



**MOISÉS FLORENCIO**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR  
NUCLEASE P1 DO FUNGO *Penicillium citrinum* THOM 1131 ATCC 14994.**

Campinas – SP

2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

MOISÉS FLORENCIO

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR  
NUCLEASE P1 DO FUNGO *Penicillium citrinum* THOM 1131 ATCC 14994.**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos exigidos para a  
obtenção do título de Mestre em Ciência  
de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação  
defendida pelo aluno Moisés Florencio e orientado pela  
Prof.(a) Dr.(a) Hélia Harumi Sato

---

Assinatura do orientador (a)

Campinas

2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

F662e Florencio, Moisés, 1982  
Estudo da produção e aplicação da enzima extracelular nuclease p1 do fungo *Penicillium citrinum* Thom 1131 ATCC 14994 / Moisés Florencio. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientadora: Hélia Harumi Sato.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Nucleases. 2. *Penicillium citrinum*. 3. Nucleotídeos. I. Sato, Hélia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of the production and application of extracelular enzyme nuclease p1 from *Penicillium citrinum* Thom 1131 ATCC 14994

**Palavras-chave em inglês:**

Nucleases

*Penicillium citrinum*

Nucleotides

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Mestre em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Hélia Harumi Sato [Orientadora]

Hevenilton Jose Matiazi

Leliane Silva Commar

Data de defesa: 25-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

## **Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
Orientador – DCA/FEA/UNICAMP

---

Dr. Hevenilton Jose Matiazi  
Membro Titular

---

Dra. Leliane Silva Commar  
Membro Titular

---

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
Membro Suplente – DEA/FEA/UNICAMP

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo  
Membro Suplente – DCA/FEA/UNICAMP



## RESUMO

A enzima nuclease P1 (E.C.3.1.30.1) hidrolisa as ligações éster de RNA na posição 3' liberando 5' nucleotídeos monofosfato (5'AMP, 5'GMP, 5'CMP e 5'UMP). Os nucleotídeos 5'IMP e 5'GMP são encontrados em carne, cogumelos, extrato de levedura e são utilizados como acentuadores de sabor em alimentos como caldo de carne, sopas desidratadas, biscoitos salgados, extratos de peixe, molhos, etc.

Foi estudada a fermentação submersa da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 visando o aumento da produção da enzima nuclease P1. Na fermentação de *Penicillium citrinum* em frascos agitados utilizando-se os meios de cultivo descritos por Guo-Qing *et. al* (2006) e Li *et. al* (2007) foram obtidos 46,93 U mL<sup>-1</sup> e 15,47 U mL<sup>-1</sup> de nuclease P1, respectivamente.

O meio de cultivo descrito por Guo-Qing *et. al* (2006) foi escolhido como base para os estudos de fermentação e produção de nuclease P1 pela linhagem *Penicillium citrinum* ATCC 14994. Foram avaliados os efeitos da concentração dos componentes glicose, peptona, farinha de amendoim, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> e ZnSO<sub>4</sub> do meio de cultura, através de delineamento fatorial incompleto (Plackett Burman) para a seleção das variáveis. Após a seleção das variáveis, foi utilizado um delineamento fatorial completo (DCCR), para os estudos dos efeitos das concentrações de peptona, farinha de amendoim e também quantidade de inóculo e do pH do meio de cultivo na produção de nuclease P1 pelo fungo. Na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 nas condições definidas pelos planejamentos experimentais, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, utilizando-se 50 mL de meio de cultivo nº3, composto por 3% glicose, 0,5% de farinha de amendoim, 0,2% de peptona, 0,03% de ZnSO<sub>4</sub> e 0,12% de CaCO<sub>3</sub> ajustado para pH 5,3 e 1 mL de suspensão contendo 10<sup>8</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, foi obtido 73,4 U mL<sup>-1</sup>, após 72 horas a 28°C e 200 rpm de agitação.

Na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em biorreator de 5 litros utilizando-se 3 litros de meio nº3, foi obtido 108,9 U mL<sup>-1</sup> de

atividade de nuclease P1, após 96 horas a 30°C, 10vvm e 300rpm. As preparações de nuclease P1 parcialmente purificadas obtidas por a) tratamento térmico a 65°C por 15 minutos, precipitação fracionada com sulfato de amônia e diálise, e b) tratamento térmico a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração tangencial com membrana orgânica de 30kDa, apresentaram atividade de 634,89UmL<sup>-1</sup> e 222,67UmL<sup>-1</sup>, respectivamente. A preparação de nuclease P1 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração tangencial com membrana de 30kDa, não apresentou a micotoxina citrinina no limite de detecção de 10ppb.

A nuclease P1 parcialmente purificada apresentou atividade ótima na faixa de 65 a 70°C e em torno de pH 5,4 - 5,5. A enzima mostrou-se estável até 70°C após 30 minutos de tratamento térmico em pH 5,4. Após 30 minutos de tratamento térmico a 75°C e 80°C em pH 5,4 a enzima reteve respectivamente cerca de 90% e 59% da atividade inicial, sendo inativada completamente após 30 minutos a 90°C em pH 5,4.

No estudo da aplicação da preparação de nuclease P1 parcialmente purificada (por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos e concentrada por ultrafiltração em membrana orgânica de 30kDa) e de nuclease comercial RP-1 (10X diluída), contendo 258UmL<sup>-1</sup>, foram obtidos respectivamente 77,3% e 58,9% de 5' nucleotídeos a partir da hidrólise da solução de 1% de RNA em tampão acetato pH 5,3 contendo 3mM de Zn<sup>+2</sup>, após 6 horas a 65°C.



## ABSTRACT

The enzyme nuclease P1 (E.C.3.1.30.1) or 5'phosphodiesterase hydrolyzes the ester bonds of RNA at position 3' releasing 5'- nucleotides monophosphate (5'AMP, 5'GMP, 5'CMP and 5'UMP). The 5'GMP and 5'IMP can be naturally found in meats, mushroom, yeast extract and they are used as flavor enhancers in foods like meat broth, dehydrated soups, salty snacks, fish extract, sauces, etc.

The submerged fermentation of *Penicillium citrinum* ATCC 14994 was studied with the purpose of increasing the production of nuclease P1. In the fermentation of *Penicillium citrinum* in shake flasks using the culture medium described by Guo-Qing *et. al* (2006) and Li *et. al* (2007) were obtained 46,93U mL<sup>-1</sup> and 15,47 U mL<sup>-1</sup> nuclease P1 activity, respectively. The medium described by Guo-Qing *et. al* (2006) was chosen as basis for studies of fermentation and production of nuclease P1 (*Penicillium citrinum* ATCC 14994).

The effects of the concentration of glucose, peptone, peanut meal, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> and ZnSO<sub>4</sub> in the culture medium components were evaluated using a fractional factorial design (Plackett Burman) for variable selection. After the selection of variables a full factorial design (CCRD) was used to study the effect of concentrations of peptone, peanut meal and inoculum and effect of pH on the production of nuclease P1 by the fungus. In the fermentation of *Penicillium citrinum* ATCC 14994 under the conditions specified by the experimental design in 500 mL Erlenmeyer flasks, using 50 mL of culture medium 3, composed of 3% glucose, 0.5% of peanut flour, 0.2 % peptone, 0.03% ZnSO<sub>4</sub>, 0.04 % CaCO<sub>3</sub> and 0.10 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, adjusted to pH 5.3, and 1 mL of suspension containing 10<sup>8</sup> spores mL<sup>-1</sup> was obtained 73.4 U mL<sup>-1</sup> after 72 hours at 28°C and 200 rpm agitation.

The fermentation of *Penicillium citrinum* ATCC 14994 in 5L bioreactors containing 3 liters of medium n° 3 yielded 108,9U mL<sup>-1</sup> of nuclease P1 activity after 96h at 30°C, 300rpm and 10vvm. The preparations of partially purified nuclease P1 obtained by a) heating at 65°C for 15 minutes, fractional precipitation with

ammonium sulfate and dialysis, and b) heat treatment at 65°C for 15 minutes and tangential ultrafiltration membrane with organic 30kDa, showed activity of 634.89 and 222.67 UmL<sup>-1</sup>, respectively.

The partially purified P1 nuclease showed optimal activity in the range 65 - 70 °C and around pH 5.4 - 5.5. The enzyme was stable up to 70°C after 30 minutes at pH 5.4. After 30 minutes at 75°C and 80° C at pH 5.4 the enzyme retained about 90% and 59%, respectively of the initial activity, being completely inactivated after 30 minutes at 90 °C at pH 5.4.

The nuclease P1 preparation obtained by heat treatment at 65°C for 15 minutes and tangential ultrafiltration membrane with a 30kDa not presented citrinin mycotoxin using detection limit of 10 ppb.

In the study of application of the preparation of nuclease P1 partially purified (by thermal treatment at 65°C for 15 minutes and concentrated by membrane ultrafiltration organic 30kDa) and commercial nuclease RP-1 (diluted 10X) containing 258UmL<sup>-1</sup> were obtained respectively 77.3% and 58.9% of 5'nucleotides monophosphate from the hydrolysis of 1% solution of RNA in acetate buffer pH 5.3 containing 3 mM Zn<sup>+2</sup>, after 6 hours at 65°C.



## INDICE

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1	5´Nucleotídeos monofosfato acentuadores de sabor .....	3
2.2	Fontes de nuclease P1 ou 5´ fosfodiesterase.....	7
2.2.1	Fontes microbianas de nuclease P1 ou 5´fosfodiesterase .....	7
2.2.2	5´- Fosfodiesterase ou nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> .....	10
2.2.3	Fontes vegetais de 5´fosfodiesterase .....	22
2.2.4	Fontes animais de 5´fosfodiesterase .....	24
2.3	Produção de 5´nucleotídeos monofosfato pela hidrólise de RNA de levedura.....	25
<b>3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1	Micro-organismo produtor de 5´fosfodiesterase .....	29
3.1.1	Reativação e manutenção da linhagem de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 .....	29
3.1.1.1	Preservação do micro-organismo por ultracongelamento - 80°C	30
3.1.1.2	Preservação do micro-organismo por liofilização.....	30
3.1.1.3	Contagem de esporos do micro-organismo antes e após ultracongelamento e liofilização .....	31
3.1.1.4	Análises de oligonucleotídeos e de PCR para caracterização da linhagem de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 .....	31
3.2	Estudo da produção de nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	33
3.2.1	Estudo da produção de nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 em incubador rotativo utilizando-se os meios de cultura nº1 e nº2.....	33
3.2.1.1	Determinação da atividade enzimática de nuclease P1 ou 5´fosfodiesterase .....	34

3.2.1.2	Determinação do crescimento celular .....	35
3.2.1.3	Determinação do consumo de glicose do meio de cultura.....	36
3.2.2	Avaliação dos efeitos dos componentes glicose, peptona, farinha de amendoim, $K_2HPO_4$ , $CaCO_3$ e $ZnSO_4$ do meio de cultura na fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1 por delineamento do tipo Plackett-Burman.....	36
3.2.2.1	Avaliação da reprodutibilidade das fermentações nas condições de maior produção de nuclease P1 obtidas no delineamento PB .....	39
3.2.3	Avaliação do efeito da concentração de peptona e farinha de amendoim no meio de cultura para a fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1 utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	39
3.2.4	Avaliação do efeito do pH do meio de cultura e da quantidade de inóculo na fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção da nuclease P1 utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) .....	41
3.2.5	Estudo da fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 em biorreator Bioflo 310 NBS utilizando-se meio de cultivo nº3 .....	43
3.3	Produção, purificação parcial e determinação de algumas características da nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	44
3.3.1	Produção de nuclease P1 .....	44
3.3.1.1	Determinação da concentração de proteínas.....	44
3.3.2	Purificação parcial da nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 .....	45
3.3.2.1	Tratamento térmico do extrato enzimático bruto .....	45
3.3.2.2	Precipitação fracionada do extrato bruto de nuclease P1 com sulfato de amônio.....	46
3.3.2.3	Ultrafiltração do extrato bruto de nuclease P1 .....	46
3.3.2.4	Avaliação da presença da micotoxina citrinina na preparação enzimática parcialmente purificada.....	47

3.3.3	Determinação de algumas características bioquímicas das preparações enzimáticas de nuclease P1 parcialmente purificadas de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	47
3.3.3.1	Temperatura ótima de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 .....	48
3.3.3.2	pH ótimo de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	48
3.3.3.3	Temperatura de estabilidade da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 .....	49
3.4	Aplicação da enzima nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 na hidrólise de RNA de levedura e produção de 5' nucleotídeos monofosfato .....	49
3.4.1	Determinação de 5' nucleotídeos monofosfato por cromatografia líquida .....	50
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>51</b>
4.1	Preservação e caracterização taxonômica da linhagem de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994 .....	51
4.2	Estudo da produção de nuclease P1 pela linhagem <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994.....	54
4.2.1	Estudo da produção de nuclease P1 pela linhagem <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994 em incubador rotativo utilizando-se os meios de cultura nº1 e nº2.....	54
4.2.2	Delineamento experimental do tipo Plackett-Burman para a seleção dos componentes do meio de cultura para fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1 .....	57
4.2.3	Avaliação do efeito da concentração de peptona e farinha de amendoim no meio de cultura para a fermentação da linhagem de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1 utilizando delineamento experimental do tipo DCCR.....	63
4.2.4	Avaliação do efeito do pH e do inóculo na fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1 utilizando delineamento experimental do tipo DCCR.....	65

4.2.5	Fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 em biorreator Bioflo 310 NBS utilizando meio de cultura otimizado .....	69
4.3	Produção, purificação parcial e determinação de algumas características da nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	70
4.3.1	Produção e purificação parcial da nuclease de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 .....	70
4.3.1	Avaliação da presença da micotoxina citrinina na preparação enzimática de nuclease P1 parcialmente purificada obtida por tratamento a 65°C por 15 minutos seguido de ultrafiltração em membrana de 30kDa.....	75
4.3.2	Características bioquímicas da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	77
4.3.2.1	Temperatura ótima de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	77
4.3.2.2	pH ótimo de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994.....	78
4.3.2.3	Temperatura de estabilidade da nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994.....	79
4.4	Aplicação da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 na hidrólise de RNA e produção de 5´nucleotídeos monofosfato.....	80
<b>5</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>85</b>

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me conceder saúde e inteligência e a minha família que sempre esteve me apoiando e sonhando junto por mais essa conquista.*





## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder saúde e inteligência para realizar mais uma conquista em minha vida.

Agradeço a meus pais que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos de minha vida, me apoiando e incentivando em meus sonhos e minhas batalhas.

Em especial agradeço a professora Hélia Harumi Sato, uma profissional dedicada e generosa que me concedeu essa oportunidade de sua orientação, possibilitando o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, em especial ao Ruann Janser Soares de Castro pelos ensinamentos, discussões e dicas importantes.

A FEA e a Unicamp pela oportunidade para a minha formação profissional e intelectual, enchendo-me de orgulho pelo trabalho desenvolvido junto de profissionais qualificados e atualizados.

