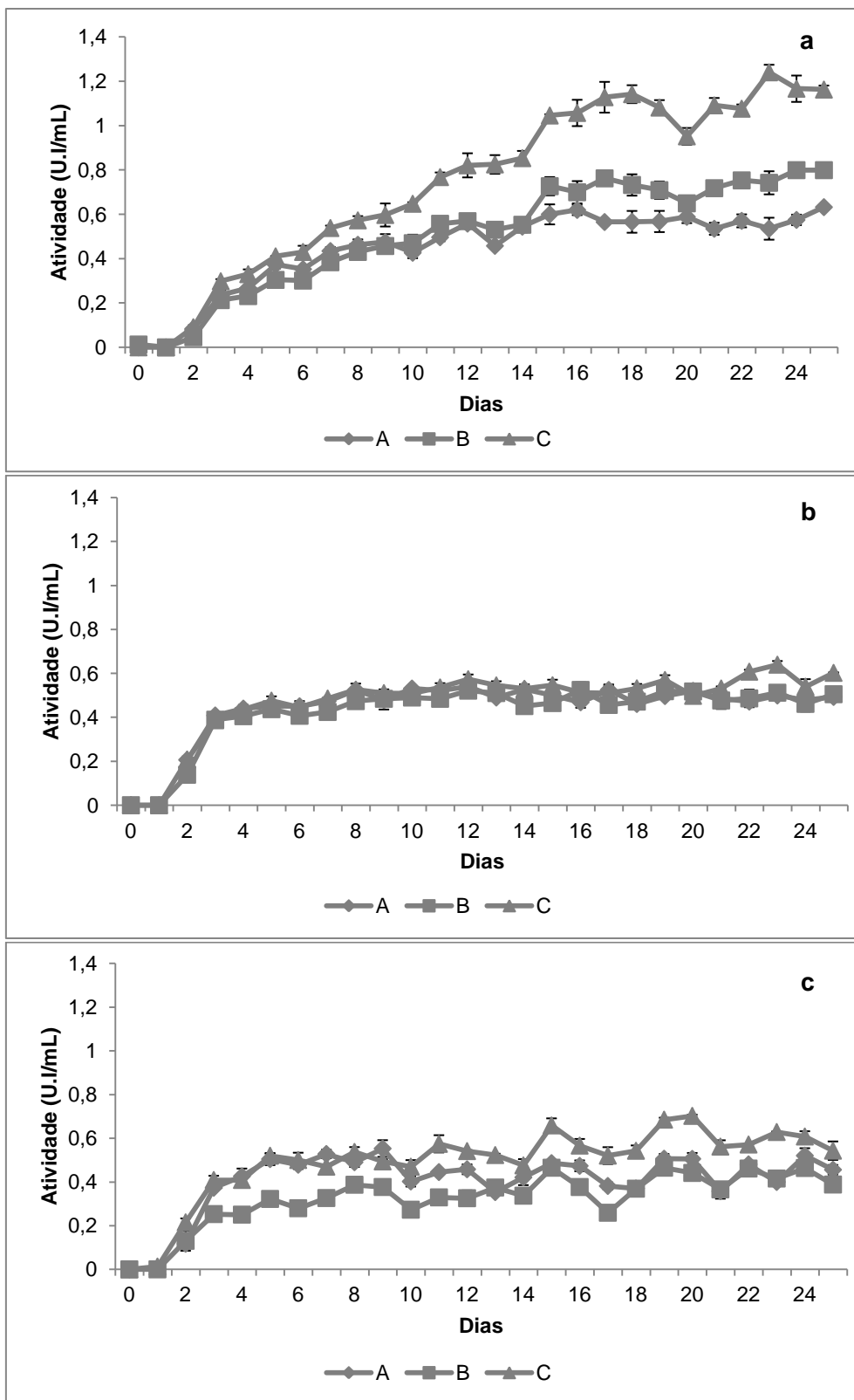


um único cultivo pode-se obter diversas enzimas de interesse. SIQUEIRA *et al.* (2010) avaliaram o potencial de um isolado de *Penicillium citrinum* em produzir holocelulases quando cultivado em piolho-de-algodão sujo, e verificaram a secreção relevante apenas de xilanases.

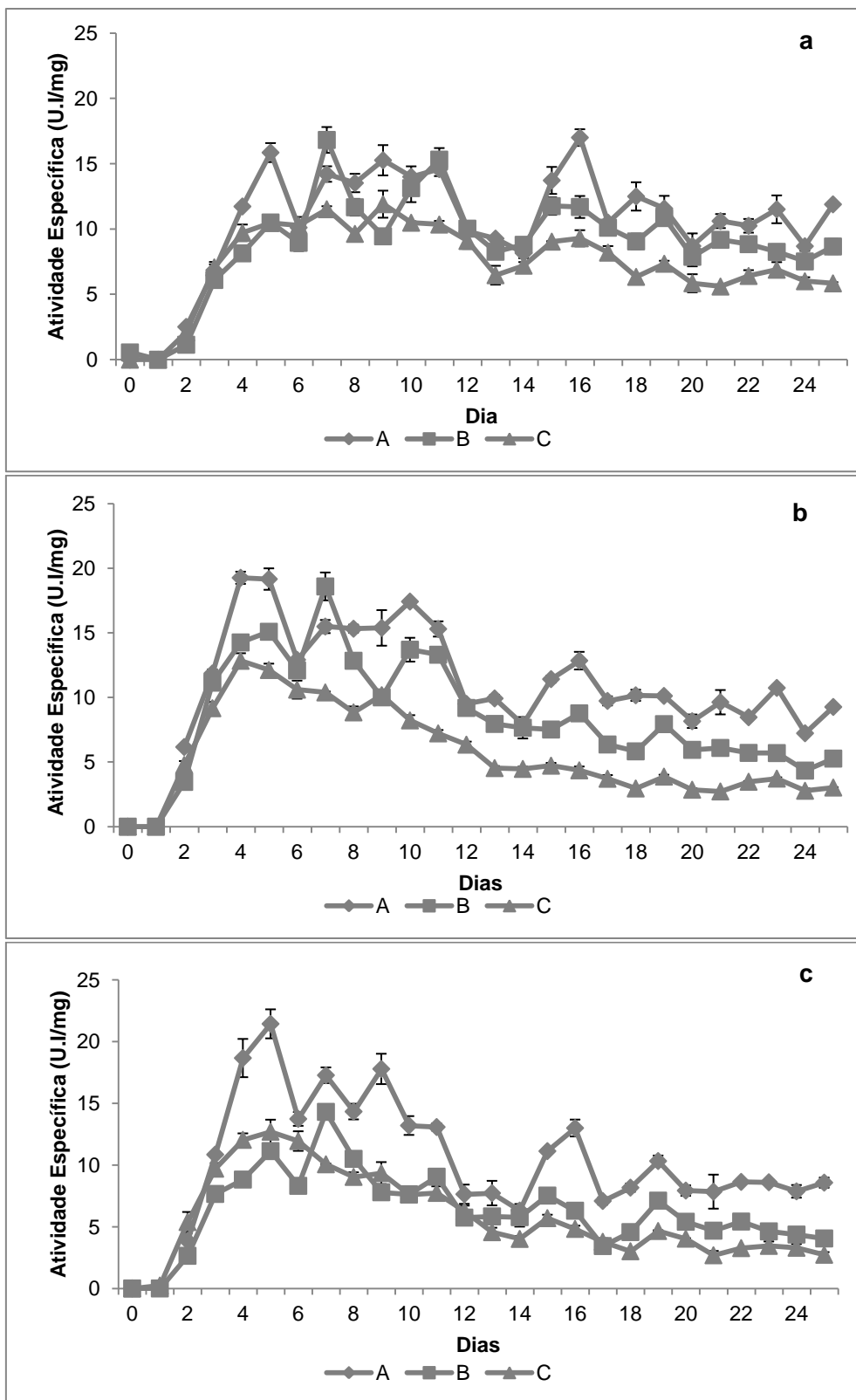
Os estudos sobre o potencial de *P. fellutanum* ainda são poucos. Esta espécie foi uma das isoladas por PALANISWAMY *et al.* (2008) a partir de amostras de serrapilheira, e secretou xilanase (39,7 U.I./mL) quando cultivado em meio líquido contendo xilana e glicose.

As atividades de mananase, xilanase e pectinase secretadas por *P. fellutanum* cultivado em piolho-de-algodão sujo foram monitoradas durante 25 dias, no intuito de se determinar em qual o tempo de cultivo são secretados os maiores níveis de atividade. Os resultados são esquematizados na Figura 14. Pela análise dos dados, observa-se uma co-indução das atividades consideradas. Os valores de atividade de xilanase (Fig. 14b) e pectinase (Fig. 14c) aumentam até o quinto dia, quando a partir de então tendem a se estabilizar. A atividade de mananase (Fig. 14a), por outro lado, se estabiliza apenas a partir do 15º dia de cultivo.

As atividades específicas também foram determinadas durante o período do experimento, e são ilustradas na Figura 15. Verifica-se que, para todas as atividades consideradas, há um primeiro pico de atividade específica no quinto dia de cultivo e, portanto, este foi o período escolhido para a purificação e caracterização das atividades enzimáticas relevantes. Optou-se pela purificação e caracterização da mananase por ser uma enzima ainda pouco estudada.



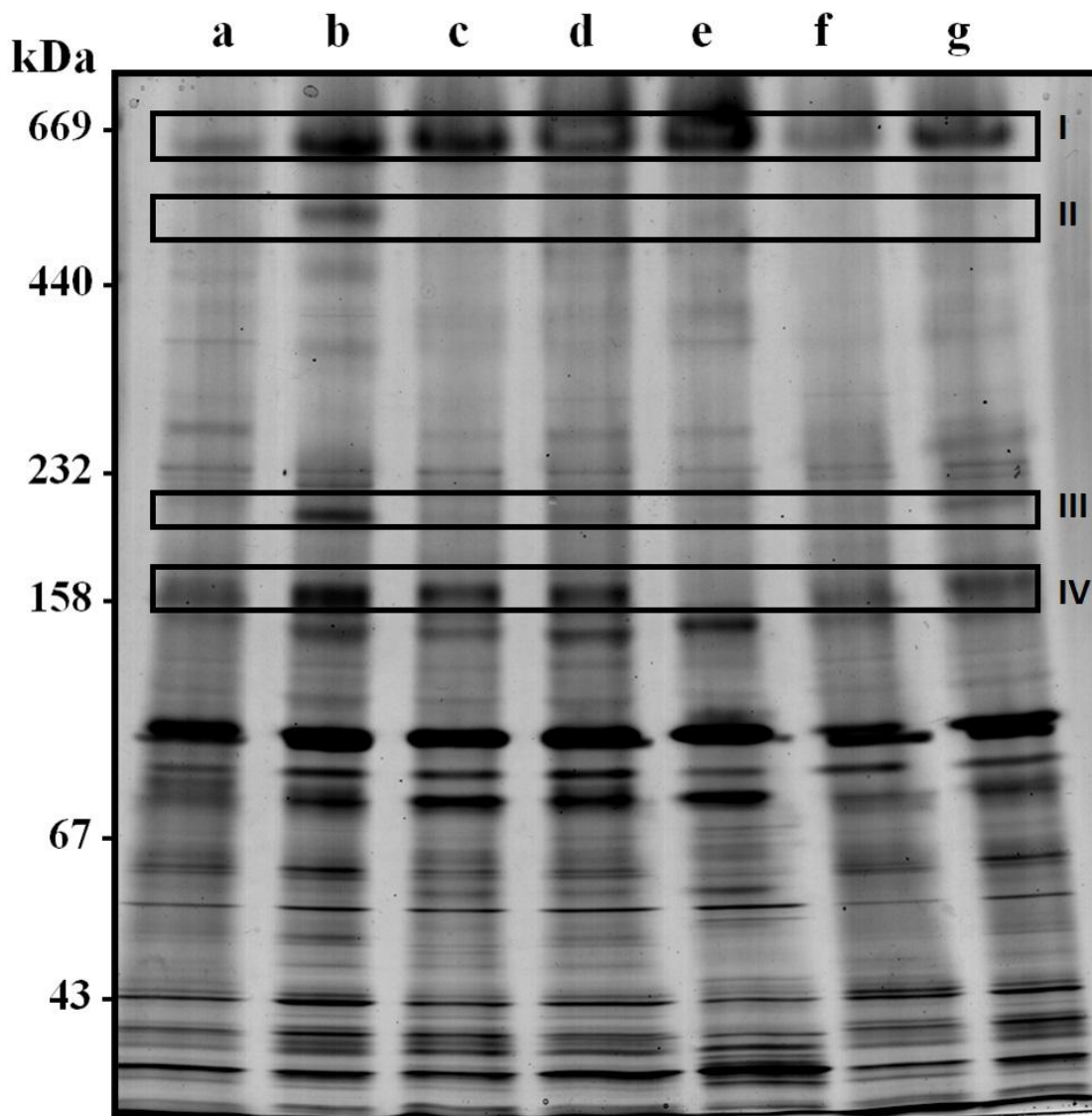
**Figura 14.** Curva de indução para as atividades de mananase (a), xilanase (b) e pectinase (c) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em meio contendo piolho-de-algodão sujo como única fonte de carbono. São apresentadas as médias de cada replicata biológica (Frascos A, B e C), bem como os desvios-padrão representados por barras.



**Figura 15.** Curva de indução para as atividades específicas de mananase (a), xilanase (b) e pectinase (c) secretadas por *P. fellutanum* cultivado em meio contendo piolho-de-algodão sujo como única fonte de carbono. São apresentadas as médias de cada replicata biológica (Frascos A, B e C), bem como os desvios-padrão representados por barras.

## 6.2 PROSPECÇÃO POR COMPLEXOS ENZIMÁTICOS

A presença de complexos proteicos em cultivos de *P. fellutanum* em 07 diferentes fontes de carbono foi investigada a partir da técnica de BN-PAGE. Os resultados são ilustrados na figura 16.



**Figura 16.** Gel BN-PAGE ilustrando perfil eletroforético de proteínas presentes em cultivos de *P. fellutanum*. Primeira coluna: marcador de peso molecular em KiloDaltons (kDa). São apresentadas as amostras de extratos brutos dos cultivos em casca de maracujá (a), casca do grão de soja (b), piolho-de-algodão sujo (c), engaço de bananeira (d), bagaço de cana-de-açúcar (e), casca de laranja (f) e composição de casca de soja:piolho-de-algodão sujo:casca de laranja 1:1:1 (g). Em cada poço foram aplicados 50 µg de proteína total.

Observa-se, pela análise da Figura 16, a presença de bandas proteicas de massa molecular aparente entre 150 e 669 kDa, e que podem configurar possíveis complexos proteicos. É importante notar as diferenças nas intensidades das bandas observadas, bem como a presença de certas bandas

restritas a cultivos em uma determinada fonte de carbono. Observa-se a presença das bandas compreendidas na região I da Figura 12 em forte intensidade aparente em todas as amostras analisadas, ao passo que as regiões II e III abrigam bandas quase que exclusivas de cultivos contendo casca do grão de soja como única fonte de carbono. Na região IV verifica-se a presença da banda proteica em todos os cultivos, exceto naquele em que a fonte de carbono presente era o bagaço de cana-de-açúcar. Observa-se, portanto, um padrão de expressão diferencial de proteínas induzido pelo substrato. GONZÁLEZ-VOGEL *et al.* (2011) também chegaram a mesma conclusão ao avaliarem que a composição de complexos secretados por *Penicillium purpurogenum* estava diretamente relacionada a composição do substrato utilizado no cultivo.

Com o intuito de se investigar a composição dos complexos putativos, bandas correspondentes às regiões identificadas no gel (I, II, III e IV) foram excisadas manualmente e submetidas a digestão com tripsina, para posterior análise dos peptídeos por espectrometria de massas (LC-MS/MS). Esta etapa do experimento encontra-se em andamento, e será realizada em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (CEL/IB/UnB).

### 6.3 PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DAS MANANASES

O extrato bruto de 5 dias de cultivo de *P. fellutanum* em piolho-de-algodão sujo como única fonte de carbono foi submetido a ultrafiltração em membrana de 50 KDa. A Tabela apresenta os resultados obtidos com a concentração da atividade de mananase.

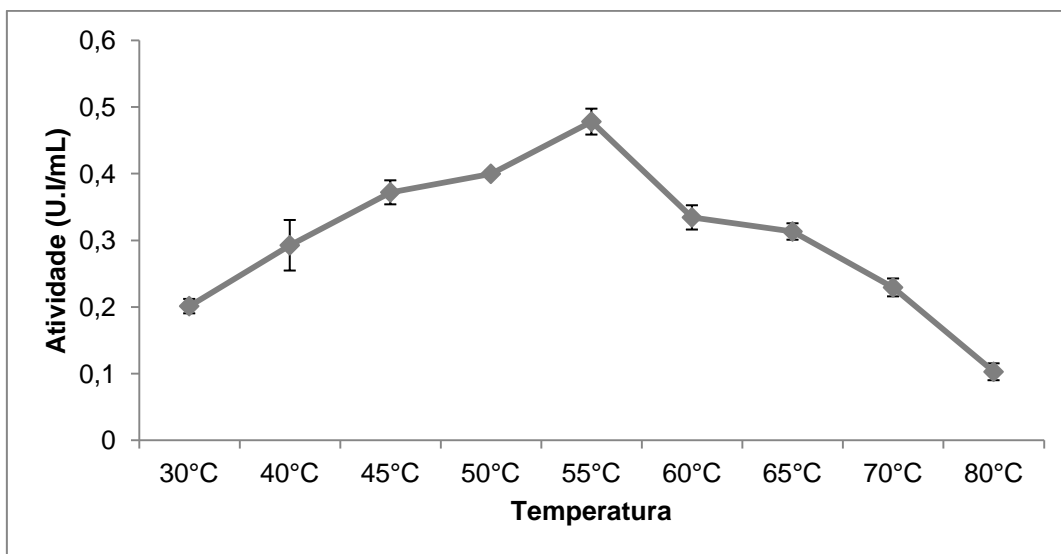
**Tabela 1.** Resultados obtidos a partir da ultrafiltração do extrato bruto de *P. fellutanum* cultivado em piolho-de-algodão sujo. Os resultados de atividade e atividade específica são acompanhados dos respectivos desvios-padrão.