A empresa Zilor - Biorigin que me concedeu essa oportunidade de desenvolvimento profissional e intelectual, em especial aos amigos de trabalho do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Biorigin que me ajudaram e muito em todas as etapas desse presente trabalho.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Nucleotídeos acentuadores de sabor 5´guanosina monofosfato (5´GMP) e 5´inosina monofosfato (5´IMP). ..... 3
- Figura 2. Hidrólise de RNA pela enzima nuclease P1 e formação de 5´nucleotídeos monofosfato. .... 6
- Figura 3. Conversão da molécula 5´AMP para 5´IMP pela ação da enzima AMP deaminase..... 7
- Figura 4. Ilustração das diferentes estruturas do gênero *Penicillium* (Machado, 2006).. 11
- Figura 5. Crescimento da linhagem *Penicillium citrinum* ATCC14994 em tubos inclinados de meio de cultura PDA, após 7 dias. .... 30
- Figura 6. Sistema de filtração tangencial Millipore modelo Pellicon TFF..... 47
- Figura 7. Produto de amplificação do material genômico de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 utilizando os iniciadores ITS4/ITS5..... 52
- Figura 8. Fragmentos obtidos da hidrólise do produto amplificado do DNA genômico de *Penicillium citrinum* ATCC 14994, com os iniciadores ITS4/ITS5, com a endonuclease Hae III. .... 53
- Figura 9. Fragmentos obtidos da hidrólise do produto amplificado do DNA genômico de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 com os iniciadores ITS4/ITS5, com a endonuclease Hinf I..... 53
- Figura 10. Estudo da cinética de fermentação e produção de nuclease P1 pela linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994, em meio de cultura nº1 descrito por Guo-Qing et. al (2006), em frascos agitados a 28°C e 200 rpm. .... 55
- Figura 11. Estudo da cinética de fermentação e produção de nuclease P1 pela linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994, em meio de cultura nº2 (Li et. al. 2007), em frascos agitados a 28°C e 200 rpm. .... 56
- Figura 12. Efeito do pH do meio de cultura e da quantidade de inóculo em volume (mL) na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 (UmL-1). .... 68
- Figura 13. Cinética de fermentação submersa do fungo *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em meio de cultura nº3 em biorreator do tipo Bioflo 310 NBS e produção de nuclease P1. .... 70

Figura 14. Certificado de ensaio de citrinina realizado na preparação enzimática de nuclease P1 obtida por tratamento a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração em membrana de 30kDa.....	76
Figura 15. Temperatura ótima de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994 em pH 5,4. ....	78
Figura 16. pH ótimo de atividade de nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994. .	79
Figura 17. Temperatura de estabilidade da nuclease P1 de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994. ....	80
Figura 18. Comparação dos cromatogramas sobrepostos da quantificação de 5' nucleotídeos monofosfato após hidrólise enzimática de solução 1% RNA pela preparação enzimática de nuclease P1 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 min e ultrafiltração e enzima comercial. ....	82

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Micro-organismos produtores de 5'- fosfodiesterase capazes de hidrolisar a molécula de RNA em 5' nucleotídeos monofosfato. .... 10
- Tabela 2. Produção de nuclease P1 por diversas linhagens de *Penicillium sp* fermentadas em meio semi-sólido de farelo de trigo (Fujimoto et. al,1977)..... 16
- Tabela 3. Valores das variáveis do primeiro planejamento PB e seus respectivos níveis codificados, para estudo dos efeitos das concentrações de glicose, peptona, farinha de amendoim,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $ZnSO_4$  no meio de cultura para a fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease p1..... 38
- Tabela 4. Valores das variáveis do segundo planejamento PB e seus respectivos níveis codificados para estudo dos efeitos das concentrações de glicose, peptona, farinha de amendoim,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $ZnSO_4$  no meio de cultura para a fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease p1..... 38
- Tabela 5. Variáveis independentes e níveis para determinação do efeito da concentração de peptona e farinha de amendoim no meio de cultura para a fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1, por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR)..... 40
- Tabela 6. Variáveis independentes e níveis para determinação dos efeitos do pH do meio de cultura e da quantidade de inóculo na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* Thom 1131 ATCC 14994 e produção de nuclease P1, por meio de delineamento composto central rotacional. .... 41
- Tabela 7. Matriz do primeiro delineamento PB de 12 ensaios e 3 pontos centrais com valores reais e codificados para estudo dos efeitos dos componentes do meio de cultura na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1. .... 58
- Tabela 8. Efeitos estimados, erro padrão, Teste t-Student e p-valor do primeiro planejamento do tipo Plackett-Burman de 12 ensaios checando curvatura, para estudo dos efeitos da concentração de glicose, peptona, farinha de amendoim,  $ZnSO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $K_2HPO_4$  no meio de cultura para a fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1..... 60
- Tabela 9. Variáveis reais e codificadas (em parênteses) do segundo planejamento do tipo PB-12 ensaios e 3 pontos centrais para estudo dos efeitos da concentração de glicose, peptona, farinha de amendoim,  $ZnSO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $K_2HPO_4$  do meio de cultura para a fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1. .... 61

Tabela 10. Efeitos estimados, erro padrão, Teste t-Student e p-valor para a atividade da nuclease P1 do segundo planejamento do tipo Plackett-Burman de 12 ensaios checando a curvatura para estudo dos efeitos da concentração de glicose, peptona, farinha de amendoim, ZnSO <sub>4</sub> , CaCO <sub>3</sub> e K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> do meio de cultura para a fermentação de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1.....	62
Tabela 11. Avaliação da reprodutibilidade da fermentação da linhagem <i>Penicillium citrinum</i> ATCC14994 na produção de nuclease P1 no meio de cultura nº3 obtida por delineamento PB.....	63
Tabela 12. Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> com as variáveis codificadas, valores reais e atividade de nuclease P1 (UmL <sup>-1</sup> ) após 72h de fermentação da linhagem de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	64
Tabela 13. Coeficientes de regressão do DCCR 2 <sup>2</sup> para determinação dos efeitos da peptona e farinha de amendoim no meio cultura para a fermentação da linhagem <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1.....	65
Tabela 14. Matriz do DCCR 22 com as variáveis codificadas e valores reais, pH final de fermentação, % de glicose residual e atividade de nuclease P1 (UmL <sup>-1</sup> ) após 72h de fermentação da linhagem de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994.....	66
Tabela 15. Coeficientes de regressão do DCCR 2 <sup>2</sup> para determinação dos efeitos do pH inicial do meio de cultura e quantidade de inóculo na fermentação da linhagem <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1.....	67
Tabela 16. ANOVA do estudo dos efeitos do pH inicial do meio de cultura e quantidade de inóculo na fermentação da linhagem <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 e produção de nuclease P1.....	67
Tabela 17. Resumo da purificação de nuclease P1 produzida por <i>P. citrinum</i> ATCC 14994.....	73
Tabela 18. Hidrólise enzimática de RNA em 5´nucleotídeos monofosfato utilizando nuclease comercial e de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 min e ultrafiltração em membrana de 30KDa.....	81

## 1 Introdução

Os primeiros estudos sobre o modo de ação da enzima nuclease P1 do fungo filamentosso *Penicillium citrinum* foram descritos em 1959 por Kuninaka *et. al.* Os autores relataram que a enzima nuclease P1 hidrolisava as ligações éster de RNA, na posição 3', liberando nucleotídeos com grupo fosfato ligado no carbono cinco da molécula de pentose.

Os nucleotídeos 5'GMP e 5'IMP são utilizados em alimentos como acentuadores de sabor e obtidos comercialmente a partir da hidrólise de RNA de levedura, sendo que a 5'IMP é obtida por transformação enzimática da molécula de 5'AMP pela adenosina fosfato deaminase (EC 3.5.4.17) (Nagodawithana, 1993).

Na indústria de alimentos os nucleotídeos 5'GMP e 5'IMP são utilizados como acentuadores de sabor em tabletes de caldo de carne, sopas desidratadas, extratos de peixe, misturas de temperos desidratados, molhos prontos, salgadinhos de milho, biscoitos salgados, etc. Na produção de ingredientes alimentícios, sua aplicação proporciona alimentos sensorialmente mais atrativos devido ao realce de sabor que conferem.

Na indústria farmacêutica os nucleotídeos podem ser usados para sintetizar medicamentos antivirais e anticâncer como acridina (Guo-Qing *et. al.*, 2004).

Os nucleotídeos 5' fosfato são utilizados também como reagentes para experimentos de laboratórios.

No mercado de produtos para nutrição humana os nucleotídeos têm sido utilizados nas formulações de leites de complementação para recém-nascidos. Segundo Pozo e Gil (2002), quantidades significativas de nucleotídeos são necessárias para a proliferação celular e outros processos biológicos do organismo humano. Apesar de não ser considerado um nutriente essencial, já que nosso organismo é capaz de sintetizá-los, alguns tecidos como o intestino



apresenta baixa capacidade de biossíntese, e dessa forma, é fundamental a suplementação externa de nucleotídeos, principalmente em situações clínicas e de rápido crescimento corpóreo.

Na produção animal os nucleotídeos são incorporados nas formulações de rações ajudando na conversão alimentar e ganhos de peso dos animais, conseqüentemente aumentando a oferta de fonte de proteína animal no mercado (Andrade *et. al* 2011).

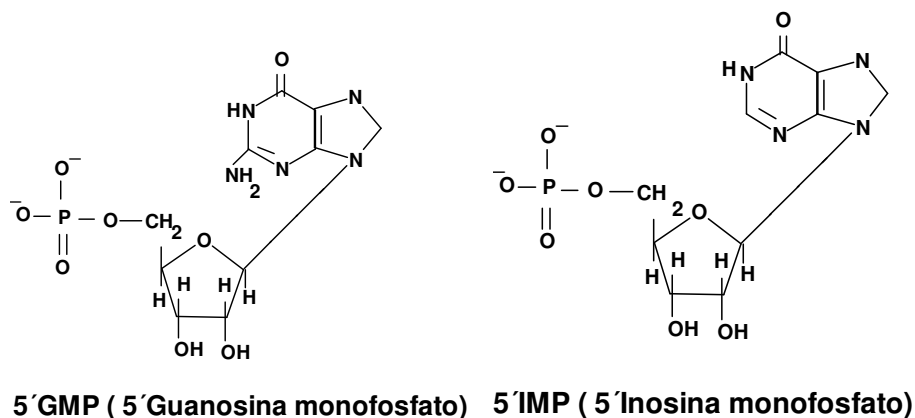
O objetivo desse trabalho foi estudar a produção da enzima nuclease P1 por fermentação submersa da linhagem de *Penicillium citrinum* Thom 1131 ATCC 14994, a purificação parcial e aplicação da enzima na obtenção de 5' nucleotídeos monofosfato a partir de RNA de levedura.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 5' Nucleotídeos monofosfato acentuadores de sabor

Segundo Ninomiya e Rozin (2007) em 1913, o pesquisador Kodama identificou o nucleotídeo 5'IMP, um composto acentuador de sabor, no peixe bonito seco (*Katsuwonus pelamis*) utilizado na culinária japonesa. Mais tarde, em 1960, o pesquisador Kuninaka, identificou a molécula de 5'GMP no cogumelo shiitake (*Lentinus edodus*). Uma vez que esses dois acentuadores de sabor foram originalmente extraídos de fonte natural, estudos foram realizados visando à produção em larga escala comercial através do uso da tecnologia de fermentações (Nagodawithana, 1995).

Os nucleotídeos 5' guanosina monofosfato (5'GMP) e 5' inosina monofosfato (5'IMP) (Figura 1) são utilizados como acentuadores de sabor em sopas, molhos, comidas prontas, enlatados, entre outros (Nagodawithana, 1995).



**Figura 1.** Nucleotídeos acentuadores de sabor 5'guanósina monofosfato (5'GMP) e 5'inosina monofosfato (5'IMP).

Estudos sobre a fisiologia sensorial da propriedade de acentuação de sabor das moléculas de 5´GMP e 5´IMP têm demonstrado que sua capacidade é superior à molécula de glutamato monosódico, conhecida no mercado de alimentos como MSG (Reed & Nagodawithana, 1991). Sendo os nucleotídeos, acentuadores de sabor mais potentes quando comparados ao glutamato monosódico, necessitam de baixas dosagens em suas aplicações nas formulações de alimentos, e não conferem qualquer modificação sensorial nas características do produto final, apenas realçando o sabor natural dos alimentos. E segundo Reed & Nagodawithana (1991), são capazes de aumentar a percepção sensorial do sal cloreto de sódio nos alimentos, e assim receitas e formulações de alimentos com teores de sódio reduzidos podem ser obtidas.

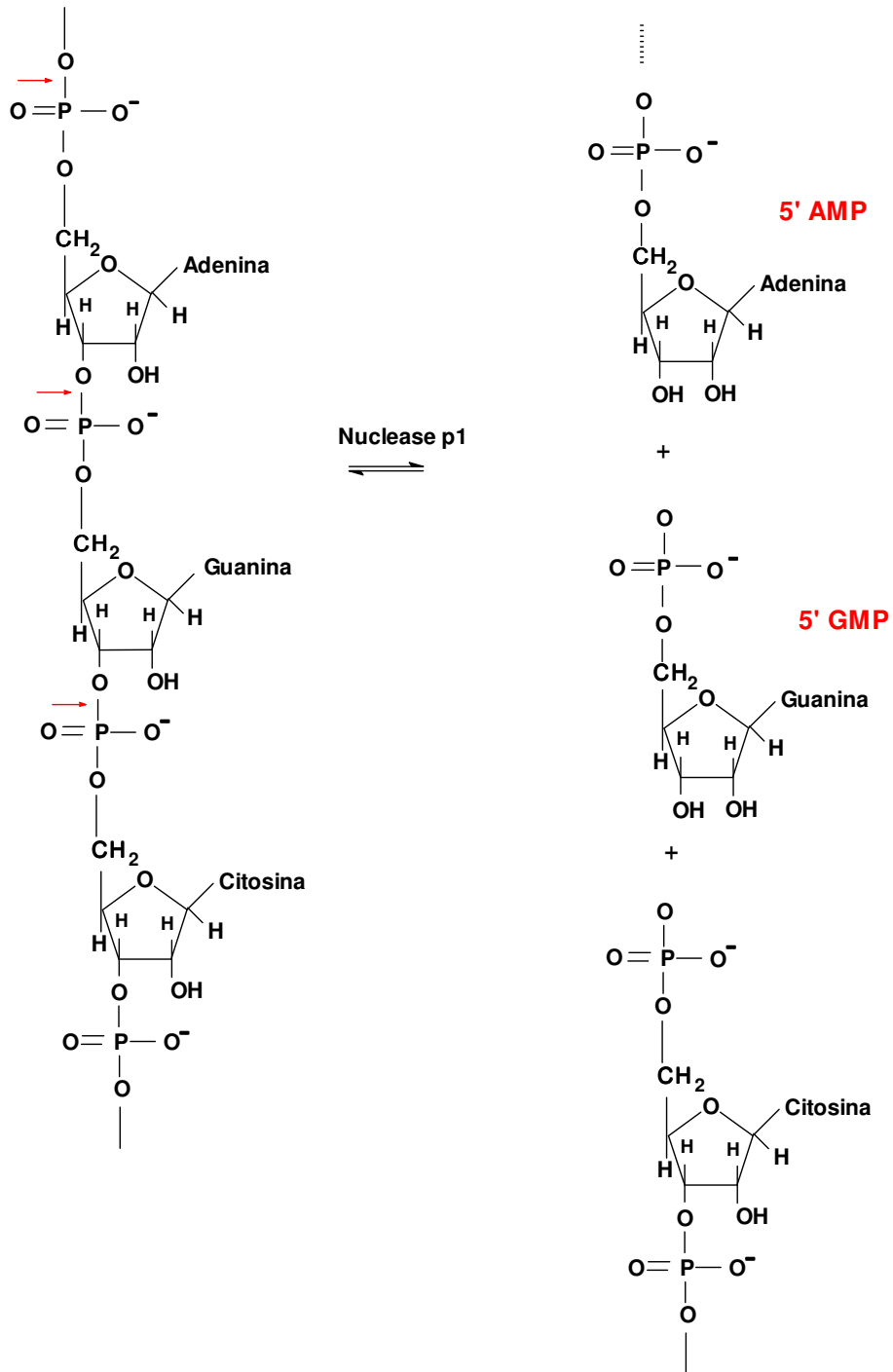
Reconhecendo o potencial comercial de aplicação desses nucleotídeos acentuadores de sabor nos alimentos, a indústria de alimentícia voltou sua atenção para o desenvolvimento de métodos de produção mais efetivos e com custos reduzidos (Reed & Nagodawithana, 1991).

Nakao (1962) avaliou que a levedura seria uma fonte potencial de RNA para obtenção de 5´nucleotídeos monofosfato. As leveduras contem cerca de 2,5 -15% de RNA em sua composição seca, além de serem reconhecidas como Generally Recognized as Safe (GRAS), e ter uma alta capacidade de produção de biomassa em larga escala. Segundo o autor a recuperação máxima de RNA da levedura é um ponto crítico do processo e pode ser realizado pelo tratamento térmico da suspensão de levedura com solução alcalina na presença de 5 - 12% de cloreto de sódio. Após centrifugação, a fração solúvel contendo o RNA pode ser neutralizada com adição de ácido, precipitando a molécula de RNA. Esse RNA precipitado pode ser utilizado como substrato para a produção de 5´nucleotídeos monofosfato. A utilização da enzima nuclease P1 para hidrolisar a molécula de RNA foi inicialmente proposta por Kuninaka *et. al* (1959) e sua aplicação industrial ocorreu no Japão (Kuninaka *et. al*, 1969).