Amostra	Volume (mL)	Atividade (U./mL)	Atv. Específica (U./mg)	Atividade Total (U.I)
Extrato Bruto	300	0,27±0,02	6,32±0,43	82,37
Concentrado	30	0,68±0,02	7,38±0,24	20,47
Ultrafiltrado	270	0,14±0,01	5,00±0,28	37,72

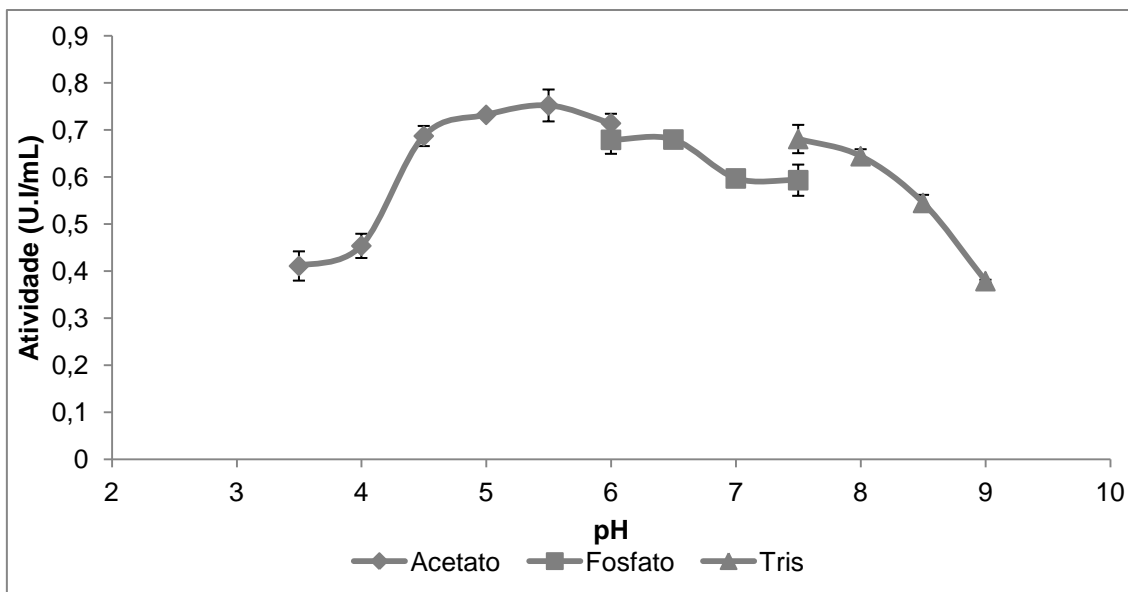
Verifica-se que cerca de 25% da atividade de mananase permaneceu retida na fração concentrada, ao passo que cerca de 46% da atividade foi permeada para o ultrafiltrado. O fato de a soma das atividades obtidas ser inferior à quantidade de atividade total presente no extrato bruto pode indicar a existência de sinergismo entre enzimas diferentes, e que foram separadas durante a ultrafiltração.

A fração concentrada apresentou atividade específica superior ao extrato bruto e à fração ultrafiltrada, e portanto, as etapas de purificação posteriores foram realizadas com esta fração.

A mananase presente no extrato bruto concentrado foi caracterizada quanto ao efeito da temperatura (Figura 17), bem como do pH (Figura 18). A atividade enzimática máxima foi observada a 55°C, e na faixa de pH entre 5 e 6.

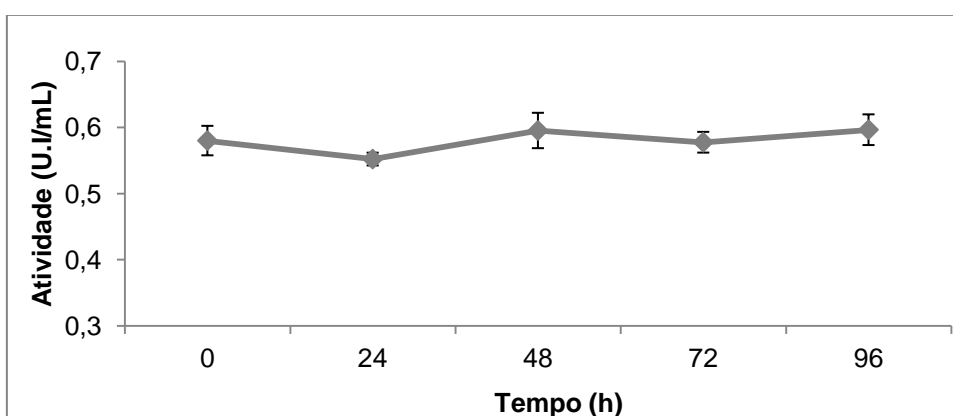


**Figura 17.** Efeito da temperatura sobre a atividade de mananase presente no extrato bruto concentrado. As barras representam os desvios-padrão.

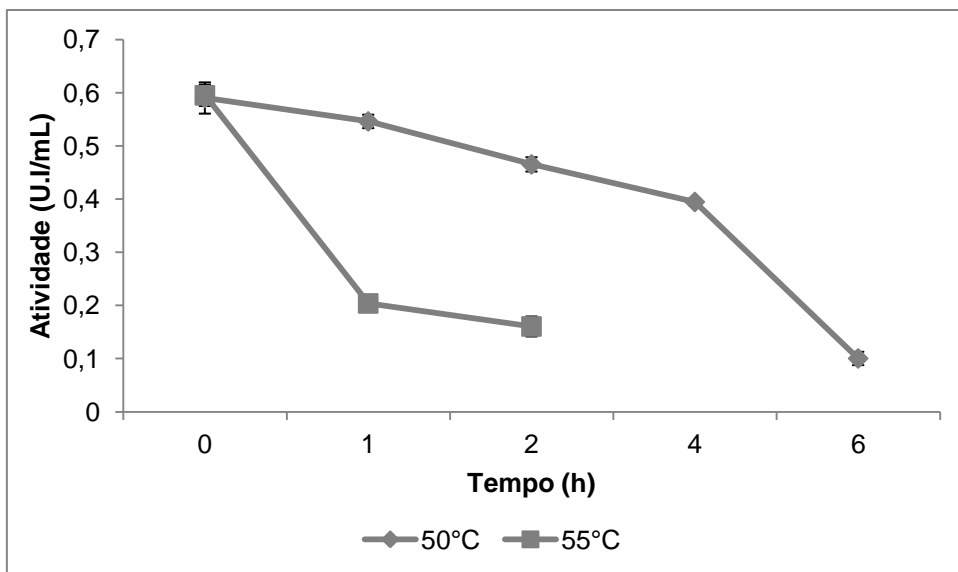


**Figura 18.** Efeito do pH sobre a atividade de mananase presente no extrato bruto concentrado. As barras representam os desvios-padrão.

A enzima teve sua estabilidade térmica avaliada em três temperaturas diferentes: 40°C (Figura 19), 50°C e 55°C (Figura 20). Os níveis de atividade foram reduzidos rapidamente a 55°C na primeira hora de incubação. A instabilidade observada na temperatura de atividade máxima pode ser explicada pelo fato de que o substrato auxilia na estabilização da enzima nestas condições, e uma vez que o substrato não se encontra presente a atividade sofre um decréscimo mais rápido (WANG *et al.*, 2012). À 50°C, os níveis de atividade alcançaram patamar inferior a 50% da atividade inicial entre 4 e 6 horas. A mananase apresentou estabilidade a 40°C, com níveis de atividade praticamente inalterados após 96 horas de incubação.



**Figura 19.** Termoestabilidade da atividade de mananase a 40°C presente no extrato bruto concentrado. As barras representam os desvios-padrão.



**Figura 20.** Termostabilidade da atividade de mananase presente no extrato bruto nas temperaturas de 50°C e 55°C. As barras representam os desvios-padrão.

O cromatograma do extrato bruto concentrado em Coluna Sephacryl S100 é apresentado na figura 21. A mananase foi eluída separadamente do principal pico de proteínas, bem como do pico de xilanase. Entretanto, houve sobreposição com a atividade de CMCase, bem como com parte do pico de pectinase. Foram consideradas para as etapas posteriores de purificação as frações 43 a 47, as quais foram avaliadas por eletroforese em SDS-PAGE. O gel e o zimograma são apresentados na Figura 22.



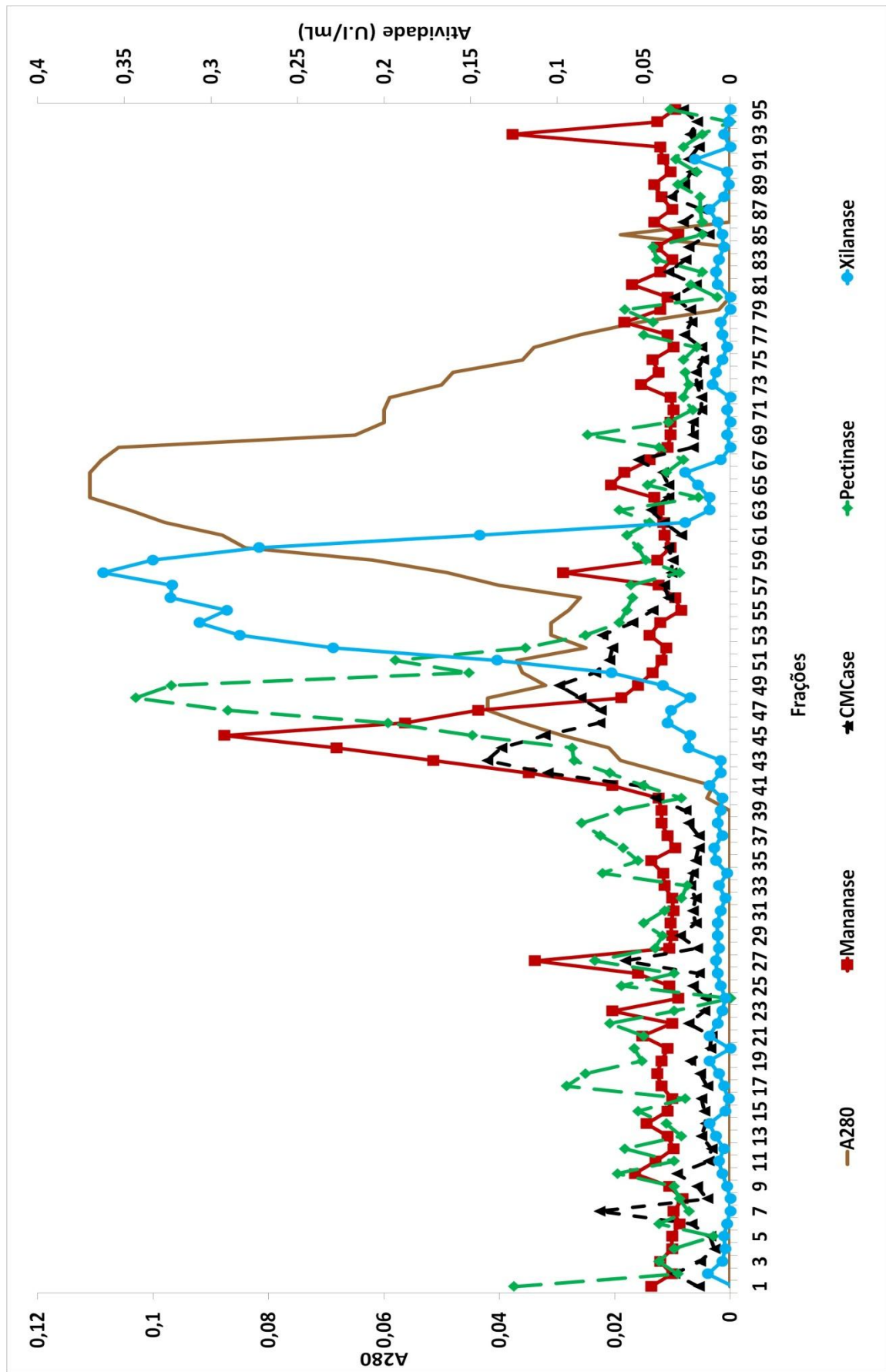
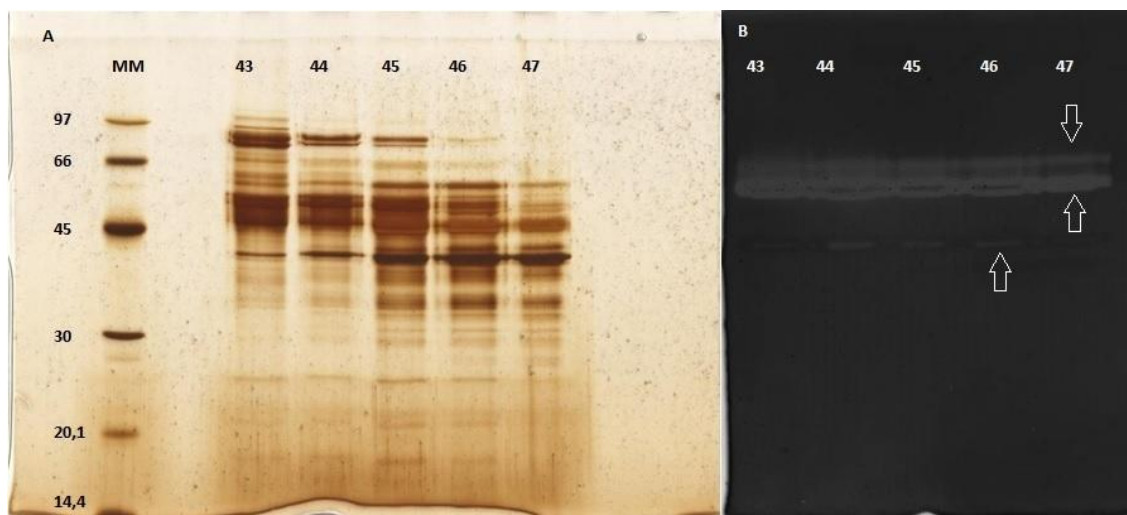


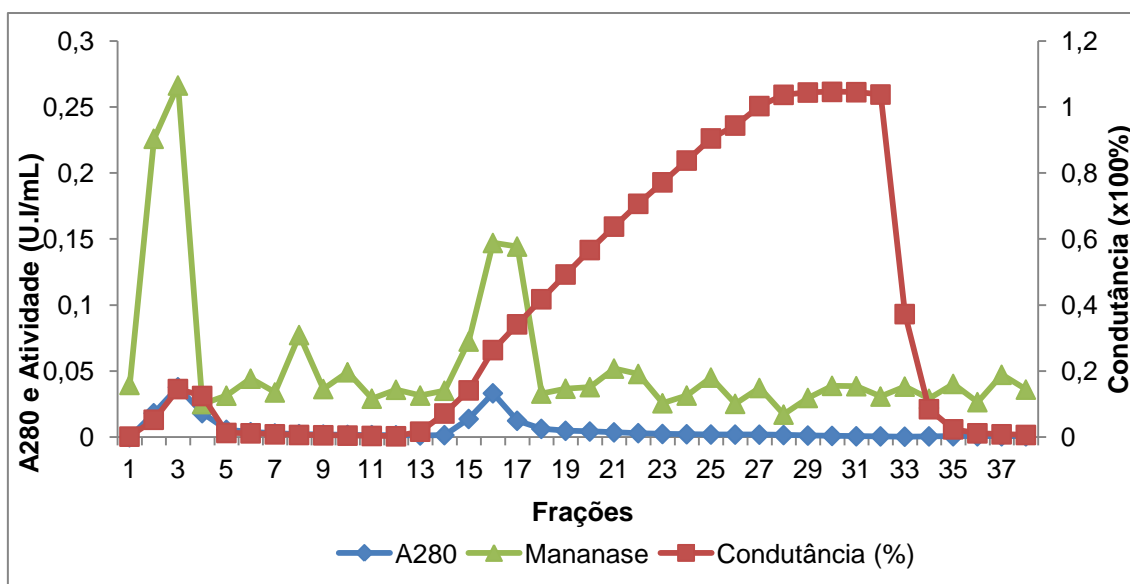
Figura 21. Cromatograma do extrato bruto concentrado aplicado em coluna Sephacryl S100.



**Figura 22.** Eletroforese SDS-PAGE (A) e zimograma (B) das frações com atividade de mananase eluídas pela cromatografia em coluna de Sephacryl S-100. As setas em B indicam as bandas correspondentes às mananases. Além da identificação das frações, são identificados também a massa molecular (em kDa) dos marcadores moleculares utilizados (MM).

Verifica-se a presença de três bandas de mananase no zimograma das frações: duas bandas de massa molecular próxima e entre 45 e 66 KDa e uma outra banda de tamanho inferior a 45KDa. BILBECH *et al.* (2010) também identificaram três mananases secretadas por *P. occitanis*. De acordo com os dados disponíveis na literatura, os tamanhos das mananases detectadas no zimograma se encontram próximos aos de outras mananases do gênero *Penicillium*. CAI *et al.* (2011a) determinaram o tamanho aparente de uma mananase de *P. pinophilum* em cerca de 65 KDa. Outro trabalho do mesmo grupo (CAI *et al.*, 2011b) relata uma mananase de *Penicillium* sp. C6 de tamanho próximo a 39 KDa. WANG *et al.* (2012), estimaram o tamanho aparente de uma mananase de *P. freii* F63 em 72 KDa.