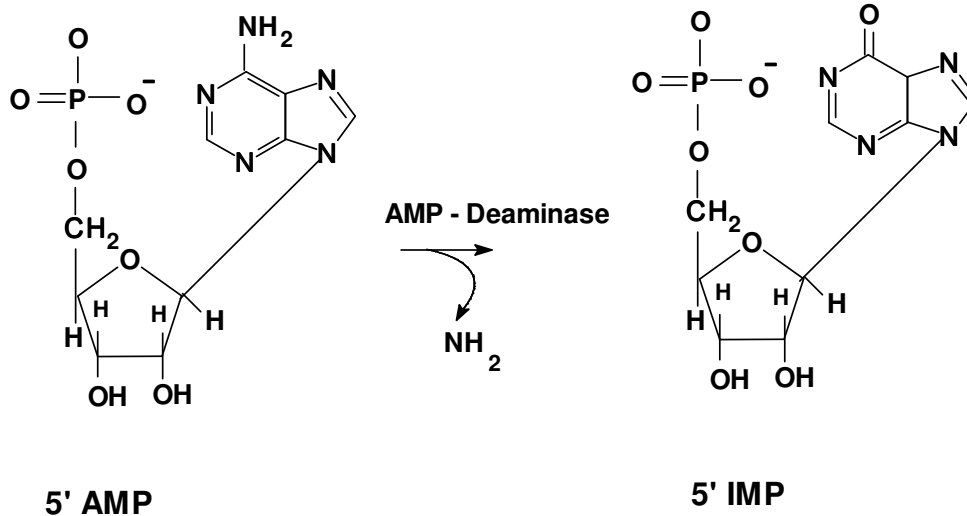
A Figura 2 ilustra a atuação da enzima nuclease P1 sobre a molécula de RNA, envolvendo a hidrólise da ligação entre o átomo de oxigênio do carbono 3' da ribose e o átomo de fósforo do carbono 5' de outra ribose e formação de 5' nucleotídeos monofosfato.

A hidrólise enzimática da molécula de RNA resulta na formação dos nucleotídeos 5'AMP, 5'GMP, 5'CMP e 5'UMP (Reed & Nagodawithana, 1991). Desses nucleotídeos formados apenas o 5'GMP tem função de acentuador de sabor. Porém, a molécula de 5'AMP pode ser convertida em 5'IMP, pela enzima AMP - deaminase (E.C 3.5.4.6) (Figura 3).

Segundo Sugita (2002) 5'IMP e 5'GMP não são higroscópicos, são estáveis em solução aquosa, porém podem ser decompostos em altas temperaturas e pH ácido. Das ligações químicas existentes nas moléculas de 5'IMP e 5'GMP, a ligação da ribose com a base nitrogenada é mais termoestável quando comparada com a ligação da ribose com o grupo fosfato sendo a base nitrogenada completamente liberada após aquecimento em solução de HCl 1M. A hidrólise enzimática também tem importância significativa na degradação dos nucleotídeos 5'IMP e 5'GMP quando aplicados em alimentos principalmente *in natura* que podem conter enzimas ativas como fosfomonoesterases, que atacam a ligação éster da molécula dos nucleotídeos acentuadores de sabor e limitam sua funcionalidade. A prática de inativação térmica ou congelamento podem inibir ou inativar as enzimas endógenas e diminuir a degradação dos nucleotídeos.



**Figura 2.** Hidrólise de RNA pela enzima nuclease P1 e formação de 5' nucleotídeos monofosfato.



**Figura 3.** Conversão da molécula 5'AMP para 5'IMP pela ação da enzima AMP deaminase.

## 2.2 Fontes de nuclease P1 ou 5' fosfodiesterase

### 2.2.1 Fontes microbianas de nuclease P1 ou 5' fosfodiesterase

Os primeiros estudos de hidrólise de ácido ribonucleico de levedura por ação enzimática produzida por micro-organismo teve início com os trabalhos de Kuninaka (1957) que utilizou como principal fonte enzimática o sobrenadante filtrado de fermentação submersa da linhagem *Aspergillus oryzae* n° 13 obtida da indústria de shôyu após 10 dias de fermentação em meio composto por 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,05% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,04%  $\text{CaCl}_2$ , 0,04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 30°C. Mais tarde Kuninaka *et. al* (1959) durante investigações sobre a hidrólise de RNA utilizando enzimas derivadas de micro-organismos identificaram uma linhagem de *Penicillium citrinum* que produzia enzimas capazes de degradar a molécula de ácido ribonucleico em nucleotídeos 5' monofostato sugerindo que essa linhagem de fungo filamentoso produzia a enzima atualmente conhecida como 5' fosfodiesterase ou nuclease P1 (EC 3.1.30.1). Os pesquisadores verificaram que a enzima foi excretada pelo micélio

do *Penicillium citrinum* após 5 dias de fermentação submersa em frascos agitados a 30°C contendo 50mL de meio de cultivo composto por 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,05% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,04%  $\text{CaCl}_2$ , 0,04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 30°C e pH 5,6. Após a incubação o micélio foi separado e o extrato enzimático bruto obtido foi incubado com uma solução de 0,5% de RNA por 22 horas e meia. Foi obtido hidrólise de 66,5% da molécula de RNA.

Fujimura *et. al* (1967) selecionaram a linhagem *Peculliararia* H-11 que apresentou destaque e grande potencial na produção de 5'fosfodiesterase extracelular após a avaliação e seleção de mais de 300 linhagens de Ascomicetos, Basideomicetos e fungos imperfeitos. O micro-organismo foi fermentado em frascos agitados de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo composto de 5% glicose, 0,25% extrato de carne, 0,5% peptona, 0,05% sulfato de magnésio pentahidratado, 0,05% cloreto de cálcio bihidratado, 0,1% sulfato de zinco heptahidratado a 30°C durante 7 dias. O extrato enzimático bruto obtido da fermentação de *Peculliararia* H-11 aplicado a uma solução de 5% de RNA, pH 6,0 a 60°C por 120 minutos apresentou a formação de 80% de 5'nucleotídeos monofosfato, comprovando a presença de 5'fosfodiesterase.

Yoneda (1964) constatou a presença de atividade extracelular de 5'fosfodiesterase no filtrado do meio de cultura de *Streptomyces aureus* após 30 horas de fermentação a 28°C em frascos agitados. O micro-organismo foi cultivado em meio de cultura composto de 4% de amido solúvel, 1% de extrato de carne, 1% peptona, 1% de extrato de levedura, 0,1% de fosfato monobásico de potássio e 3% cloreto de sódio sendo obtido 36  $\text{U mL}^{-1}$ .

Fujimoto *et. al* (1977), avaliaram 920 linhagens de fungo quanto a produção da enzima nuclease P1 capaz de hidrolisar a molécula de RNA para a produção de 5'nucleotídeos fosfato. As linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultura composto de 8 g de farelo de trigo e 5 mL de água em incubador rotativo a 28°C de 3 a 5 dias. Para a extração da enzima foram adicionados 80 mL de água esterilizada aos frascos de Erlenmeyer e os filtrados foram utilizados como preparações de enzima bruta. Entre as linhagens testadas,

o fungo *Aspergillus niger* AHU 7117 apresentou grande potencial de síntese da enzima e especificidade para essa aplicação, apresentando valores acima de 300U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>.

Gomes *et. al* (1998) avaliaram a produção de ribonucleases pelas linhagens de *Aspergillus flavipes*, *A. sulphureus* e *A. fischeri* em meio de cultura semi sintético composto por 5% de glicose, 0,5% de extrato de carne, 0,2% de extrato de levedura, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,01% de cloreto de cálcio, 0,02% de nitrato de potássio, e 0,5% de farelo de soja. Os autores observaram que após 96h de fermentação em incubador rotativo a 30°C as linhagens de *Aspergillus flavipes* e *A. sulphureus* apresentaram 60U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> e 50U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> de 5´ fosfodiesterase respectivamente, enquanto a linhagem de *A. fischeri* apresentou apenas cerca de 7U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>.

Steensm *et. al* (2004) relataram a produção de 5´- fosfodiesterase pelo fungo *Leptographium procerum* isolado de seiva de pinheiro. Esse fungo é considerado um fito patogênico oportunista, porém não há relatos na literatura de qualquer ocorrência de malefícios para a saúde do ser humano e animais. O fungo foi isolado e submetido à mutação clássica e técnicas seletivas (não citadas pelo autor) para aumentar sua capacidade de síntese da enzima. Nesse trabalho os autores não relataram as condições de cultivo e a composição do meio de cultura para fermentação do fungo, apenas citaram as etapas de purificação como o emprego de ultrafiltração, cromatografia de troca iônica seguida de eluição utilizando solução de 2M NaCl, sem mais detalhes. A enzima purificada apresentou 3240U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>. Os autores relataram que a enzima purificada produzida pelo micro-organismo *Leptographium procerum* está sendo utilizado na aplicação na indústria de alimentos pela empresa DSM há mais de 30 anos tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial.

A Tabela 1 ilustra micro-organismos produtores de 5´fosfodiesterase capazes de hidrolisar o RNA em 5´nucleotídeos monofosfato (Nakao, 1962).



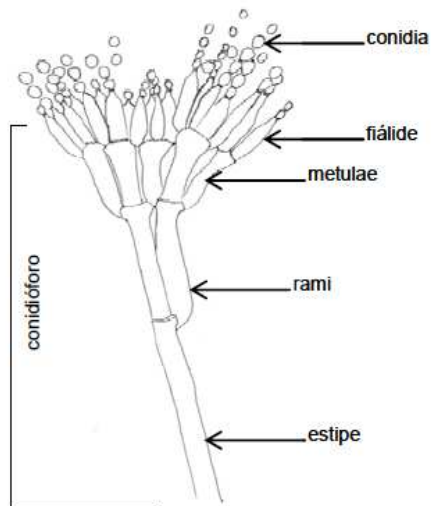
**Tabela 1.** Micro-organismos produtores de 5'- fosfodiesterase capazes de hidrolisar a molécula de RNA em 5' nucleotídeos monofosfato.

Micro-organismos	Referências
Fungos	
Ascomycetos	
<i>Aspergillus</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Chaetomidium</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Glomerella</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Monascus</i>	Saruno <i>et al.</i> (1964)
<i>Neurospora</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Penicillium</i>	Kuninaka <i>et al.</i> (1959)
<i>Sordaria</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
Fungos Imperfeitos	
<i>Acrocyndrium</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Fusarium</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Gliomastix</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Helminthosporium</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Phoma</i>	Tone <i>et al.</i> (1964) e
<i>Verticillium</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
Basideomicetos	
<i>Pellicularia</i>	Hasegawa <i>et al.</i> (1964)
Actinomicetacea	
<i>Streptomyces</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Streptomyces</i>	Yoneda (1964)
Bactéria	
<i>Bacillus</i>	Ogata <i>et al.</i> (1963)
<i>Micrococcus</i>	Berry and Campbell
Levedura	
<i>Rhodotorula</i>	Nakao <i>et al.</i> (1963)

#### 2.2.25' - Fosfodiesterase ou nuclease P1 de *Penicillium citrinum*

*Penicillium citrinum* é um fungo filamentosos da classe dos Ascomycetos (Figura 4), comum e amplamente distribuído na natureza, podendo ser considerado como a forma de eucarioto mais encontrado na face da terra (Pitt 1979). Essa espécie tem sido isolada de vários substratos presentes na natureza, solo, cereais (tropicais), pimentas, entre outros (Samson & Frisvad, 2004).

No gênero *Penicillium*, os esporos assexuais produzem numa estrutura típica do gênero, designada de penicillus (pl. penicilli, que em latim significa pincel). Os conídios nascem em cadeias produzidas pelas fiálides. As fiálides estreitam no ápice, e o pescoço designa-se collula (pl. collulae). As fiálides estão em verticilos no estipe, e assentam nele diretamente ou com a intervenção de células de suporte especializadas conhecidas por metulae e rami (Figura 4). O penicillus é toda a estrutura suportada pelo estipe. O conjunto do penicillus e do estipe é denominado por conidióforo. Os conídios são em regra geral, de cor verde, as fiálides têm pescoços curtos e paredes lisas (Machado, 2006).



**Figura 4.** Ilustração das diferentes estruturas do gênero *Penicillium* (Machado, 2006).

A maioria das espécies de *Penicillium* são saprófitos oportunistas, não são muito exigentes nutricionalmente e toleram grandes variações nas condições físico-químicas como atividade da água, temperatura, pH e potencial redox conferindo-lhes grande capacidade de crescer em qualquer meio ambiente, onde exista um mínimo de sais minerais ou as mais diversas e complexas formas de carbono orgânico (Pitt & Hocking, 1997).

O fungo *Penicillium citrinum* é capaz de produzir a micotoxina citrinina. A citrinina (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>) é um metabólito fúngico secundário, isolado pela primeira vez em 1931 de cultivos de *Penicillium citrinum*, que causa nefropatia micotóxica suína em animais alimentados com rações contendo cereais contaminados com esse fungo (Norberg & Serra-Freire 1993). Jackson & Ciegler (1978) demonstraram a produção de citrinina em grãos de milho em frascos de laboratório e demonstraram a capacidade de duas linhagens de *P. citrinum* NRRL 5907 e 5927 de produzirem citrinina após 21 dias a 25°C chegando a quase 3g de citrinina por quilograma de milho. Montani *et. al* (1988) estudaram a influência da temperatura e taxa de crescimento do *Penicillium citrinum* isolado de milho na formação da citrinina. O fungo foi cultivado em meio Czapek agar contendo extrato de milho, em temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C. O crescimento radial em placa e a formação da citrinina foram maiores quando cultivados em temperatura de 30°C. Davis *et. al* (1975) estudaram a produção de citrinina na fermentação do fungo *Penicillium citrinum* AUA 532 em meio de cultura contendo 4% glicose e 2% de extrato de levedura no meio de cultivo a 30°C após 21 dias e verificaram a formação de 1,75g/L de citrinina na fase estacionária.

Kuninaka *et. al* (1961) descreveram que a 5'-fosfodiesterase de *Penicillium citrinum* Thom 1131 é uma enzima extracelular, excretada pelo micro-organismo uma vez que foi observado atividade enzimática semelhante tanto no micélio quanto no sobrenadante fermentado. As condições e o meio de cultivo utilizado foi idêntico ao utilizado em seu trabalho anterior (1957) composto 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,05% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,05% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,04% CaCl<sub>2</sub>, 0,04% MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O a 30°C e pH 5,6 por 6 dias, porém, os autores avaliaram a possibilidade de outras fontes de carbono (amido, sacarose, xilose, glicose e melação) e nitrogênio (sulfato de amônia, peptona e ureia) no meio de cultivo e verificaram que a peptona é indispensável para a síntese de 5'-fosfodiesterase, mesmo utilizando outras fontes de carbono, que não a glicose, apenas interferindo na velocidade de síntese da enzima. Os pesquisadores observaram que uma concentração limitada de carbono no meio padrão descrito acima, ou seja, utilizando apenas 1% de glicose, proporcionou um aumento significativo do pH

durante a fermentação, principalmente quando ocorreu todo o consumo da glicose do meio. Foi observado redução drástica da atividade de 5'fosfodiesterase após 3 dias de fermentação, atingindo o pH do meio de cultivo acima de 7,0. Para a produção da enzima 5'fosfodiesterase ou nuclease P1, os autores conduziram uma fermentação em frascos agitados durante 6 dias nas condições e meio de cultivo descrito acima. Uma alíquota de 1200mL do sobrenadante separado do micélio foi concentrado à vácuo e em seguida dialisado para volume final de 60mL. Em seguida foi adicionado 240 mL de etanol e o precipitado foi separado por centrifugação. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e seco em dissecador, sendo obtido 1,2g de enzima parcialmente purificada. Os autores verificaram que o pH e temperatura ótima de atividade da enzima parcialmente purificada foi 5,0 e 65°C, respectivamente. A termo estabilidade da enzima foi avaliada em tampão 0,026M de acetato veronal pH 5,7 após imersão em água em ebulição por 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos e os valores de atividade residual de 5-fosfodiesterase foram 87,8%, 70,2%, 59,7%, 52,7%, 35,1% e 26,3% respectivamente.