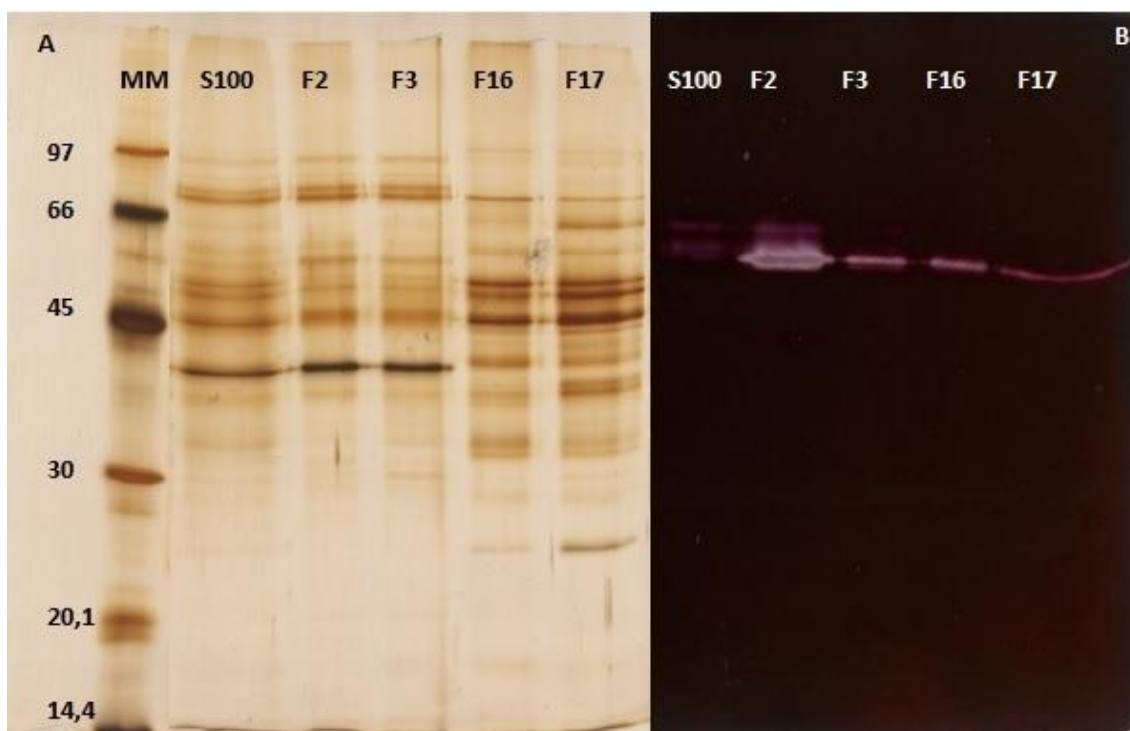
Uma vez que o nível de pureza das frações com atividade de mananase não estava satisfatório após a cromatografia em Sephacryl S-100, estas foram concentradas cinco vezes por ultrafiltração em membrana de retenção de 50KDa e aplicadas em coluna Q Sepharose Fast Flow (QFF) equilibrada com tampão Acetato de Sódio pH 5.0 e acoplada ao sistema Akta. O cromatograma desta etapa é apresentado na Figura 23.



**Figura 23.** Cromatograma das frações com atividade de mananase obtidas a partir da coluna S100 aplicadas em coluna Q Sepharose Fast Flow (QFF).

A partir da análise do cromatograma, é possível identificar dois picos contendo mananases: o primeiro pico que elui logo no início da cromatografia, compreendendo as frações 2 e 3, e outro pico que elui durante o gradiente de cloreto de sódio (entre 25-35%), compreendendo as frações 16 e 17. Ambos os picos de atividades se sobrepõem aos picos de proteína, um indicativo de que esta etapa da purificação não se mostrou eficiente. O grau de pureza das frações contendo atividade foi avaliado por SDS-PAGE e zimograma, e os resultados são apresentados na figura 24. Observa-se a presença de duas bandas com atividade de mananase nas frações 2 e 3, e apenas uma banda nas frações 16 e 17, de tamanho semelhante à uma das bandas visíveis nas primeiras frações. Verifica-se que não houve grande variação no perfil de proteínas entre a cromatografia de exclusão e a de troca iônica. Evidencia-se, inclusive, a presença de proteínas de baixa massa molecular, o que, a princípio, não seria compatível com uma amostra que foi ultrafiltrada e concentrada usando-se uma membrana de 50 kDa. Uma hipótese a ser levantada é a existência de agregação de proteínas. Tal fenômeno pode ocorrer em função de mudanças nas condições físico-químicas da solução em que se encontram as proteínas, o que ocasiona a agregação das mesmas, seja por interações covalentes ou não. Existem diversas técnicas que permitem avaliar a existência de agregados de proteínas. Uma delas é o espalhamento de luz dinâmico (DLS), que se utiliza da capacidade que partículas em solução

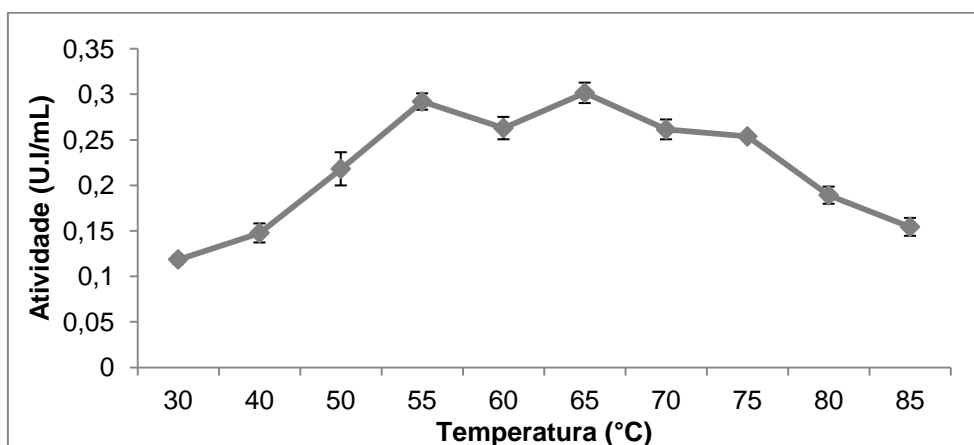
possuem de absorver e espalhar a luz para determinar o tamanho e a massa de eventuais agregados de proteínas (MAHLER *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, tal hipótese parece não proceder, uma vez que ao tampão utilizado para equilibrar a coluna S100 foi adicionado 0,15M de cloreto de sódio, com o intuito de prevenir a formação de agregados. Outros compostos químicos também podem ser utilizados para a mesma finalidade, como agentes caotrópicos, outros sais, detergentes, e agentes redutores, como o DTT e o  $\beta$ -mercaptoetanol (BONDOS & BICKNELL, 2003). O emprego de outros compostos para otimizar a separação de proteínas contaminantes será avaliado como perspectiva futura. Uma outra possibilidade é que todas estas proteínas de tamanhos diferentes estejam associadas na forma de complexos, o que justificaria a retenção de proteínas de tamanho menor durante a ultrafiltração. Essa hipótese poderia ser testada pela avaliação das amostras por uma técnica de eletroforese nativa, como BN-PAGE.



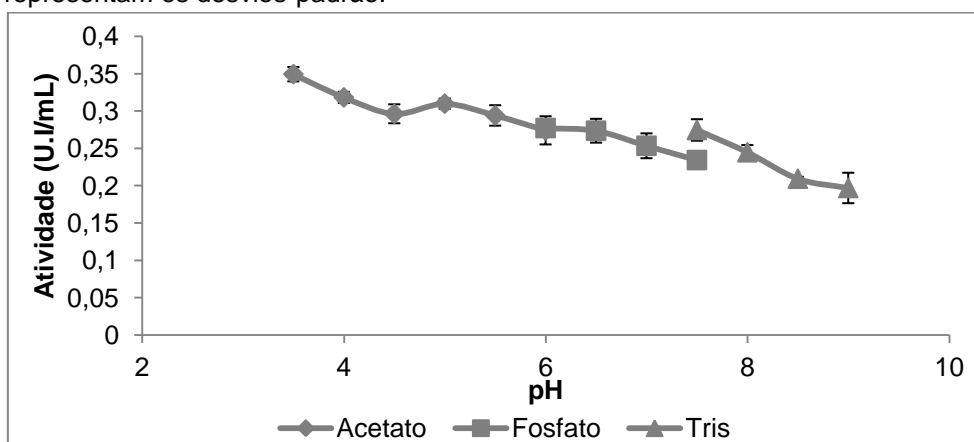
**Figura 24.** Eletroforese SDS-PAGE (A) e zimograma (B) das frações semi-purificadas de mananases obtidas por cromatografia S100, bem como por cromatografia de troca iônica em coluna aniônica QFF: frações 2 (F2), 3 (F3), 16 (F16) e 17 (F17). Além da identificação das frações, são identificados também a massa molecular (em KDa) dos marcadores moleculares utilizados (MM).

As frações 2 e 3 foram reunidas e utilizadas nas etapas posteriores de caracterização da atividade de mananase. A escolha de tais frações se baseou

principalmente no maior valor de atividade detectado. O efeito da temperatura sobre a atividade de mananase presente nas frações reunidas obtidas após a cromatografia de troca iônica é ilustrado na Figura 25. Ao contrário dos resultados obtidos para a caracterização do extrato bruto concentrado, observam-se, dessa vez, dois picos de atividade máxima, correspondentes às temperaturas de 55°C e 65°C, resultado este que reflete a presença de duas enzimas, conforme revelado pelo zimograma (Figura 24). Também houve variação quanto ao pH de atividade máxima em comparação com a amostra concentrada: 3,5 para as frações 2 e 3 contra 5-6 para a mananase presente na fração concentrada (Figura 26). Verifica-se também que os níveis de atividade se mantêm relativamente estáveis ao longo de toda a faixa ácida e neutra. As mananases fúngicas apresentam melhor atividade em condições ácidas (pH 2,9 – 6,0), e temperaturas entre 45°C e 70°C (MOREIRA & FILHO, 2008).