Fujimoto *et. al* (1974) descreveram a produção da nuclease P1 utilizando a linhagem mutante de *Penicillium citrinum* VI-10-14 modificada por Uchida e Yoshino (1961) utilizando radiação ultravioleta. Para preparar o inóculo, o fungo foi cultivado em meio de cultura composto de 26g de farelo de trigo, 9g de palha de arroz e 15 mL de água a 20°C por 10 dias. Dez gramas desse inóculo foram utilizados para serem espalhados em bandejas contendo 660g de farelo de trigo misturados com 400 mL de água. O micro-organismo foi incubado por 96 horas, sendo as 24 horas iniciais a 30°C e as horas restantes a 20°C. O autores detectaram a máxima produção de 5'- fosfodiesterase após 4 dias de fermentação. Para a determinação da atividade enzimática 0,2mL de solução de RNA (5mg/mL) em tampão acetato veronal pH 5,3 adicionado de 0,1mL solução enzimática foi incubada a 37°C por 15 minutos. Para a paralisação da reação foi adicionado 1mL de solução gelada de 0,25% de uranil acetato em 2,5% ácido perclórico e mantido em banho a 0°C por 20 minutos. O precipitado formado foi separado por centrifugação a 3000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi diluído

três vezes com água e a Abs 260nm foi medida contra um branco, preparado substituindo-se a enzima por água deionizada. Os autores utilizaram para a quantificação da formação de nucleotídeos livres o coeficiente de extinção molar de 10.600 para esse comprimento de onda, definindo a unidade da atividade de 5'fosfodiesterase ou nuclease P1 pela formação de 1,0 $\mu$ mol de nucleotídeos solúveis formados em 1 minuto a 37°C. Os autores obtiveram atividade enzimática igual a 4,5U $mL^{-1}$ . Nesse mesmo trabalho os autores realizaram sucessivas etapas de purificação da 5'fosfodiesterase ou nuclease P1 partindo de 50 litros de sobrenadante obtido conforme descrito acima, utilizando 20kg de farelo de trigo e 60kg de água potável. A primeira etapa de purificação realizada pelos autores foi a precipitação com sulfato de amônio com 90% de saturação seguida de diálise com água deionizada. Em seguida foi adicionado cloreto de zinco à solução de enzima dialisada para uma concentração final de 7x10<sup>-3</sup> Molar e a solução foi submetida a tratamento térmico a 63°C por 15 minutos. A solução enzimática foi submetida a fracionamento com sulfato de amônio com 40% e 80% de saturação e diálise dos precipitados com água deionizada. Em seguida a enzima foi precipitada com acetona a - 10°C e o precipitado foi dialisado com tampão acetato pH 6,0. A enzima foi purificada por filtração em gel em coluna Sephadex G100 e cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-celulose. A enzima purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C sem perdas significativas de atividade por um período de 2 anos. Exaustivas digestões utilizando a enzima purificada foram realizadas pelos autores utilizando 20mg de RNA diluído em 2mL de tampão acetato veronal pH 5,3 a 50°C, sendo obtido 5'CMP, 5'UMP, 5'AMP e 5'GMP.

Em seguida Fujimoto *et. al* (1975) descreveram a caracterização físico-química da nuclease p1 purificada liofilizada de *Penicillium citrinum*. A massa molecular da nuclease P1 foi estimada em 42 a 50kDa. Foi verificado que a nuclease P1 contém 3,0 g de átomo de zinco por mol sendo caracterizada como uma metaloenzima e apresenta também cerca de 17,4% de carboidratos em sua estrutura, na forma de manose, galactose e glucosamina numa proporção de 6:2:1, respectivamente.

Fujimoto *et. al* (1977) relataram que a nuclease P1 ou 5'- fosfodiesterase é amplamente distribuída entre diversas espécies do gênero *Penicillium* como *P. expansum*, *P. notatum*, *P. steckii* e *P. meleagrinum*. Os autores descreveram a produção de nuclease P1 por diferentes linhagens de *Penicillium* obtidas do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Tokyo. A fermentação semi sólida foi realizada em frascos de 200mL contendo o meio estéril composto de 5 mL de água e 8g de farelo de trigo. Nas primeiras 48 horas a fermentação foi realizada a 28°C e após esse período até 96 horas de fermentação a temperatura foi mantida a 20°C. Após a fermentação uma quantidade de 80 mL de água estéril foi adicionada em cada frasco para a extração da enzima, seguida de filtração para separação do material insolúvel do meio. Uma quantidade de 20 mL de cada meio filtrado das diferentes linhagens estudadas de *Penicillium* foi separada para purificação parcial da enzima utilizando sulfato de amônio 90% de saturação. Após um período de 2h a 5°C, o precipitado foi removido por centrifugação e submetido a diálise por uma noite a 5°C. Esse extrato dialisado foi utilizado como fonte da enzima 5'fosfodiesterase ou nuclease P1. A mensuração da atividade enzimática foi realizada conforme descrito em seu trabalho prévio (Fujimoto *et. al*, 1974) e constatou-se que dentre as linhagens estudadas a linhagem de *Penicillium citrinum* Thom 1131 foi a que apresentou o maior potencial de produção de 5'fosfodiesterase ou nuclease P1 (Tabela 2).

Fujimoto *et. al* (1977) relataram que a nuclease P1 é uma metaloenzima e o átomo de zinco em seu sítio ativo tem papel fundamental na ativação da enzima, conformação e estabilidade térmica. Rokugawa *et. al* (1980) verificaram que retirando-se um dos átomos de zinco da estrutura da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* a atividade da enzima sobre o substrato RNA reduziu 50% e após tratamento térmico da enzima a 65°C por 15 minutos diminuiu 80,4%.

**Tabela 2.** Produção de nuclease P1 por diversas linhagens de *Penicillium sp* fermentadas em meio semi-sólido de farelo de trigo (Fujimoto et. al,1977).

<b>Linhagens</b>	<b>Atividade de nuclease P1 (unidades/mL)</b>
<i>P. citrinum</i> Thom 1131	4530
<i>P. citrinum</i> Thom NRRL 805	2080
<i>P. citrinum</i> Thom NRRL 1841	2053
<i>P. meleagrinum</i> IAM 7161	2330
<i>P. expansum</i> IAM 7229	2150
<i>P. janthinellum</i> IAM 7018	1630
<i>P. aculeatum</i> IAM 7120	1020
<i>P. melini</i> IAM 7250	860
<i>P. atramentosum</i> IAM 7230	1250
<i>P. steckii</i> IAM 7048	1090
<i>P. viridi-cyclopium</i> IAM 7057	1280
<i>P. nigricans</i> IAM 7218	1040
<i>P. notatum</i> IAM 7168	1720
<i>P. herquei</i> IAM 7239	1450
<i>P. concavo rugulosum</i> IAM 7195	1430
<i>P. martensii</i> IAM 7237	920
<i>P. navaezeelandiae</i> IAM 7274	760
<i>P. roqueforti</i> IAM 7273	730
<i>P. viridicatum</i> IAM 7043	760
<i>P. oxalicum</i> IAM 8046	600
<i>P. canescens</i> IAM 7186	704
<i>P. miczinskii</i> IAM 7165	519
<i>P. caseicolum</i> IAM 7358	691
<i>P. piscarium</i> IAM 7130	1625
<i>P. simplicissimum</i> IAM 7070	769
<i>P. corymbiferum</i> IAM 7263	128
<i>P. cyclopium</i> IAM 7146	172
<i>P. decumbens</i> IAM 7278	106
<i>P. echinulonalgiovense</i> IAM 7177	330
<i>P. felutanum</i> IAM 7287	160
<i>P. ochro-chlron</i> IAM 7099	365
<i>P. urticae</i> IAM 7205	78

Li Tao (1993) avaliou o efeito dos componentes do meio de cultivo na produção da nuclease P1 por fermentação submersa da linhagem *Penicillium citrinum* AS 3.2788. O autor utilizou meio de cultura quimicamente definido para ter um melhor controle da composição. Foi testado o efeito da concentração de sacarose (3 a 7%) como fonte de carbono, nitrato de sódio (0,2 a 0,6%) como

fonte de nitrogênio e fosfato monobásico de potássio (0,5 a 1,5%) como fonte de fósforo no meio de cultivo na produção de nuclease P1. Além desses três componentes foram incluídos ao meio de crescimento 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,02% de sulfato de zinco heptahidratado, 0,15% de sulfato de ferro heptahidratado e 0,01% de cloreto de cálcio bihidratado. O pH inicial do meio de cultura foi corrigido para 6,0. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 28°C e 200rpm durante 96 horas. Foi utilizado um planejamento fatorial 3<sup>3</sup> para verificar as interações e efeitos entre os componentes do meio de cultivo e propor um modelo descritivo utilizando o programa estatístico Statistex 1.1. Na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* AS 3.2788 no meio de cultura composto por 5% de glicose, 0,5% peptona, 0,05% fosfato monobásico de potássio, 0,05% fosfato bibásico de potássio, 0,02% de sulfato de zinco heptahidratado, 0,04% de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,04% cloreto de cálcio a 28°C, 300 rpm de agitação, 1,8 vvm de ar durante 72 horas de fermentação foi observado que o crescimento celular atingiu o máximo após cerca de 36 horas. A síntese de nuclease P1 iniciou no final da fase de crescimento e na determinação da atividade enzimática atingiu valores de absorvância a 260nm igual a 1.2 a 1.4 após 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. Nesse trabalho, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito por Fujimoto *et. al* (1974). A absorvância a 260nm dos nucleotídeos livres formados na mistura da reação, após remoção do RNA íntegro não hidrolisado, foi usada como medida da atividade da nuclease.

Zhu *et. al* (1996) estudaram a produção da nuclease P1 por *Penicillium citrinum* ATCC14994 em frascos de Erlenmeyer, por fermentação submersa, fermentação semi-sólida utilizando poliuretano como carreador inerte e fermentação sólida, utilizando farelo de trigo. O meio de cultura para a fermentação submersa era composto por 50g de glicose, 5g de peptona, 0,5g de fosfato bibásico de potássio, 0,4g de cloreto de cálcio e 0,4g de sulfato de magnésio, por litro de meio. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados a 26°C por 120 horas. Na fermentação sólida, frascos de Erlenmeyer de 300mL contendo o meio previamente esterilizado composto por 10g de farelo de trigo e 6 mL de



água destilada contendo  $5 \times 10^7$  esporos/ g de substrato foram incubados a 26°C por 120 horas e 97% de umidade relativa. Na fermentação do fungo utilizando-se a técnica de suporte inerte com poliuretano foi utilizado o meio de cultura composto de 25g glicose, 10g de amido solúvel, 7,40g de peptona, 3,70g de fosfato bibásico de potássio, 3,70g de fosfato monobásico de potássio, 0,618g de cloreto de cálcio, 29mg de sulfato de ferro, 99 mg de sulfato de zinco, 4,10 de tiamina, 1,83mg de riboflavina, 136mg de nicotinamida, 6,37mg piridoxina, 7,26 mg de  $\alpha$ -tocoferol, 588 $\mu$ g ácido fólico, 10,9 mg de ácido pantotênico e 63,7 $\mu$ g de biotina por 100g de suporte inerte, descrito por Zhu *et. al* (1992). A atividade da nuclease P1 foi mensurada utilizando solução de 1% de RNA em tampão acetato 0,125M com 3mM  $Zn^{+2}$  como substrato conforme descrito por Fujishima *et. al* (1972). A atividade de nuclease P1 foi expressa como a medida da absorbância a 260nm da mistura da reação após a remoção do RNA não hidrolisado. Na fermentação do fungo *Penicillium citrinum* ATCC14994 em frascos Erlenmeyer agitados, fermentação sólida em farelo de trigo e fermentação utilizando suporte de poliuretano obtiveram 0,818, 49,2 e 430 de atividade de nuclease por grama de substrato, respectivamente.

Tavares *et. al* (1998) propuseram a produção da enzima nuclease P1 utilizando *Penicillium citrinum*, aliada a depuração biológica utilizando como um dos componentes do meio o resíduo líquido da indústria de processamento de suco de laranja, denominada água amarela, que contem fontes de proteínas, óleos essenciais, pectinas, açúcares, ácidos orgânicos, sais minerais. Além desse componente os autores utilizaram a suplementação com 0,2% de nitrato de potássio, 0,4% de cloreto de cálcio, 0,4% de sulfato de magnésio e 1 mL solução de micronutrientes para um volume de meio de 50mL. A fermentação submersa foi conduzida a 28°C por 120 horas. Foi obtido cerca de 5  $U mL^{-1}$  de atividade da nuclease P1.

Guo-Qing *et. al* (2006) descreveram a produção da nuclease P1 utilizando uma linhagem de *Penicillium citrinum* por fermentação submersa. Inicialmente o fungo foi cultivado em meio denominado cultura mãe composto por 3% de

sacarose, 0,10% de fosfato bibásico de potássio, 0,01% de sulfato de ferro, 0,30% de nitrato de sódio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de cloreto de potássio e 20% de caldo de batata dextrose (Potato Dextrose Broth, Marca Acumedia, código 7585A), a 30°C, pH 7,0 por 24 horas. Em seguida 10 mL dessa cultura mãe, foi adicionada a frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL do meio de cultura de produção da enzima contendo 6% de glicose, 0,2% de peptona, 0,5% de farelo de amendoim, 0,03% de sulfato de zinco, 0,04% de carbonato de cálcio e 0,10% de fosfato bibásico de potássio, a 28°C, pH 5,4, 240 rpm por 49 horas. A atividade da nuclease P1 foi detectada a partir da 18<sup>a</sup> hora de fermentação e atingiu seu nível mais alto (350U/mL) após 49 horas de fermentação. O método utilizado para detecção da atividade enzimática foi baseado naquele descrito por Fujishima *et. al* (1972) e Fujimoto *et. al* (1974) com adaptações. O pH inicial de 5,4 do meio de cultura diminuiu para pH 4,2 após 49 horas de fermentação coincidindo com o pico máximo da produção da enzima. A nuclease P1 foi purificada após sucessivas etapas de purificação do fermentado bruto de *Penicillium citrinum* envolvendo a inativação térmica a 65°C por 15 minutos para inativação de enzimas contaminantes, ultrafiltração com membrana de 10kDa, precipitação fracionada com sulfato de amônio com 40% e 85% de saturação seguida de diálise com tampão fosfato 50mM pH 7,0, cromatografia utilizando coluna de Phenyl Sepharose (1cm x 7cm) equilibrado com tampão fosfato de 50mM pH 7,0, seguida de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (1cm x 6,5cm) equilibrado com tampão 10mM Tris-HCl pH 7,7 e eluição com mesmo tampão adicionado de 0,1M de NaCl, e por fim em cromatografia em coluna de Sephadex G-75 (1cm x 25cm) utilizando o mesmo tampão 10mM Tris-HCl pH 7,7. A massa molecular da enzima foi estimada em 43kDa por SDS-PAGE. Após as sucessivas etapas de purificação foi possível purificar a enzima cerca de 97 vezes com recuperação de 5,42% e atividade específica de 1264 U $\mu$ g<sup>-1</sup> de proteína. A nuclease P1 purificada apresentou atividade ótima em pH 5,4 e 69°C e mostrou-se estável após 30 minutos de tratamento térmico a 70°C em tampão acetato pH 5,4, mas foi inativada rapidamente em temperaturas superiores a 70°C. A enzima purificada incubada na faixa de pH 3,0 a 8,0, por 30 minutos a 65°C apresentou

maior estabilidade na faixa de pH 3,0 a 5,0, sendo inativada em pH 8,0. No estudo do efeito de diferentes íons na atividade enzimática, a enzima purificada foi incubada a 25°C por 30 minutos na presença dos seguintes sais: MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, AlCl<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>. Nas concentrações de 1 e 2 mM os autores destacaram o efeito negativo do Al<sup>+3</sup> que reduziu em 65% a atividade da nuclease P1 e conforme relatado por outros autores o efeito ativador do Zn<sup>+2</sup> resultou em um aumento de 248% na atividade em relação a enzima purificada controle. A nuclease contém zinco no sítio ativo.

Volbeda *et. al* (1991) estudaram a estrutura da enzima nuclease P1 de *Penicillium citrinum*, por espectroscopia de absorção atômica e cristalografia, e verificaram que é uma glicoproteína de massa molecular de aproximadamente 36KDa, com cerca de 270 resíduos de aminoácidos contendo 18-20% de carboidratos e três íons zinco em sua conformação ativa, coincidindo com os resultados obtidos por Fujimoto *et. al* (1975).

LU-E *et. al* (2007) testaram a produção da nuclease P1 por uma linhagem de *Penicillium citrinum* gentilmente cedida pela empresa chinesa Hangzhou Meiya Biotechnical Co. Ltd. utilizando o meio de cultura de produção da enzima proposto por Guo-Qing *et. al* (2006), variando as fontes de carbono (manitol, glicerol, glicose, maltose, dextrina, sacarose e amido). Como fontes de nitrogênio foram avaliadas peptona, extrato de levedura, peptona+extrato de levedura, ureia, sulfato de amônia, nitrato de sódio, nitrito de sódio e água de maceração de milho em pó. Como fonte de fósforo foram testados fosfato monobásico de potássio e fosfato bibásico de potássio e suas combinações. Foi testado também o efeito de diversos íons metálicos. Após a realização das fermentações utilizando delineamento experimental avaliando o efeito de cada componente do meio de cultura sobre a síntese de nuclease P1 os autores obtiveram 353U<sub>m</sub>L<sup>-1</sup> de atividade enzimática após 49 horas de fermentação de *Penicillium citrinum* em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 50mL do meio composto de 0,45% de peptona, 6,5% de glicose, 1% de torta de amendoim, 0,1% de fosfato bibásico, 0,15% de sulfato de zinco e 0,02% de carbonato de cálcio a 28°C e 240 rpm.

Assim como Guo-Qing *et. al* (2006) os autores também observaram uma queda no pH ao longo da fermentação e verificaram que após 54 horas toda a glicose do meio tinha sido consumida e o crescimento do fungo atingiu a fase estacionária após 40 horas de incubação.

Li *et. al* (2007) descreveram a produção da nuclease P1 por fermentação submersa da linhagem *Penicillium citrinum* ATCC14994. Para a preparação do pré-inóculo o fungo foi inoculado em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura composto por 3% de glicose, 0,5% de peptona e 0,3% extrato de levedura a 30°C e 250 rpm por 24 horas. Em seguida, 4 mL do pré-inóculo foi adicionado em frasco de Erlenmeyer de 500mL contendo 80mL de meio principal para a produção da nuclease P1 contendo 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,1% de fosfato bibásico de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio e 0,01% de cloreto de cálcio, ajustado para pH 5,8. Após 49 horas de fermentação a 28°C e 120 rpm foi obtido 262U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> de atividade da nuclease P1. Os autores estudaram a obtenção de mutantes por irradiação, submetendo esporos da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC14994 inoculados em placas de Petri em meio idêntico ao utilizado para o pré-inóculo contendo ágar, a sucessivas aplicações de irradiação com cobalto 60 com dosagem de 2000 Gy e selecionaram a linhagem AT1415 que apresentou a capacidade de produção de 813 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> de nuclease P1. Essa mesma linhagem inoculada em placas de petri contendo meio do pré-inóculo com ágar, foi submetida a três tratamentos com o composto mutagênico NTG (nitrosoguanidina) 5mg/mL. Após a sequencia de 3 tratamentos com NTG (nitrosoguanidina) os autores selecionaram a linhagem HEP2312 que apresentou 1212 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>, um aumento de cerca de 4,62 vezes em relação a linhagem original *Penicillium citrinum* ATCC14994, que apresentou 262 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>. Neste trabalho a atividade de nuclease P1 foi determinada pelo método de Fujimoto *et. al* (1974) e definida como mg de 5´- ribonucleotídeo formado por minuto por mL da reação a 65°C por cromatografia líquida utilizando EDTA – Ca<sup>+2</sup> como fase estacionária e metanol como fase móvel e os padrões de 5´ AMP, 5´UMP, 5´CMP e 5´GMP obtidos da Sigma Co. Ltd.

Qinting He *et. al* (2011) estudaram a obtenção de mutantes de uma linhagem de *Penicillium citrinum* YH-001, produtora de nuclease P1, por bombardeamento dos esporos com íons nitrogênio de baixa energia, visando o aumento da produção de nuclease P1. Uma alíquota de 0,5mL de suspensão de esporos ( $10^8$  esporos/mL) foi espalhada na superfície de placa de vidro e dessecada a temperatura ambiente. Foram utilizados bombardeamento de íons de nitrogênio com energia de 15keV com uma dosagem de  $1 \times 10^{15}$  íons/cm<sup>2</sup>. Após tratamento os esporos de *Penicillium citrinum* foram cultivados em PDA. A linhagem mutante de *P. citrinum* N409, cultivada em meio de cultura composto de 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,05% de fosfato bibásico de potássio, 0,05% de fosfato monobásico de potássio, 0,04% de sulfato de zinco e 0,04% de cloreto de cálcio, a 28°C, 250 rpm, produziu  $421 \text{ UmL}^{-1}$  de nuclease, correspondendo a um aumento de 86% na atividade em relação a linhagem YH-001. Neste estudo a atividade de nuclease foi determinada como descrito por Fujimoto *et. al* (1974). A linhagem mutante N409 manteve a capacidade de síntese de nuclease P1 sendo obtido  $421 \text{ UmL}^{-1}$  por 5 fermentações seguidas realizadas em frascos agitados conforme descrito acima. No aumento de escala, na fermentação da linhagem mutante N409, em biorreator do tipo Airlift de 30 litros, foi obtido quantidade máxima de biomassa (12g/L) após 18 horas de fermentação e atividade máxima de nuclease P1 ( $400 \text{ UmL}^{-1}$ ) no final da fase logarítmica de crescimento após 24 horas de fermentação.

### **2.2.3 Fontes vegetais de 5'fosfodiesterase**

Beinages *et. al* (1989) estudaram a produção e purificação parcial de 5'fosfodiesterase de radícula de malte utilizando precipitação com acetona e coluna DEAE –Sepharose. Posteriormente, Beinages *et. al* (1990) estudaram a produção de 5'ribonucleotídeos a partir de RNA extraído de levedura de cerveja utilizando enzima 5'fosfodiesterase parcialmente purificada de radícula de malte conforme citado em seu trabalho anterior. Utilizando-se concentrações de solução de RNA na faixa de 0,05% a 0,10%, verificou-se que em pH 7,0 e 60°C, a

5´fosfodiesterase de radícula de malte hidrolisou 90% do RNA em 5´nucleotídeos monofosfato quando a concentração do substrato (RNA) não ultrapassou 0,10%.

Segundo Bowles (1989) a capacidade de produção de 5´fosfodiesterase por germinação de sementes resultaram em um grande número de pedidos de patentes na França, Alemanha e Estados Unidos (US 3.304.238; US 3.459.637; US 3.516.907; WO89/09276).

Sementes germinadas de cevada, aveia, milho, trigo, arroz são ótimas fontes de 5´fosfodiesterase (Bowles 1991).

Beluhan *et. al* (2003) avaliaram a produção e purificação de 5´fosfodiesterase utilizando radícula de malte de cevada e relataram a presença da enzima contaminante fosfomonoesterase (PME) no extrato vegetal e a necessidade de etapas específicas de purificação para evitar a influência dessa enzima na produção de 5´nucleotídeos monofostato a partir de RNA. A enzima 5´fosfodiesterase de radícula de malte purificada apresentou atividade específica de 30 U mg<sup>-1</sup> proteína e atividade ótima em pH 8,9 e a 70°C. Na presença de 10mM de íon Mg<sup>+2</sup>, a atividade da 5´fosfodiesterase de radícula de malte de cevada aumentou 168% e mostrou-se estável por 8 dias a 4°C e 90 dias a -18°C.

Deoda *et. al* (2003) purificaram cerca de 18 vezes o extrato bruto de 5´fosfodiesterase de radícula de malte de cevada por ultrafiltração com membrana de polietersulfona de 20kDa, tratamento térmico a 60°C por 15 minutos, precipitação com sulfato de amônio e obtiveram 38,56% de recuperação da enzima. A preparação de enzima purificada apresentou 16198 U/mL de atividade em pH 5,0. O método utilizado para mensuração da atividade enzimática de 5´fosfodiesterase de radícula de malte foi baseado em BOWLES (1989). A mistura de 0,1mL de solução enzimática, previamente diluída, com 0,1mL de solução tampão acetato 30mM pH 5,0 e 0,7mL de água deionizada foi incubada a 60°C. Em seguida foi adicionado 0,1mL de NNP (*p*-nitrofenol) como substrato. Após 10 minutos a reação foi paralisada com 0,3mL de solução 5% de carbonato de sódio. A absorbância foi medida em 420nm. Foi preparada uma curva padrão de *p*-

nitrofenol e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade enzimática necessária para liberar 1nmol de *p*-nitrofenol por minuto a 60°C em pH 5.0.

#### **2.2.4 Fontes animais de 5´fosfodiesterase**

As principais fontes animais da enzima fosfodiesterase descritas na literatura foram extraídas de intestino bovino (Owen & Butler. 1983) e de veneno de cobra, sendo este último estudado desde a década de 50 (Sinsheimer & Koerner 1952).

Nihei e Cantoni (1963) estudaram a ação da enzima 5´fosfodiesterase purificada e liofilizada do veneno da cobra *Crotalus adamanteus* utilizando RNA extraído e purificado de levedura como substrato. Os autores verificaram que o RNA foi totalmente degradado em 5´nucleotídeos monofosfato nas seguintes proporções 12% de 5´AMP, 38,1% de 5´CMP, 22,4% de 5´UMP e 27,6% de 5´GMP.

Aird (2002) sugeriu que além do efeito digestivo do veneno da cobra, a presença da enzima fosfodiesterase contribui para o envenenamento da vítima devido à capacidade de hidrolisar ácidos nucleicos e formar purinas.

Valério *et. al* (2003) estudaram a purificação da enzima fosfodiesterase do veneno da cobra *Bothrops alternatus* utilizando técnicas de filtração em gel e colunas cromatográficas. A massa molecular da fosfodiesterase foi estimada em 105kDa por SDS-PAGE. A enzima mostrou atividade ótima na faixa de 7,5 a 9,5 e 60°C, sendo rapidamente inativada em temperaturas superiores a 70°C. A enzima foi ativada por cobalto e inibida por cobre, magnésio, zinco, EDTA e β-mercaptoetanol. Segundo os autores a enzima fosfodiesterase, isolada do veneno desta espécie de cobra, assemelham-se bastante às fosfodiesterases de outras espécies de cobras de estudos anteriores.

### 2.3 Produção de 5´nucleotídeos monofosfato pela hidrólise de RNA de levedura

Segundo Kuninaka (1961) e Fujimoto (1974) as primeiras produções de 5´nucleotídeos monofosfato, em larga escala, para a produção de acentuadores de sabor e produtos farmacêuticos foram realizadas através da hidrólise de RNA extraído de levedura. Nakao (1962) avaliou que a levedura seria uma fonte potencial de RNA apresentando um conteúdo de 2,5 -15% em sua composição. além da levedura ser reconhecida como GRAS, e ter uma alta capacidade de produção de biomassa em larga escala.

Benaiges *et. al* (1990) avaliou a produção de 5´nucleotídeos monofosfato a partir de RNA extraído de levedura de cerveja utilizando hidróxido de amônia. A fonte enzimática de 5´fosfodiesterase utilizada por esses pesquisadores foi a radícula de malte que após sua extração foi submetida a sucessivas etapas de purificação como, inativação térmica, precipitação com acetona e cromatografia de DEAE-Sepharose. A enzima purificada foi aplicada em soluções de RNA que variaram de 0,05% a 1% de concentração ajustada para pH 7,0 e incubadas a 60°C por 18 horas sendo a enzima capaz de hidrolisar 90% da molécula de RNA em 5´nucleotídeos monofosfato, quando a concentração da solução de RNA não ultrapassou 0,10% de concentração.

Olmedo *et. al* (1994) estudaram a produção contínua de 5´GMP e 5´IMP à partir da hidrólise de RNA de levedura, utilizando as enzimas comerciais 5´fosfodiesterase e AMP – deaminase, obtidas da empresa mexicana Enzimas e Produtos Químicos S.A, imobilizadas em resina acrílica de oxireno (acetato de vinil + divinil ureiaetil modificada). A atividade da enzima 5´fosfodiesterase foi padronizada para 10,98Ug<sup>-1</sup> de suporte no primeiro reator e da enzima AMP-deaminase foi ajustada para 25U/g de suporte no segundo reator. Ambos reatores operaram com a mesma vazão de 0,4cm<sup>3</sup>/min, porém o primeiro reator contendo a 5´fosfodiesterase imobilizada recebeu uma solução de 15g/L de RNA na temperatura de 70°C e o segundo, contendo a enzima AMP-deaminase



imobilizada foi alimentado com uma concentração de 8,1mM de 5´AMP formado no primeiro reator, sendo a temperatura ajustada para 40°C. O pH do sistema completo foi mantido em tampão acetato pH 5,5. Nessas condições, foi produzido um volume de 0,4cm<sup>3</sup>/minuto de 5´ nucleotídeos monofosfato com uma concentração de cerca de 3,3g/L a partir da hidrólise do RNA de levedura em sistema contínuo.

Deoda e Singhal (2003) também verificaram a possibilidade da produção de acentuadores de sabor 5´GMP e 5´IMP a partir da hidrólise da molécula de RNA. Os autores estudaram a extração e purificação da 5´fosfodiesterase de radícula de malte utilizando ultrafiltração com membrana de 20kDa e precipitação com sulfato de amônio, chegando a uma purificação de cerca de 18 vezes e 38% de recuperação. A enzima parcialmente purificada foi citada pelos autores como um promissor caminho para a produção de 5´nucleotídeos à partir da hidrólise de RNA, principalmente para produção de acentuadores de sabor.

Lu-E Shi *et. al* (2009) produziram 5´nucleotídeos monofosfato em sistema contínuo em biorreator onde o substrato RNA e a enzima nuclease P1 de *Penicillium citrinum* produzida e purificada de acordo com Guo-Qing (2006) ficaram retidos em membrana de polietersulfona de 30kDa, enquanto que o produto formado 5´nucleotídeos fosfato foram permeados na membrana. Utilizando-se 10mg/mL de RNA e 1mg/mL de enzima os autores obtiveram uma produção contínua de 5´nucleotídeos monofosfato, mantendo cerca de 95% da atividade inicial após 750 minutos de reação a 65°C, com vazão de permeado de 2mL/min, atingindo cerca de 6,3 mg de 5´nucleotídeos monofosfato/mL.