**Figura 25.** Efeito da temperatura sobre a atividade de mananase semi-purificada. As barras representam os desvios-padrão.



**Figura 26.** Efeito do pH sobre a atividade de mananase semi-purificada. As barras representam os desvios-padrão.

A atividade de mananase foi fortemente inibida pelos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ . A inibição pelos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , e  $\text{Hg}^{2+}$  é atribuída à interação destes metais com grupamentos sulfidríla (como os presentes nos resíduos de cisteína), bem como com resíduos nitrogenados (como lisina e histidina) associados a centros ativos de enzimas (NIEBOER & RICHARDSON, 1980). CAI *et al.* (2011a) também relataram forte inibição da atividade de uma mananase purificada de *Penicillium* sp. C6 pelos íons  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  na mesma concentração considerada neste trabalho. Os níveis de atividade aumentaram em presença de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ . Uma mananase de *P. occitanis* também foi ativada por  $\text{Ca}^{2+}$ , mas ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, os níveis de atividade foram superiores em presença de  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Tabela 2.** Efeito de íons sobre a atividade de mananase semi-purificada. Os valores de atividades são apresentados juntamente com os respectivos desvios-padrão.

<b>Íon</b>	<b>Atividade (U.I/mL)</b>	<b>Atividade relativa (%)</b>
Água (Controle)	0,17±0,01	100
NaCl	0,19±0,01	112,46
CoCl <sub>2</sub>	0,18±0,00	106,28
ZnCl <sub>2</sub>	0,15±0,01	85,12
CaCl <sub>2</sub>	0,19±0,00	112,61
CuCl <sub>2</sub>	0,08±0,01	44,33
MnCl <sub>2</sub>	0,16±0,01	92,48
SDS	0,13±0,02	75,45
AgNO <sub>3</sub>	0,00±0,00	0
KCl	0,20±0,02	118,06
MgCl <sub>2</sub>	0,17±0,00	99,80
FeCl <sub>3</sub>	0,12±0,01	69,09
HgCl <sub>2</sub>	0,07±0,00	40,01

Com relação aos compostos fenólicos avaliados, apenas o ácido cinâmico provocou inibição, com uma redução de cerca de 10% sobre a atividade. Chama a atenção o efeito ativador exercido pelo ácido ferúlico sobre a enzima, incrementando sua atividade em quase 150%. Resíduos de ácido ferúlico são substituintes laterais da xilana e são responsáveis pela associação da hemicelulose com a lignina, através de pontes diferúlicas (BUNZEL, 2009). Estas pontes são constituem um dos principais fatores responsáveis pela recalcitrância da biomassa lignocelulósica (GRABBER, 2005). Os compostos fenólicos são derivados de lignina e representam um desafio para a hidrólise da biomassa lignocelulósica, uma vez que são inibidores de diversas

holocelulases (XIMENES *et al.*, 2010). A resistência da atividade de mananase frente ao efeito inibitório da maioria dos compostos fenólicos utilizados neste estudo pode ser uma consequência da presença de outras proteínas na fração, o que propiciaria um efeito protetor das mananases dos inibidores. Por outro lado, é possível que a enzima seja realmente resistente a ação dos inibidores. Uma xilanase purificada secretada por *Aspergillus terreus* em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono apresentou sua atividade praticamente inalterada frente ao mesmo conjunto de inibidores fenólicos utilizado neste estudo (MOREIRA *et al.*, 2013). TIAN *et al.* (2013) observaram um aumento de 28% e 15% sobre a atividade de uma celulase em contato com os ácidos ferúlico e p-cumárico, respectivamente. Estes mesmos autores determinaram que os ácidos fenólicos utilizados provocaram alterações no ambiente hidrofóbico e na estrutura da enzima, bem como se associaram covalentemente a resíduos aromáticos. Mais estudos são necessários para a melhor compreensão do efeito dos compostos fenólicos avaliados sobre a atividade de mananase. Será necessário obter a(s) enzima(s) purificada(s) para que se avalie o efeito de diferentes concentrações sobre os níveis de atividade, bem como verificar o efeito de desativação, ou seja, avaliar a termoestabilidade da enzima na presença dos derivados fenólicos. A ativação das enzimas pelo ácido ferúlico é um fato interessante e merece estudos posteriores, a serem realizados assim que a purificação das enzimas for alcançada.

**Tabela 3.** Efeito de inibidores fenólicos sobre a atividade de mananases semi-purificadas.

<b>Inibidor</b>	<b>Atividade (U.I./mL)</b>	<b>Atividade relativa (%)</b>
Água (Controle)	0,14±0,01	100
Etanol 50% (Controle)	0,18±0,02	100
Ácido ferúlico	0,45±0,01	249,30
Ácido cinâmico	0,16±0,00	89,66
Ácido p-cumárico	0,23±0,00	125,26
Ácido 4-hidróxi-benzóico	0,22±0,01	123,76
Ácido tânico	0,15±0,01	106,13
Vanilina	0,16±0,00	117,47

As mananases semi-purificadas foram avaliadas quanto a especificidade frente a outros substratos (Tabela 4). Observa-se a presença de atividade de CMCase e de considerável nível de atividade de pectinase na mesma fração.

**Tabela 4.** Especificidade ao substrato das mananases semi-purificadas. São apresentadas as atividades e os respectivos desvios-padrão.

<b>Enzima</b>	<b>Atividade (U.I/mL)</b>
Mananase	0,28±0,00
Xilanase	0,00±0,00
CMCase	0,12±0,00
Pectinase	0,44±0,02

A fração contendo atividade de mananase apresentou  $K_m$  correspondente a  $1,16 \pm 0,21$  mg/mL e  $V_{m\acute{a}x}$  de  $0,312 \pm 0,015$  U.I/mL. A comparação de eficiência catalítica da mananase estudada neste trabalho com outras enzimas torna-se difícil, uma vez que não foi determinado o *turnover number*, ou  $K_{cat}$ , que representa a velocidade de conversão de substrato em produto por uma determinada quantidade de enzima. A determinação deste parâmetro só é possível quando a enzima está pura. A relação  $K_{cat}/K_m$  é considerada a melhor maneira de se avaliar a eficiência catalítica de uma enzima (NELSON & COX, 2004). Os valores de  $K_m$  encontrados neste estudo são inferiores ao de outras mananases de espécies do gênero *Penicillium* purificadas, o que representa um ponto positivo, uma vez que a enzima atinge a velocidade máxima de trabalho em uma concentração de substrato menor. CAI *et al.* (2011a) verificaram  $K_m$  correspondente a 12,3 mg/mL para a mananase de *Penicillium* sp. C6. A mananase de *P. pinophilum* C1 apresentou  $K_m$  de 5,6 mg/mL (CAI *et al.*, 2011b). A mananase de *P. freii* caracterizada por WANG *et al.* (2012) apresentou  $K_m$  de 7,8 mg/mL. O valor de  $K_m$  pode também ser um indicativo sobre as concentrações de substrato nas condições naturais de atuação da enzima. Dessa forma, enzimas que atuam em condições de altas concentrações de substrato apresentam maior  $K_m$ , sendo o contrário também verdadeiro (NELSON & COX, 2004). Tal afirmativa pode ser aplicada ao presente estudo, uma vez que o piolho-de-algodão sujo não apresenta um teor elevado de manana. AGBLEVOR *et al.* (2003) avaliaram a composição de resíduos gerados durante o descaroçamento do algodão e relataram a composição de manose em tais resíduos como sendo, em média, de 1%, e a composição de carboidratos totais em 50%. Em comparação, a casca de grão de soja, um resíduo lignocelulósico rico em manana, apresenta-se constituído por cerca de 8% deste polissacarídeo (JACKSON, 2010).



O pH da atividade máxima das enzimas semi-purificadas a partir da cromatografia de troca iônica foi de 3,5, o que confere a tais enzimas aplicação potencial no melhoramento da digestibilidade de rações animais ricas em manana. Serão necessários novos experimentos para confirmar este potencial de aplicação. Entre eles, inclui-se verificar o comportamento da atividade em condições de similares a de fluidos gástricos, ou seja, em valores de pH extremamente baixos (1,5 – 2,0) e em presença de proteases, como a pepsina (ZHAO *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos não-amiláceos presentes em rações animais são considerados fatores anti-nutricionais, uma vez que a não-digestão destes compostos resulta em transtornos para a digestão e absorção de nutrientes. Desta forma, a aplicação de enzimas exógenas tem sido utilizada com o intuito de aumentar a digestibilidade das rações. (BEDFORD, 1995).  $\beta$ -mananases apresentam-se como enzimas importantes para a alimentação animal, uma vez que a suplementação de rações com essas enzimas favorece a digestibilidade e a absorção dos nutrientes, resultando em um maior ganho de peso por parte das criações (KIM *et al.*, 2013 ; LV *et al.*, 2013).

## 7 CONCLUSÕES

- *Penicillium fellutanum* foi capaz de crescer em diversas fontes de carbono lignocelulósicas distintas, secretando holocelulases diferencialmente expressas em função do substrato;
- A partir da análise dos extratos brutos pela técnica de BN-PAGE, foi possível visualizar complexos putativos, bem como bandas de proteínas específicas ao substrato lignocelulósico de cultivo;
- As maiores atividades específicas para mananase, xilanase e pectinase foram observadas em cultivo de piolho-de-algodão sujo;
- No extrato bruto concentrado por membrana de retenção de 50 kDa foi possível detectar atividade de mananase com atividade máxima a 50°C e pH na faixa de 5,0-6,0;
- No extrato bruto, a enzima se manteve estável a 40°C por tempo superior a 96 horas ; a 50°C por 6 horas e a 55°C por 1 hora;
- Duas mananases foram parcialmente purificadas através de cromatografias de exclusão molecular (S100) e troca iônica aniônica (QFF). Na mesma fração foi possível detectar atividades de CMCase e pectinase;
- Estas enzimas parcialmente purificadas apresentaram maior atividade a 55°C e 65°C, bem como em pH 3,5;
- A atividade desta fração semi-purificada foi fortemente inibida pelos íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , e ativada por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ;
- A atividade não foi inibida pela maioria dos compostos fenólicos utilizados, e foi fortemente induzida em presença de ácido ferúlico;
- Foram encontrados  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  de  $1,16\pm 0,21$  mg/mL e  $0,312\pm 0,015$  U.I./mL, respectivamente;
- A fração com atividade de mananase apresenta potencial para aplicação como aditivo para rações animais, em função de seu caráter ácido.

## 8 PERSPECTIVAS

- Prosseguir com a purificação da(s) mananase(s);
- Identificar as bandas proteicas extraídas dos géis de BN-PAGE;
- Identificar as mananases purificadas;
- Efetuar a identificação dos produtos de hidrólise das enzimas purificadas via sistema DIONEX de cromatografia de alto desempenho;
- Avaliar a estabilidade da atividade de mananase em condições semelhantes ao ambiente gástrico, no intuito de verificar a viabilidade das enzimas como suplementos em rações animais.
- Bandas correspondentes a prováveis complexos foram excisadas do gel, digeridas com tripsina, e serão submetidas a identificação por espectrometria de massas (LC-MS/MS) (SILVA *et al.*, 2012). Uma vez que *P. fellutanum* não possui genoma sequenciado, a identificação de proteínas será realizada a partir de uma pesquisa com base em homologia e similaridade de sequências, utilizando-se o software PepNovo, seguindo-se a uma pesquisa por MS-BLAST.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEHLE, W. (Org.). *Enzymes in Industry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 490 p.

AGBLEVOR, F. A; BATZ, S.; TRUMBO, J. Composition and ethanol production potential of cotton gin residues. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 105 -108, p. 219–30, jan. 2003.

ALONSO, D. M. *et al.* Integrated conversion of hemicellulose and cellulose from lignocellulosic biomass. *Energy & Environmental Science*, v. 6, n. 1, p. 76, 2013.

ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no Processamento de Fibras Têxteis. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.). *Enzimas em Biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 179-204.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for biofuels*, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.

AZADI, P. *et al.* Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 21, p. 506-523, 2013.

BARKAI-GOLAN, R. Penicillium Mycotoxins. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. (Org.). *Mycotoxins in Fruit and Vegetables*. San Diego: Academic Press, 2008. p. 153-183.

BEDFORD, M. R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, v. 53, n. 2, p. 145–155, 1995.

BISCHOFF, K. M.; SHI, L.; KENNELLY, P. J. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, v. 260, n. 1, p. 1-17, 1998.

BLIBECH, M. *et al.* Purification and characterization of a low molecular weight of beta-mannanase from *Penicillium occitanis* Pol6. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 160, n. 4, p. 1227–40, 2010.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, v. 54, p. 519-46, 2003.

BONDOS, S. E.; BICKNELL, A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Analytical Biochemistry*, v. 316, n. 2, p. 223–231, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRASIL. Ministério do Orçamento, Planejamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Produção Agrícola Municipal*. IBGE: Rio de Janeiro. V.38, 2011. 94p.

BRUBAKER, C. L.; BOURLAND, F. M.; WENDEL, J. F. The Origin and Domestication of Cotton. In: SMITH, C. W.; COTHREN, J. T. (Org.). *Cotton: Origin, History, Technology, and Production*. New York: John Wiley & Sons, 1999. p. 3–32.

BRUMMELL, D. A; HARPSTER, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant molecular biology*, v. 47, n. 1-2, p. 311-40, 2001.

BULAJ, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology advances*, v. 23, n. 1, p. 87-92, 2005.

BUNZEL, M. Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochemistry Reviews*, v. 9, n. 1, p. 47–64, 2009.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research*, v. 344, n. 14, p. 1879-900, 2009.

CAI, H. *et al.* Acidic  $\beta$ -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 112, n. 6, p. 551–7, 2011a.

CASTRO, A. M. *et al.* Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 37, n. 2, p. 151–8, 2010.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of biotechnology*, v. 123, n. 4, p. 413-33, 2006.

CONNELLY, I. C. *et al.* Novel carbohydrase “complex” from solid-state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, n. 6, p. 470–477, jun. 1991.

COSTA, G. L.; DE MORAES, A M.; DE OLIVEIRA, P. C. Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of human tropical diseases. *Journal of basic microbiology*, v. 38, n. 5-6, p. 337-41, 1998.

COSTA, G. L.; DE OLIVEIRA, P. C. *Penicillium* species in mosquitoes from two Brazilian regions. *Journal of basic microbiology*, v. 38, n. 5-6, p. 343-7, 1998.

DIAS, J. M. C. S *et al.* *Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais*. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2012. 130 p.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Global change biology. Bioenergy*, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.

DUARTE, G. *et al.* Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. *Applied Sciences*, v. 2, n. 4, p. 754–772, 2012.

DURAN, N. *et al.* Enzimas na Indústria de Polpa e Papel. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.). *Enzimas em Biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 205-239.

EUBEL, H.; BRAUN, H.-P.; MILLAR, A. H. Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant methods*, v. 1, n. 11, p. 1–13, 2005.

FAO. *FAOSTAT Agriculture Data*. 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 10 out. 2013.

FERREIRA FILHO, E. X.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo- $\beta$ -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 11, p. 171-180, 1993.

FONTES, C. M. G. A.; GILBERT, H. J. Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry*, v. 79, p. 655–681, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GONZALEZ-VOGEL, A. *et al.* Proteomic analysis in non-denaturing condition of the secretome reveals the presence of multienzyme complexes in *Penicillium purpurogenum*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 89, n. 1, p. 145–55, jan. 2011.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GRABBER, J. H. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Science*, v. 45, n. 3, p. 820, 2005.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 419–25, set. 2011.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology*, v. 78, p. 93-113, 2000.

HINES, J. *et al.* Proteasome inhibition by fellutamide B induces nerve growth factor synthesis. *Chemistry & biology*, v. 15, n. 5, p. 501-12, 2008.

HORN, S. J. *et al.* Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for biofuels*, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in mycology*, v. 70, n. 1, p. 1–51, 15 nov. 2011.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for biofuels*, v. 4, n. 1, p. 36, 2011.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:

<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>. Acesso em 30 out. 2013.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*, v. 57, n. 6, p. 969-74, 2001.

ISHII, T.; SHIMIZU, K. Chemistry of Cell Wall Polysaccharides. In: HON, D. N.-S.; SHIRAIISHI, N. (Org.). *Wood and Cellulosic Chemistry*. 2<sup>a</sup>. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001. p. 175-215.

JACKSON, M. E. Mannanase, Alpha-galactosidase and Pectinase. In: BEDFORD, M.; PARTRIDGE, G. (Org.). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2. ed. Oxford: CABI, 2010. 319p.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JIANG, Z. Q. *et al.* Characterization of a novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, n. 7, p. 923–929, maio 2005.

JINDAL, M. *et al.* Exploring potential new gum source *Aegle marmelos* for food and pharmaceuticals: Physical, chemical and functional performance. *Industrial Crops and Products*, v. 45, p. 312-318, 2013.



JØRGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888—Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 3-4, p. 381–390, 2006.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. (Org.). *Biorefineries - Industrial Processes and Products*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 406 p. V.1.

KASHYAP, D. R. *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, v. 77, n. 3, p. 215-27, 2001.

KIM, J. S. *et al.* Effects of energy levels of diet and  $\beta$ -mannanase supplementation on growth performance, apparent total tract digestibility and blood metabolites in growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, v. 186, n. 1-2, p. 64–70, 2013.

KOBAYASHI, J.; ISHIBACHI, M. Bioactive Metabolites of Symbiotic Marine Microorganisms. *Chemical Reviews.*, v. 93, p. 1753-1769, 1993.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 377–91, maio 2008.

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

LAGAERT, S.; BELIËN, T.; VOLCKAERT, G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Seminars in cell & developmental biology*, v. 20, n. 9, p. 1064-73, 2009.