Harada *et. al* (1988) descreveram na patente EP0299078A1 a produção de 5´nucleotídeos monofosfato a partir de RNA da levedura *Candida utilis* CSB 6316. Os autores relataram que a linhagem empregada apresentou cerca de 17% de RNA em sua composição após ser propagada em fermentador de 30 L contendo 15 L de meio composto por 3% de glicose, 0,3% de fosfato monobásico de potássio, 0,7% de sulfato de amônio, 0,03% de sulfato de magnésio, 5ppm de sulfato férrico, 9ppm de sulfato de zinco e 4ppm de cloreto de manganês. As

condições de fermentação foram pH 4,0 controlada automaticamente com solução de hidróxido de amônio, 500rpm de agitação, 15 L de ar por minuto, por 16 horas. Após esse tempo, as células foram separadas por centrifugação e lavadas com água por duas vezes consecutivas, obtendo cerca de 300g de biomassa seca. Em seguida foi adicionado 1500 mL de água para formar uma suspensão de levedura que foi submetida a um tratamento térmico em banho-maria entre 80 a 100°C por 30 minutos para a completa inativação celular e destruição das ribonucleases. A suspensão foi resfriada para 40°C e foi adicionado 1,5g da protease Protin PC-10 da empresa Daiwa Kasei K.K. A amostra foi mantida a 40°C sob constante agitação por 10 horas. Para a inativação da protease, a amostra foi tratada a 80°C por 30 minutos e em seguida foi aplicado um resfriamento da solução para 65°C. Adicionou-se 0,15g de 5'fosfodiesterase comercial da AMANO Pharmaceutical Co. Ltd. e a amostra foi incubada com agitação constante por 3 horas a 65°C para hidrólise do RNA em 5' nucleotídeos monofosfato. Para a transformação de 5'AMP em 5'IMP a amostra foi resfriada a 45°C e após adição de 0,2g da enzima Deamizyme da empresa AMANO Pharmaceutical Co. Ltd., a mistura foi incubada a 45°C por 2 horas. O extrato de levedura ou a parte solúvel da solução, contendo os 5' nucleotídeos monofosfato livres foi separado da parede celular por centrifugação e em seguida aquecido a 90°C por 30 minutos e seco em *spray drying*, gerando cerca de 75g de extrato de levedura seco. Os teores de 5' nucleotídeos monofosfato determinados por HPLC foram 12% de 5'GMP, 8,3% de 5'IMP, 6% de 5'CMP e 11,8% de 5'UMP.

Em 2009, Noordam & Kortjes, descreveram uma patente, US20090148559A1, sobre a produção de 5' ribonucleotídeos, em grande escala, utilizando o RNA de levedura. Os autores utilizaram cerca de 100m<sup>3</sup> de creme de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* com 16,5% massa seca e 7,5% de RNA (base seca). A suspensão de levedura foi aquecida a 95°C por 10 minutos para a inativação de enzimas endógenas. Em seguida, a suspensão foi ajustada para pH 6,0 e tratada com protease sérica comercial Pescalase (DSM N.V The Netherlands) por quatro horas a 60°C. A seguir a suspensão foi ajustada para

65°C e pH 5,3 e foi adicionado 5´fosfodiesterase para a hidrólise do RNA da levedura. A suspensão foi tratada com AMP-deaminase a 55°C e pH 5,1 para a conversão de 5´AMP em 5´IMP. A suspensão foi submetida a ultrafiltração em membrana de 100kDa. Foi obtido 1104 kg de permeado, em base seca, contendo 13,35% de 5´GMP e 11,57% de 5´IMP, analisados por HPLC.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Micro-organismo produtor de 5´fosfodiesterase**

A linhagem do fungo *Penicillium citrinum* Thom IAM1131 (ATCC 14994) produtora de 5´fosfodiesterase foi adquirida do banco de cepas ATCC – The American Type Culture Collection – Virgínia, USA.

##### **3.1.1 Reativação e manutenção da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

Para a ativação do fungo *Penicillium citrinum* ATCC 14994 foi adicionado assepticamente 200 µL de água estéril no tubo contendo a cultura liofilizada. Após repouso de 10 min a suspensão foi transferida para tubo de ensaio contendo 20 mL de meio caldo batata dextrose (Potato Dextrose Broth, Marca Acumedia, código 7585A) e incubada a 26°C durante 12h conforme o procedimento disponibilizado pela ATCC. Em seguida a cultura foi inoculada por esgotamento utilizando alça descartável estéril em placas de meio Agar batata dextrose (PDA) e incubada em estufa a 26°C por 5 a 7 dias.

Após o crescimento do fungo em placas, as colônias isoladas foram transferidas em tubos contendo 10 mL de água peptonada tamponada (BPW), e em seguida homogeneizadas e inoculadas em tubos inclinados de meio de cultura PDA e incubados a 26°C por 7 dias. Após o crescimento dos fungos, foi feita a preservação utilizando as técnicas de ultracongelamento e a liofilização.



**Figura 5.** Crescimento da linhagem *Penicillium citrinum* ATCC14994 em tubos inclinados de meio de cultura PDA, após 7 dias.

### **3.1.1.1 Preservação do micro-organismo por ultracongelamento - 80°C**

A massa celular e esporos da cultura de *Penicillium citrinum* ATCC14994 de 6 tubos inclinados (Figura 5) foram coletadas utilizando alça descartável estéril e transferidas para frasco Erlenmeyer de 250mL contendo 60mL de água deionizada estéril, 12mL de glicerol (crio protetor) e 5 g pérolas de vidro. O frasco foi agitado por 5 minutos. Em seguida a suspensão foi filtrada em lã de vidro estéril. O meio filtrado contendo os esporos do fungo foram distribuídos em crio tubos de 1mL, submetidos a resfriamento a 5°C por 30 minutos, em seguida transferidos para freezer a - 20°C por 30min e em seguida preservados a - 80°C em Ultra freezer Marca Indrel.

### **3.1.1.2 Preservação do micro-organismo por liofilização**

A massa celular e os esporos da cultura de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 de 6 tubos inclinados foram coletadas utilizando-se alça descartável estéril e transferidas para frasco Erlenmeyer de 250mL contendo 60 mL do meio crio protetor composto de 10% de Skim Milk, 5% de inositol e 5 g de pérolas de vidro previamente esterilizados em autoclave por 5 minutos a 121°C. O frasco foi agitado por 5 minutos e a suspensão filtrada em lã de vidro estéril. Foram distribuídas alíquotas de 1 mL da suspensão filtrada contendo os esporos em

ampolas de ampicilina estéreis. As ampolas foram congeladas a -20°C por 4 horas e submetidas à liofilização por 15 horas em liofilizador Thermo Scientific – Modelo Savant Modulo D.

### **3.1.1.3 Contagem de esporos do micro-organismo antes e após ultracongelamento e liofilização**

A contagem de esporos de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 foi realizada em câmara de Neubauer após o preparo de diluições seriadas. E os resultados foram expressos em nº esporos/mL para as amostras conservadas por ultracongelamento e nº esporos/g para amostras conservadas por liofilização.

### **3.1.1.4 Análises de oligonucleotídeos e de PCR para caracterização da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

Para a caracterização genética da linhagem de fungo utilizada neste estudo o DNA foi extraído de acordo com protocolo descrito por Tussel *et. al.* 2006. As colônias isoladas em meio PDA foram coletadas com alça descartáveis de inoculação e transferidas para tubos eppendorf contendo 5 g de pérolas de vidro e 1000 µL de água estéril. Em seguida os tubos foram agitados em vortex por 5 minutos. Após agitação a amostra foi mantida por 10 minutos a - 80°C. Em seguida a amostra foi descongelada em banho seco por 3 min. a 65°C e agitada novamente por 3 minutos. Uma alíquota da suspensão de 300 µL foi transferida para um tubo de eppendorf de 1,5 mL e foi adicionado 800 µL de tampão de lise composto de 50 mM Tris-Base, 250 mM de NaCl, 50 mM EDTA e 0,3% de SDS. A mistura foi incubada a 65°C por 30 minutos com inversões ocasionais. Após deixar esfriar a temperatura ambiente foi adicionado 500 µL de solução 25% fenol:24% clorofórmio:1% álcool isoamílico (v/v): 50% água deionizada estéril invertendo

gentilmente o tubo de eppendorf por 10 minutos. Em seguida a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 15.600 x *g* a temperatura ambiente e o sobrenadante transferido para um tubo de 1,5 mL ao qual foi adicionado 700 µL de isopropanol gelado. A amostra foi homogeneizada por uma inversão do tubo e mantida a - 80°C por 10 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos a 15.600 x *g* a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e em seguida centrifugado por 5 minutos a 15.600 x *g* a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o DNA seco (por 1 hora a 37°C). Por fim o DNA foi eluído em 30 µL de água estéril.

A reação de amplificação foi realizada utilizando os primers ITS4/ITS5 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')/ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') (Batista et al 2008) nas seguintes condições: 1µL de DNA genômico, 1,5µL de dNTP mix (2mM), 0,8µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10pmol), 0,2µL de Taq DNA polimerase (Fermentas) em tampão 750mM Tris-HCL (pH 8,8), 200mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) Tween 20. Para a reação de amplificação as amostras foram desnaturadas a 94°C por 2 minutos e, em seguida, submetidas a 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 45 segundos e polimerização a 72°C por 45 segundos, além de uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após amplificação com os primers ITS4/ITS5 foi realizada a análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) utilizando as endonucleases *Hae III* e *HinfI* e em seguida a amostra foi analisada por eletroforese. Os géis foram corados com *syber safe* (Invitrogen) e submetidos à luz ultravioleta para a visualização do perfil eletroforético.

### **3.2 Estudo da produção de nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

#### **3.2.1 Estudo da produção de nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em incubador rotativo utilizando-se os meios de cultura nº1 e nº2**

Foram testados os meios de cultura nº1 descritos por Guo-Qing *et. al* (2006) e nº2 Li *et. al* (2007) para a fermentação submersa do fungo *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção da enzima nuclease P1.

No estudo da produção de nuclease P1 pela linhagem *Penicillium citrinum* ATCC 14994 utilizando-se o meio de cultura nº1, descrito por Guo-Qing *et. al* (2006), o pré-inóculo foi preparado inoculando-se 1mL de suspensão de esporos ( $10^8$ /mL), previamente preparada por ultracongelamento conforme descrito em 3.1.1.1, nos frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 10 mL de meio de cultura composto por 3% de sacarose, 0,1% de fosfato bibásico de potássio, 0,01% sulfato de ferro, 0,3% de nitrato de sódio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de cloreto de potássio e 20% caldo de batata dextrose (Potato Dextrose Broth, Marca Acumedia, código 7585A), pH inicial ajustado para 7,0 com solução 10% de HCl e 10% de NaOH, e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Após 24 horas de incubação em agitador rotatório New Brunswick Scientific modelo INNOVA 44 a 30°C a 100 rpm, as amostras de aproximadamente 10mL de pré-inóculo de cada frasco foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultura nº1 de produção da enzima composto de 0,2% de peptona, 6,0% glicose, 0,5% de farinha de amendoim (subproduto da extração de óleo de amendoim), 0,1% de fosfato bibásico de potássio, 0,03% sulfato de zinco e 0,04% de carbonato de cálcio, pH inicial ajustado para 5,4 e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados em agitador incubador, a 28°C, 200 rpm durante 120 horas. A cada 24 horas de fermentação o conteúdo de um frasco Erlenmeyer foi centrifugado a 1200xg por 15 minutos, sendo o sobrenadante do meio de cultura separado da massa celular do micélio utilizado



como extrato enzimático bruto e a atividade de nuclease P1 foi determinada conforme descrito no item 3.2.1.1. Para estimar o crescimento celular e o consumo de glicose no meio de cultura foram utilizados os procedimentos conforme citado nos itens 3.2.1.2. e 3.2.1.3., respectivamente.

Foi testada também a produção de nuclease P1 pela linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 utilizando-se o meio de cultura nº2, descrito por Li *et. al* (2007). Para a preparação do pré-inóculo, uma alíquota de 1 mL de suspensão de esporos ( $10^8$ /mL), previamente preparada por ultracongelamento conforme descrito em 3.1.1.1. foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de meio composto por 3% glicose, 0,5% peptona e 0,3% extrato de levedura, pH ajustado para 6,0 com solução 10% de HCl e 10% de NaOH, e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados a 30°C por 24 horas a 100 rpm. O conteúdo de cada frasco foi transferido assepticamente para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultura nº2, de produção da enzima, composto por 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,10% fosfato monobásico de potássio, 0,04% de cloreto de cálcio, 0,05% de sulfato de magnésio e 0,03% de sulfato de zinco, ajustado para pH 5,8 e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados a 28°C, 200 rpm durante 120 horas. A cada 24 horas de fermentação o conteúdo de um frasco Erlenmeyer foi centrifugado a 1200xg por 15 minutos. O sobrenadante do meio de cultura foi utilizado como extrato enzimático bruto. A atividade de nuclease P1, crescimento celular e consumo de glicose foram determinados como descrito nos itens 3.2.1.1.; 3.2.1.2. e 3.2.1.3., respectivamente.

#### **3.2.1.1 Determinação da atividade enzimática de nuclease P1 ou 5'fosfodiesterase**

A atividade de nuclease P1 ou 5'fosfodiesterase foi determinada pela medida da absorbância a 260 nm de nucleotídeos liberados da hidrólise da molécula de RNA pela enzima, conforme descrito por Guo-Qing *et. al* (2006). Tubos de ensaio

(13x100mm) com tampa contendo 1,9mL solução de 1% (p/v) de RNA (Sigma – R6625) em solução tampão acetato 0,125M pH 5,3, adicionado de 3mM de íon  $Zn^{+2}$  foram incubados em banho-maria Marconi MA-093 a 69°C por 10 minutos para equilíbrio da temperatura. Em seguida foi adicionado 100µL de solução de enzimática e os tubos foram incubados 15 minutos a 69°C com agitação a cada 5 minutos. Após incubação foi adicionado 2,0 mL de solução 0,25% (p/v) de molibdato de amônio e 2,5% de ácido perclórico (v/v) (mantida em geladeira), para paralisar a reação e precipitar o RNA não hidrolisado. Logo em seguida os tubos foram incubados em banho de gelo por 10 minutos, utilizando-se banho Ultratermostatizado Marconi MA-184. Em seguida os tubos foram centrifugados em centrífuga Metroterm MTD-III PLUS por 10 minutos a 956 x *g*. O sobrenadante da mistura de reação foi diluído 50 vezes com água deionizada e a absorbância foi medida a 260nm em espectrofotômetro HACH 5000 utilizando-se cubetas descartáveis de 1 cm de caminho ótico. Foi preparado um branco substituindo-se 100µL de solução enzimática por água deionizada, na mistura de reação, seguindo os mesmos procedimentos.

A atividade da enzima foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

Atividade enzimática (U/mL) =  $Abs_{260nm} \times 4,0 \times 50 / 0,1 \times 15 = Abs_{260nm} \times 133,3 \times a$ .

Onde **a** é a diluição da enzima. Uma unidade de atividade de nuclease P1 ou 5´fosfodiesterase foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar 1,0 na absorbância a 260nm em 1 minuto.

### **3.2.1.2 Determinação do crescimento celular**

A determinação do crescimento celular foi realizada segundo metodologia descrita por Li Tao (1993) com modificações. Amostras de 15 mL do meio de cultura em triplicatas foram centrifugadas em centrífuga Metroterm MTD-III PLUS por 10 minutos a 956 x *g*. Em seguida o sobrenadante foi separado e o micélio foi

lavado com 10 mL de água deionizada temperatura ambiente por duas vezes utilizando os mesmos parâmetros de centrifugação descritos acima. Em seguida o micélio foi transferido para um cadinho de porcelana da marca Chiarotii modelo P-53 e seco a 80°C por 24 horas em estufa à vácuo modelo MA030/12 Marconi. A quantificação da biomassa foi realizada por gravimetria e expressa em g/L de micélio seco.

### **3.2.1.3 Determinação do consumo de glicose do meio de cultura**

A determinação do consumo de glicose do meio de cultura foi realizada utilizando analisador bioquímico Life Science modelo YSI 2700. A faixa de máxima detecção desse equipamento restringe-se a 25g/L. O ponto de calibração utilizado foi de 1,80 g/L de glicose utilizando uma solução padrão de glicose comercializada pela empresa Life Science código YSI 2747.

### **3.2.2 Avaliação dos efeitos dos componentes glicose, peptona, farinha de amendoim, $K_2HPO_4$ , $CaCO_3$ e $ZnSO_4$ do meio de cultura na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 por delineamento do tipo Plackett-Burman.**

A influência dos seis componentes (glicose, peptona, farinha de amendoim,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $ZnSO_4$ ) do meio de cultura proposto por Guo Qing *et. al* (2006) foi estudada utilizando-se um delineamento do tipo Plackett-Burman (PB) com 12 ensaios em dois níveis para cada variável estudada e 3 ensaios nos pontos centrais, totalizando 15 ensaios. Foram realizados dois delineamentos para o estudo desses componentes. As variáveis e os níveis estudados no planejamento Plackett-Burman (PB) estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Segundo Rodrigues e Lemma (2009) as matrizes de Plackett-Burman são construídas para ensaios iguais a 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, até 100 e cada matriz representa um estrutura diferente da outra. Além disso, é fundamental a realização de pelo menos quatro ensaios a mais em relação ao número de variáveis independentes a serem estudadas. Dessa forma, sendo 6 o número de variáveis a investigar foi utilizada a matriz Plackett-Burman de 12 ensaios.