LANGE, L. The importance of fungi for a more sustainable future on our planet. *Fungal Biology Reviews*, v. 24, n. 3-4, p. 90–92, ago. 2010.

LEATHERBARROW, R.J., 1999. *Enzfitter Manual, a Non-Linear Curve Fitting Program for Windows*. Biosoft, London.

LIN, G. *et al.* Fellutamide B is a potent inhibitor of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 501, n. 2, p. 214-20, 2010.

LV, J. N. *et al.* Effects of Supplementation of  $\beta$ -Mannanase in Corn-soybean Meal Diets on Performance and Nutrient Digestibility in Growing Pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, v. 26, n. 4, p. 579–587, 2013.

LYND, L. R. *et al.* Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAHLER, H. *et al.* Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 98, n. 9, p. 2909–2934, 2009.

MARTINS, E. S. *et al.* Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 949-954, 2002.

MATTHEWS, J. F. *et al.* Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I $\beta$ . *Carbohydrate research*, v. 341, n. 1, p. 138-52, 2006.

MAZEAU, K.; HEUX, L. Molecular Dynamics Simulations of Bulk Native Crystalline and Amorphous Structures of Cellulose. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 10, p. 2394-2403, 2003.

MILANEZI, N. V. G. *et al.* Isolation and Characterization of a Xylan-Degrading Enzyme from *Aspergillus niger* van Tieghem LPM 93 with Potential for Industrial Applications. *BioEnergy Research*, v. 5, p. 363-371, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Portaria nº 630, de 30 de Março de 2004. Define conceitos e características do algodão em caroço, algodão em pluma, caroço de algodão, linter e subprodutos do beneficiamento de algodão. *Minas Gerais*, Belo Horizonte, 30 mar. 2004. 2p.

MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA FILHO, E. X. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 79, n. 2, p. 165-78, 2008.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 79, n. 2, p. 165–78, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p. 1119

NISHIYAMA, Y. Structure and properties of the cellulose microfibril. *Journal of Wood Science*, v. 55, n. 4, p. 241-249, 2009.

NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I<sub>beta</sub> from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 31, p. 9074-82, 2002.

NREL. National Renewable Energy Laboratory. 2009. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>. Acesso em 01/03/2013.

ODETALLAH, N. H. *et al.* Effect of Mannan-Endo-1 , 4- $\beta$ -Mannosidase on the Growth Performance of Turkeys Fed Diets Containing 44 and 48 % Crude Protein Soybean Meal. *Poultry Science*, v. 81, p. 1322-1331, 1997.

OHTSUKI, T. *et al.* Production of large multienzyme complex by aerobic thermophilic fungus *Chaetomium* sp. nov. MS-017 grown on palm oil mill fibre. *Letters in applied microbiology*, v. 40, n. 2, p. 111–6, jan. 2005.

OLCAY, H. *et al.* Production of renewable petroleum refinery diesel and jet fuel feedstocks from hemicellulose sugar streams. *Energy & Environmental Science*, v. 6, n. 1, p. 205, 2013.

PALANISWAMY, M.; VAIKUNTAVASAN, B.; RAMASWAMY, P. Isolation, identification and screening of potential xylanolytic enzyme from litter degrading fungi. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 11, p. 1978-1982, 2008.

PHILLIPS, C. M. *et al.* Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*, v. 6, p. 1399-1406, 2011.

RIBEIRO, D. S. *et al.* Enzymes in juice processing: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 45, n. 4, p. 635-641, 2010.

RIDLEY, B. L.; NEILL, M. A. O.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, v. 57, p. 929-967, 2001.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 279-91, 2003.

SAKAKIBARA, A.; SANO, Y. Chemistry of Lignin. In: HON, D. N.-S.; SHIRAISHI, N. (Org.). *Wood and Cellulosic Chemistry*. 2<sup>a</sup>. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001. p. 109-173.

SALES, M. D. S. N.; DA COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Isolation of fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) captured at two natural breeding grounds in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 8, p. 1107-10, 2002.

SANNIGRAHI, P.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. Cellulosic biorefineries—unleashing lignin opportunities. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, v. 2, n. 5-6, p. 383-393, 2010.

SARKAR, N. *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*, v. 199, n. 2, p. 223–31, dez. 1991.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, v. 61, p. 263-89, 2010.

SELIG, M. J. *et al.* Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresource technology*, v. 99, n. 11, p. 4997-5005, 2008.

SELIG, M. J. *et al.* The impact of cell wall acetylation on corn stover hydrolysis by cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Cellulose*, v. 16, n. 4, p. 711-722, 2009.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 12, n. 1, p. 45–60, 2012.

SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; CHEN, Y. Conversion of Cotton Wastes to Bioenergy and Value-added Products. *Transactions of the ASABE*, v. 51, n. 6, p. 2239–2246, 2008.

SHENTAL-BECHOR, D.; LEVY, Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 24, p. 8256-61, 2008.

SHIGEMORI, H. *et al.* Fellutamides A and B, Cytotoxic Peptides from a Marine Fish-Possessing Fungus. *Tetrahedron*, v. 47, n. 40, p. 8529-8534, 1991.

SILVA, A. J. *et al.* Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. *Proteomics*, v. 12, n. 17, p. 2729–38, ago. 2012.

SIQUEIRA, F. G. *et al.* The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 64, n. 1, p. 20-26, 2010.

SIQUEIRA, F. G.; FERREIRA FILHO, E. X. Plant Cell Wall as a Substrate for the Production of Enzymes with Industrial Applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 7, p. 54-60, 2010.

SOMERVILLE, C. *et al.* Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*, v. 306, n. 5705, p. 2206-11, 2004.

STEENBAKKERS, P. J. M. *et al.* Noncatalytic Docking Domains of Cellulosomes of Anaerobic Fungi Noncatalytic Docking Domains of

Cellulosomes of Anaerobic Fungi. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 18, p. 5325–5333, 2001.

THOMASSON, J. A. *A review of cotton gin trash disposal and utilization*. In: PROCEEDINGS OF THE BELTWISE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCES, 1990, Las Vegas (NV). *Proceedings...* Las Vegas: 1990. p. 689-705.

TIAN, Y.; JIANG, Y.; OU, S. Interaction of cellulase with three phenolic acids. *Food chemistry*, v. 138, n. 2-3, p. 1022–7, 2013.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, v. 6, n. 6, p. 1-23, 2007.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 91, n. 6, p. 1477-92, 2011.

VAN ZYL, W. H. *et al.* Fungal  $\beta$ -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 8, p. 1203-1213, 2010.

VARDAKOU, M. *et al.* Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 5, n. 1, p. 107-112, 2004.

VÁRNAI, A. *et al.* Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource technology*, v. 102, n. 19, p. 9096-104, 2011.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic Enzymes : Sources , Uses , and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. *Current opinion in plant biology*, v. 11, n. 3, p. 301-7, 2008.

WANG, Y. *et al.* Cloning, over-expression and characterization of an alkali-tolerant endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Penicillium freii* F63. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 113, n. 6, p. 710–4, 2012.

WENDEL, J. F.; ALBERT, V. A. Phylogenetics of the Cotton Genus ( *Gossypium* ): Character-State Weighted Parsimony Analysis of Chloroplast-DNA Restriction Site Data and Its Systematic and Biogeographic Implications. *Phylogenetics of the Cotton Genus ( Gossypium ): Character-State Weight. Systematic Botany*, v. 17, n. 1, p. 115–143, 1992.

WILLFÖR, S. *et al.* Polysaccharides in some industrially important softwood species. *Wood Science and Technology*, v. 39, n. 4, p. 245-257, 2005a.

WILLFÖR, S. *et al.* Polysaccharides in some industrially important hardwood species. *Wood Science and Technology*, v. 39, n. 8, p. 601-617, 2005b.

WILSON, C. A.; WOOD, T. M. Applied Microbiology Biotechnology The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose. p. 125–129, 1992.

WITTIG, I.; SCHÄGGGER, H. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, v. 8, n. 19, p. 3974–90, out. 2008.

XIMENES, E. *et al.* Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 3-4, p. 170–176, 2010.

YAMAGUCHI, K. *et al.* Stimulation of Nerve Growth Factor Synthesis and Secretion by Fellutamide A in Vitro. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 2, p. 195-199, 1993.

ZAMOCKY, M. *et al.* Cellobiose Dehydrogenase – A Flavocytochrome from Wood-Degrading , Phytopathogenic and Saprotropic Fungi. *Current Protein and Peptide Science*, v. 7, p. 255-280, 2006.

ZHANG, Y.-H. P. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnology advances*, v. 29, n. 6, p. 715–25, 2011.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, v. 24, n. 5, p. 452-81, 2006.

ZHAO, J. *et al.* An acidophilic and acid-stable beta-mannanase from *phialophora* sp. p13 with high mannan hydrolysis activity under simulated gastric conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 58, n. 5, p. 3184–90, 2010.

ZYKWINSKA, A. W. *et al.* Evidence for In Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. *Plant Physiology*, v. 139, n. September, p. 397-407, 2005.

ZYKWINSKA, A.; THIBAUT, J.-F.; RALET, M.-C. Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of experimental botany*, v. 58, n. 7, p. 1795-802, 2007.