Para o estudo do efeito das variáveis: glicose, peptona, farinha de amendoim,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $ZnSO_4$  no meio de cultura para a fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 foi preparado um pré-inóculo conforme descrito por Guo-Qing *et. al* (2006). Uma alíquota de 1 mL suspensão de esporos ( $10^8/mL$ ), preparado como descrito no item 3.1.1.3 foi transferida assepticamente para frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 mL de meio de cultura composto por 3% de sacarose, 0,1% de fosfato bibásico de potássio, 0,01% sulfato de ferro, 0,3% de nitrato de sódio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de cloreto de potássio e 20% de caldo de batata dextrose (Potato Dextrose Broth, Marca Acumedia, código 7585A) com pH inicial ajustado para 7,0 com solução 10% de NaOH ou solução 10% de ácido clorídrico, e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados a 30°C por 24 horas a 100 rpm. Alíquotas de 10 mL de pré-inóculo foram transferidas assepticamente para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meios de culturas, ajustados para pH 5,4, contendo composições definidas e descritas nas Tabela 3 e 4, conforme planejamento experimental. Os frascos foram incubados a 28°C, 200 rpm durante 72 horas de fermentação. Os meios de cultura foram filtrados à vácuo em membrana de acetato de celulose Milipore de 0,45µm e a atividade de nuclease P1 nos filtrados foram determinadas conforme descrito no item 3.2.1.1.

**Tabela 3.** Valores das variáveis do primeiro planejamento PB e seus respectivos níveis codificados, para estudo dos efeitos das concentrações de glicose, peptona, farinha de amendoim,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $ZnSO_4$  no meio de cultura para a fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease p1.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Glicose % ( $x_1$ )	3	6	9
Peptona % ( $x_2$ )	0,1	0,2	0,4
Farinha de Amendoim % ( $x_3$ )	0,1	0,5	1,0
$K_2HPO_4$ % ( $x_4$ )	0,05	0,1	0,15
$CaCO_3$ % ( $x_5$ )	0,02	0,04	0,06
$ZnSO_4$ % ( $x_6$ )	0	0,03	0,06

**Tabela 4.** Valores das variáveis do segundo planejamento PB e seus respectivos níveis codificados para estudo dos efeitos das concentrações de glicose, peptona, farinha de amendoim,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCO_3$  e  $ZnSO_4$  no meio de cultura para a fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease p1.

.Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Glicose % ( $x_1$ )	3	6	9
Peptona % ( $x_2$ )	0	0,1	0,2
Farinha de Amendoim % ( $x_3$ )	0	0,25	0,5
$K_2HPO_4$ % ( $x_4$ )	0	0,05	0,1
$CaCO_3$ % ( $x_5$ )	0,04	0,08	0,12
$ZnSO_4$ % ( $x_6$ )	0,03	0,09	0,15

Os resultados foram analisados estatisticamente com auxílio dos softwares Minitab® 16.1.1 de Minitab Inc. (EUA) e Statistica® 10.0 da Statsoft, Inc. (Tulsa, Oklahoma, EUA).

### **3.2.2.1 Avaliação da reprodutibilidade das fermentações nas condições de maior produção de nuclease P1 obtidas no delineamento PB**

Após a realização de dois delineamentos do tipo PB de 12 ensaios e 3 pontos centrais conforme proposto no item 3.2.2. foram realizadas 3 repetições de fermentação utilizando-se o meio de cultura que apresentou maior produção de nuclease P1 pela linhagem *Penicillium citrinum* ATCC 14994. O meio nº3 escolhido, apresentava a composição de 3% de glicose, 0,2% de peptona, 0,5% de farinha de amendoim, 0,03% de sulfato de zinco e 0,12% de carbonato de cálcio.

### **3.2.3 Avaliação do efeito da concentração de peptona e farinha de amendoim no meio de cultura para a fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)**

Foi avaliada a influência da concentração de peptona e farinha de amendoim no meio de cultura na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e na produção de nuclease P1, por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR) com triplicata no ponto central e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios. Os valores reais e codificados das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Variáveis independentes e níveis para determinação do efeito da concentração de peptona e farinha de amendoim no meio de cultura para a fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1, por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR).

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha^*$	-1	0	+1	$+\alpha$
Peptona (%)	0,16	0,2	0,3	0,4	0,44
Farinha de Amendoim	0,40	0,5	0,75	1,0	1,10

\* $\alpha=1.41$

Uma equação de segunda ordem foi utilizada para definição do modelo, como mostrado abaixo:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

onde  $Y$  representa a resposta estimada pelo modelo,  $i$  e  $j$  correspondem à variação de 1 ao número de variáveis ( $n$ ),  $\beta_0$  é a média,  $\beta_i$  e  $\beta_{ij}$  representam os coeficientes lineares e quadráticos, respectivamente;  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis independentes codificadas. O coeficiente de correlação múltipla ( $R^2$ ) e o teste de Fisher (análise de variância-ANOVA) foi utilizado para verificar a adequação estatística do modelo codificado aos pontos reais. O software Statistica® 10.1 da Statsoft, Inc. (Tulsa, Oklahoma, EUA) foi utilizado no delineamento experimental, análise de dados e obtenção dos modelos.

O pré-inóculo foi preparado inoculando-se 1mL de suspensão de esporos ( $10^8$ /mL), em Erlenmeyer de 250mL contendo 10mL de meio composto por 3% de sacarose, 0,1% de fosfato bibásico de potássio, 0,01% sulfato de ferro, 0,3% de nitrato de sódio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de cloreto de potássio e 20% caldo batata dextrose (Potato Dextrose Broth, Marca Acumedia, código 7585A), com pH corrigido para 7,0 e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os

frascos foram incubados em agitador rotatório a 100 rpm a 30° C durante 24 horas. Alíquotas de 10mL de pré-inóculo foram transferidas para Erlenmeyer de 500 mL contendo 50mL de meio de cultivo composto por 3% glicose, 0,03% sulfato de zinco, 0,04% de carbonato de cálcio e 0,1% de fosfato monobásico de potássio, e diferentes níveis de peptona e farinha de amendoim conforme descrito na Tabela 06. Os frascos foram incubados em agitador rotativo a 28°C, 200rpm por 72 horas de fermentação. O micélio do fungo foi separado por filtração sob vácuo em membrana 0,45µm da marca Milipore. A atividade de nuclease P1 no sobrenadante foi determinada conforme descrito no item 3.2.1.1.

### 3.2.4 Avaliação do efeito do pH do meio de cultura e da quantidade de inóculo na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção da nuclease P1 utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Foi avaliada a influência do pH do meio de cultura e da quantidade de inóculo na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção da nuclease P1, por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR) com triplicata no ponto central e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios. Os valores reais e codificados das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Variáveis independentes e níveis para determinação dos efeitos do pH do meio de cultura e da quantidade de inóculo na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* Thom 1131 ATCC 14994 e produção de nuclease P1, por meio de delineamento composto central rotacional.

Variáveis	Níveis				
	- $\alpha^*$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Volume de inóculo (mL)	2,9	5	10	15	17,1
pH inicial do meio	4,6	5,0	6,0	7,0	7,4



\* $\alpha = 1.41$

Uma equação de segunda ordem foi utilizada para definição do modelo como mostrado abaixo:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

onde  $Y$  representa a resposta estimada pelo modelo,  $i$  e  $j$  correspondem à variação de 1 ao número de variáveis ( $n$ ),  $\beta_0$  é a média,  $\beta_i$  e  $\beta_{ij}$  representam os coeficientes lineares e quadráticos, respectivamente;  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis independentes codificadas. O coeficiente de correlação múltipla ( $R^2$ ) e o teste de Fisher (análise de variância-ANOVA) foram utilizados para verificar a adequação estatística do modelo codificado aos pontos reais. O software Statistica® 10.1 da Statsoft, Inc, (Tulsa, Oklahoma, EUA) foi utilizado no delineamento experimental, análise de dados e obtenção dos modelos.

O pré-inóculo foi preparado inoculando-se 1mL de suspensão de esporos ( $10^8$ /mL), em Erlenmeyer de 250mL contendo 10mL de meio composto por 3% de sacarose, 0,1% de fosfato bibásico de potássio, 0,01% sulfato de ferro, 0,3% de nitrato de sódio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de cloreto de potássio e 20% de caldo batata dextrose (Potato Dextrose Broth, Marca Acumedia, código 7585A), com pH corrigido para 7,0 e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 100 rpm a 30° C durante 24 horas. Para a realização da fermentação principal, alíquotas de diferentes volumes de pré-inóculo e meios de cultura de diferentes valores de pH foram utilizadas de acordo com o delineamento experimental na Tabela 6. As fermentações foram conduzidas em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 50mL de meio de cultivo n°3, composto por 3% glicose, 0,2% de peptona, 0,5% de farinha de amendoim, 0,03% sulfato de zinco e 0,12% de carbonato de cálcio, esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados em agitador rotativo a 28°C, 200rpm por 72 horas de fermentação. O micélio do fungo foi separado por filtração

sob vácuo em membrana 0,45µm da marca Milipore. A atividade de nuclease P1 no sobrenadante foi determinada conforme descrito no item 3.2.1.1.

### **3.2.5 Estudo da fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em biorreator Bioflo 310 NBS utilizando-se meio de cultivo nº3**

O aumento da escala de fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 foi realizado em biorreator Bioflo 310 NBS, com capacidade de 5L, com controle de agitação, aeração, pH, temperatura e oxigênio dissolvido.

O pré-inóculo foi preparado em duas etapas, primeiramente 1mL de suspensão de esporos ( $10^8\text{mL}^{-1}$ ), preparada como descrito no item 3.1.1.1., foi inoculada em Erlenmeyer de 250mL contendo 10mL de meio de cultura composto por 3% de sacarose, 0,1% de fosfato bibásico de potássio, 0,01% sulfato de ferro, 0,3% de nitrato de sódio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,05% de cloreto de potássio e 20% caldo de batata dextrose (Potato Dextrose Broth, Marca Acumedia, código 7585A), com pH inicial corrigido para 7,0 e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C durante 24 horas, 100 rpm. Em seguida todo o volume do pré-inóculo foi transferido, assepticamente, para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio nº3 composto por 3% glicose, 0,2% de peptona, 0,5% de farinha de amendoim, 0,03% sulfato de zinco e 0,12% de carbonato de cálcio com pH inicial corrigido para 5,4 e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados em agitador rotativo por 24 horas, a 30°C, 200rpm.

Uma alíquota de 50 mL de pré-inóculo foi transferida assepticamente para a cuba do biorreator contendo 2,5L de meio de cultivo de nº3, ajustado para pH 5,4 e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Foi testado o efeito da aeração de 5 vvm e 10 vvm na fermentação do fungo e produção de nuclease, mantendo-se a agitação de 300rpm e temperatura de 30°C. Amostras de 50mL de meio de cultura

foram coletadas após 24, 48, 72, 96 e 120 horas para determinação do crescimento celular, pH, consumo de glicose e atividade de nuclease.

O crescimento celular e o consumo de glicose foram determinados conforme descrito nos itens 3.2.1.2 e 3.2.1.3., respectivamente. A atividade de nuclease P1 foi determinada como descrito no item 3.2.1.1. A variação de pH do meio foi determinada em eletrodo da marca Toledo acoplada ao biorreator.

### **3.3 Produção, purificação parcial e determinação de algumas características da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

#### **3.3.1 Produção de nuclease P1**

A produção de nuclease P1 pela linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 foi realizada em biorreator como descrito no item 3.2.5. A massa celular foi separada por filtração à vácuo em membrana de acetato de celulose Millipore de 0,45 $\mu$ m e o filtrado foi denominado extrato bruto de nuclease P1. A atividade de nuclease P1 e concentração de proteína no filtrado foram determinadas conforme descrito nos itens 3.2.1.1. e 3.3.1.1., respectivamente.

##### **3.3.1.1 Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteína em mg/mL foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). Para o preparo do reagente de Bradford 25mg do corante azul brilhante “Comassie Brilhante Blue” foi dissolvido em 12,5mL de etanol (P.A). Em seguida foi adicionado 25 mL de ácido fosfórico P.A. (85%) sob agitação constante. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 250mL e o volume foi completado com água deionizada. A solução foi estocada em um frasco

de vidro âmbar. Foi preparada uma curva padrão de albumina de soro bovino – BSA Sigma Aldrich 98% A7906-50G nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 µg/mL. Alíquotas de 100µL de solução de proteína foram transferidas para tubos de ensaio e em seguida foi adicionado 5mL de reagente de Bradford em cada tubo de ensaio. Os tubos foram agitados com auxílio de vortex por 5 segundos e deixados em repouso por 7 minutos. Foi preparado um tubo denominado “branco” com a mistura de 100µL de água deionizada com 5mL de reagente de Bradford e realizado as mesmas etapas citadas anteriormente. A absorbância das soluções foi medida a 596 nm em espectrofotômetro, ajustando-se o zero com o branco.

### **3.3.2 Purificação parcial da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

Foi estudada a purificação parcial do extrato enzimático bruto de nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 por tratamento térmico, fracionamento com sulfato de amônio e ultrafiltração.

#### **3.3.2.1 Tratamento térmico do extrato enzimático bruto**

Amostras de 1000 mL de extrato enzimático bruto de nuclease P1 obtido no item 3.3.1, foram aquecidas a 65°C por 15 minutos para inativação das enzimas contaminantes, conforme descrito por Guo-Qing *et. al* (2006). A atividade de nuclease e concentração de proteína foram determinadas conforme descritos nos itens 3.2.1.1. e 3.3.11., respectivamente.

### **3.3.2.2 Precipitação fracionada do extrato bruto de nuclease P1 com sulfato de amônio**

Uma alíquota de 1000mL de extrato enzimático bruto obtido no item 3.3.2.1. foi submetida à precipitação fracionada com sulfato de amônio como descrito por Guo-Qing *et. al* (2006). O extrato bruto foi saturado com sulfato de amônio 40% de saturação. Após 24h a 4°C, a amostra foi centrifugada a 12.000 x *g* por 20 minutos a 4°C e precipitado obtido foi descartado. O sobrenadante remanescente, foi saturado à 85% de sulfato de amônio. Após 24h a 4°C, a amostra foi centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi dialisado com solução tampão acetato 50mM pH 5,3 por 24 horas a 4°C com sucessivas trocas da solução tampão. A atividade de nuclease P1 e a concentração de proteína foram determinadas como descrito nos itens 3.2.1.1. e 3.3.1.1, respectivamente. A atividade de nuclease P1 também foi determinada após 30 dias de armazenamento a 4°C.

### **3.3.2.3 Ultrafiltração do extrato bruto de nuclease P1**

Uma alíquota de 1000 mL do extrato enzimático bruto obtido de acordo com o item 3.3.2.1. foi submetida à filtração sob vácuo utilizando membrana de 0,45µm para a retenção de partículas grosseiras. Em seguida a amostra foi concentrada por ultrafiltração em membrana orgânica de poliestersulfona código Biomax 30kDa, em sistema de filtração tangencial Millipore modelo Pellicon TFF (Figura 6) com cassete acoplado com bomba peristáltica de capacidade de 5 atm de pressão, como descrito por Lu-E Shi (2009). A atividade da nuclease P1 e concentração de proteína foram determinadas no extrato retido pela membrana, denominado retentado contendo a enzima concentrada, bem como no permeado conforme descrito nos itens 3.2.1.1 e 3.3.1.1., respectivamente. A atividade de nuclease P1 também foi determinada após 30 dias de armazenamento a 4°C.



**Figura 6.** Sistema de filtração tangencial Millipore modelo Pellicon TFF.

#### **3.3.2.4 Avaliação da presença da micotoxina citrinina na preparação enzimática parcialmente purificada.**

Uma amostra de preparação enzimática de nuclease P1 obtida por tratamento a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração em membrana de 30kDa como descrito no item 3.3.2.3. foi avaliada quanto a presença de micotoxina citrinina, pela metodologia “Métodos químicos e físicos para análise de alimentos”, 3ed, São Paulo IMESP, 1985 do Instituto Adolfo Lutz, no Laboratório de Análises – LABCAL, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **3.3.3 Determinação de algumas características bioquímicas das preparações enzimáticas de nuclease P1 parcialmente purificadas de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

Foi determinada a temperatura e pH ótimo de atividade, e a estabilidade térmica da nuclease das preparações enzimáticas parcialmente purificadas por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos e fracionamento com sulfato de amônio (3.3.2.2.) e por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração (3.3.2.3.).

### **3.3.3.1 Temperatura ótima de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

A temperatura ótima de atividade da nuclease P1 das preparações enzimáticas parcialmente purificadas obtidas nos itens 3.3.2.2 e 3.3.2.3 foi determinada incubando-se a mistura de 100µL de preparação enzimática de nuclease e 1,9mL de solução 1% de RNA em tampão acetato 0,125M pH 5,4 contendo 3mM de íon  $Zn^{+2}$ , nas temperaturas de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90°C, como descrito no item 3.2.1.1.

### **3.3.3.2 pH ótimo de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

O pH ótimo de atividade da nuclease P1 das preparações enzimáticas parcialmente purificadas obtidas nos itens 3.3.2.2 e 3.3.2.3 foi determinado incubando-se a mistura de 100µL de preparação enzimática de nuclease e 1,9mL de solução 1% de RNA contendo 3mM de íon  $Zn^{+2}$ , em tampão acetato 0,05M pH 3,5; 4,0; 5,0; 5,4 e 5,5 e em tampão Tris-HCl 0,05M 69°C por 5 minutos, como descrito no item 3.2.1.1

### **3.3.3.3 Temperatura de estabilidade da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

A temperatura de estabilidade da nuclease P1 obtidas nos itens 3.3.2.2 e 3.3.2.3 foi determinada incubando-se 0,1mL de preparações enzimáticas em tampão acetato 0,125M pH 5,4 em tubos de ensaio com tampa de rosca em banho maria termoestatizado a 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90°C durante 30 minutos. A atividade residual de nuclease P1 foi determinada conforme item 3.2.1.1.

### **3.4 Aplicação da enzima nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 na hidrólise de RNA de levedura e produção de 5' nucleotídeos monofosfato**

Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo amostras de 100 mL de solução 1% (p/v) de RNA de levedura (Sigma –R6625) em solução tampão acetato 0,125M pH 5,3 contendo 3mM de  $Zn^{+2}$  foram incubados em agitador incubador New Brunswick Scientific modelo INNOVA 44, a 65°C, 150 rpm durante 30 minutos. Em seguida foi adicionada 1mL de preparação de nuclease P1 parcialmente purificada obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 min e ultrafiltração conforme descrito no item 3.3.2.3., contendo 258U $mL^{-1}$  de atividade enzimática. As amostras foram retiradas após 6 horas de reação. Para a paralisação da reação enzimática, as amostras foram submetidas a tratamento térmico em banho a 90°C por 15 minutos. O mesmo procedimento foi realizado utilizando a enzima comercial RP-1 da empresa AMANO dez vezes diluída, contendo 250U $mL^{-1}$  de atividade enzimática. Os 5' nucleotídeos monofosfato foram analisados por cromatografia líquida como descrito a seguir.



### **3.4.1 Determinação de 5'nucleotídeos monofosfato por cromatografia líquida**

A quantificação de 5'nucleotídeos monofosfato formados pela hidrólise de RNA utilizando a nuclease P1 parcialmente purificada foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE com detector de arranjo de fotodiodo, coluna C18 da marca Agilent modelo Zorbax 15cm x 3mm, utilizando-se fase móvel composto por dois eluentes, A (hexalamina) e B (metanol-acetato). Os padrões de 5'CMP, 5'UMP, 5'AMP e 5'GMP foram adquiridos da Sigma. Maiores detalhes do método não poderão ser descritos nesse trabalho, uma vez que, o mesmo é confidencial da empresa Biorigin que gentilmente disponibilizou o equipamento para a realização dessas análises.

## 4 Resultados e Discussão

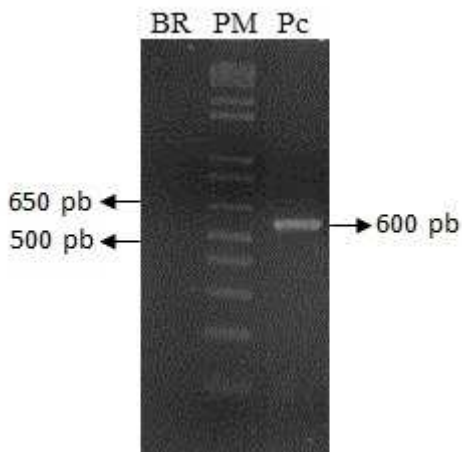
### 4.1 Preservação e caracterização taxonômica da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC14994

Os valores obtidos da contagem do número de esporos em câmara de Neubauer após o preparo das amostras conforme descrito em 3.1.1.1 e 3.1.1.2. pelo método de ultracongelamento e liofilização foram  $4,5 \times 10^7$ /mL e  $1,0 \times 10^8$ /g. respectivamente. Os resultados de contagem de esporos das suspensões obtidas foram próximos aos valores de  $1 \times 10^8$  esporos/mL utilizados por Zhu *et. al* (1996) em seus experimentos utilizando a mesma linhagem *Penicillium citrinum* ATCC 14994. A técnica proposta pelos autores citados acima para a preservação da solução de esporos foi de ultracongelamento a  $-80^\circ\text{C}$  utilizando solução estéril de 0,1% de Tween 80.

A técnica de ultracongelamento das suspensões de esporos de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 a  $-80^\circ\text{C}$  em ultrafreezer foi escolhida no presente estudo devido à facilidade de preparação e manutenção da viabilidade do micro-organismo. Foram produzidos cerca de 200 criotubos, suficientes para todos os experimentos citados nesse estudo. A técnica de liofilização dos esporos mostrou-se também adequada para manutenção do fungo por tempo prolongado. A contagem de números de esporos por mililitros dos crio-tubos utilizados em todos os experimentos realizados nesse trabalho apresentaram  $10^7$  a  $10^8$  esporos/mL.

A análise molecular por PCR-RFLP permitiu a caracterização genética da cepa *Penicillium citrinum* ATCC14994. Os perfis eletroforéticos provenientes da ação das duas endonucleases *Hae III* e *Hinfl*, utilizadas no trabalho, permitem monitorar a cepa durante as análises e testes em que esta foi utilizada. A identidade genética, neste caso, foi de grande importância, pois o perfil eletroforético caracterizado permite um rastreamento da cepa *Penicillium* e o reconhecimento de outras, caso venha ocorrer contaminação cruzada, durante o processo.

A Figura 7 ilustra o perfil eletroforético gerado pela amplificação com os iniciadores *ITS4/ITS5*. A banda referente a amplificação apresenta um tamanho de fragmento de aproximadamente 600 pb para *Penicillium citrinum* ATCC 14994.



**Figura 7.** Produto de amplificação do material genômico de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 utilizando os iniciadores ITS4/ITS5.

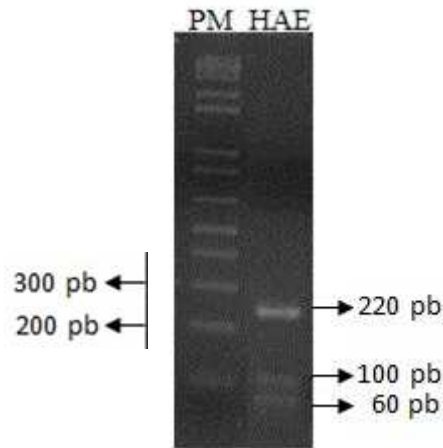
BR: controle (água); PM: Padrão Molecular (1Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen); Pc: *Penicillium citrinum* ATCC14994.

Após a amplificação a digestão enzimática foi realizada. As Figuras 8 e 9 ilustram os perfis eletroforéticos gerados pelas enzimas *Hae III* e *Hinf I*, respectivamente.

Dessa forma, as análises de PCR-RFLP utilizando a endonucleases *Hae III* e *Hinf I* podem ser utilizadas para a caracterização genética de *Penicillium citrinum*, como um monitoramento da cepa durante o processo.

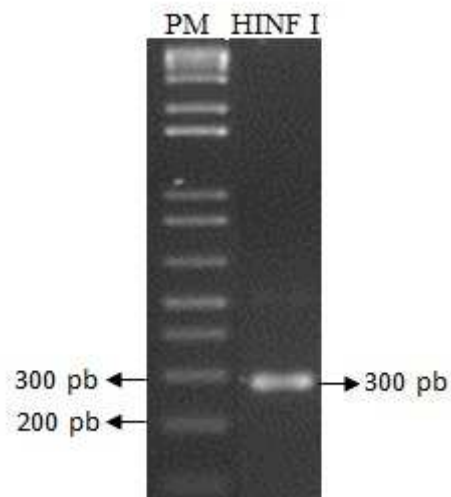
A Figura 8 ilustra dois fragmentos de 220 pb, um fragmento de 100 pb e um fragmento de 60 pb, obtidos pela hidrólise do produto de amplificação dos iniciadores ITS4/ITS5, com a enzima *Hae III*.

A Figura 9 mostra dois fragmentos de 300 pb obtidos pela hidrólise do produto de amplificação dos iniciadores ITS4/ITS5, com a enzima *Hinf I*.



**Figura 8.** Fragmentos obtidos da hidrólise do produto amplificado do DNA genômico de *Penicillium citrinum* ATCC 14994, com os iniciadores ITS4/ITS5, com a endonuclease Hae III.

PM: Padrão Molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen); HAE: Produto da digestão, com a endonuclease Hae III, do material genético amplificado com os iniciadores ITS4/ITS5.



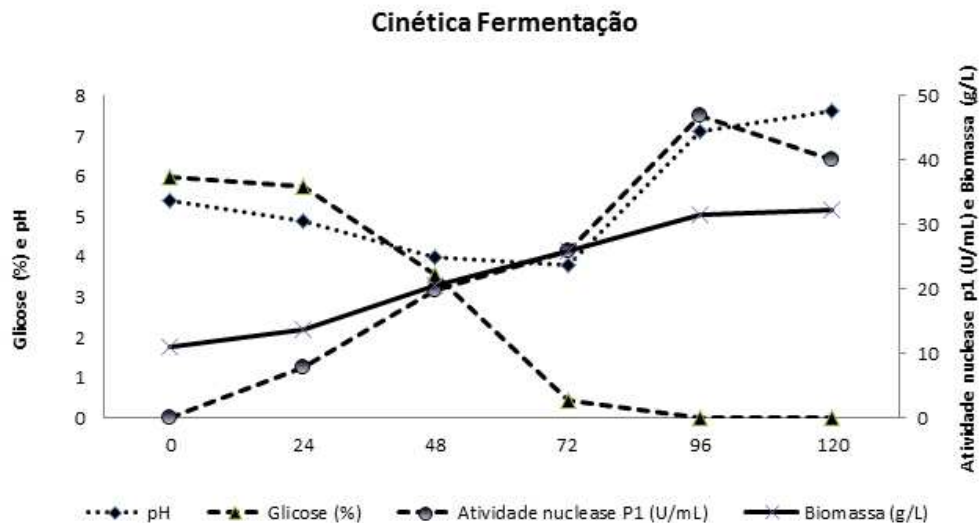
**Figura 9.** Fragmentos obtidos da hidrólise do produto amplificado do DNA genômico de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 com os iniciadores ITS4/ITS5, com a endonuclease Hinf I.

PM: Padrão Molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen); HINF I: Produto da digestão, com a endonuclease Hinf I, do material genético amplificado com os iniciadores ITS4/ITS5.

## **4.2 Estudo da produção de nuclease P1 pela linhagem *Penicillium citrinum* ATCC14994**

### **4.2.1 Estudo da produção de nuclease P1 pela linhagem *Penicillium citrinum* ATCC14994 em incubador rotativo utilizando-se os meios de cultura nº1 e nº2**

No estudo de cinética de fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 em frascos agitados de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultura descrito por Guo-Qing *et. al* (2006), denominado neste trabalho como nº 1, constituído de 0,2% de peptona, 6,0% glicose, 0,5 % de farinha de amendoim, 0,1% de fosfato bibásico, 0,03% sulfato de zinco e 0,04% de carbonato de cálcio, ajustado para pH 5,4 foi obtido atividade máxima de 46,93 UmL<sup>-1</sup> de nuclease P1 após 96h a 28°C e 200rpm conforme observado na Figura 10. Após 120h de fermentação a atividade de nuclease diminuiu para 40 UmL<sup>-1</sup> e o pH do meio de cultura atingiu 7,5. Essa diminuição da atividade da nuclease pode ser devido ao aumento do pH do meio de cultura. No presente estudo o pH inicial do meio de cultura que era 5,4, diminuiu para 3,78 e a concentração inicial de 6% de glicose diminuiu para 0,5% na 72<sup>a</sup> hora de fermentação. No período de 72 a 96 horas de fermentação foi observado consumo da glicose residual e uma elevação rápida do pH do meio, atingindo pH 7,1.



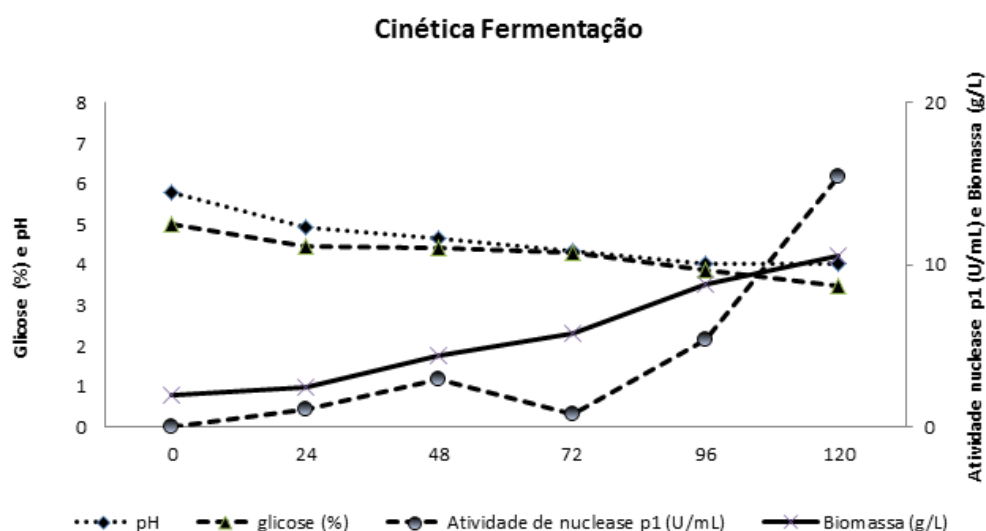
**Figura 10.** Estudo da cinética de fermentação e produção de nuclease P1 pela linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994, em meio de cultura nº1 descrito por Guo-Qing et. al (2006), em frascos agitados a 28°C e 200 rpm.

A nuclease de *Penicillium citrinum* ATCC14994 apresenta maior estabilidade na faixa de pH 5,0 a 5,4 (Guo-Qing 2006) apresentando redução de 50% de sua atividade em pH acima de 6,0. Kunitake et. al (1961) observaram que o aumento do pH para valores acima de 6,0 pode resultar em diminuição da estabilidade da nuclease excretada para o meio. Os autores relataram que o aumento do pH do meio de cultura ocorre quando a fonte de carbono do meio, como a glicose, é exaurida.

Guo-Qing et. al (2006) obtiveram 353U/mL<sup>-1</sup> de nuclease P1 utilizando uma linhagem selecionada de *Penicillium citrinum* após fermentação no mesmo meio de cultivo e nas mesmas condições testadas no presente trabalho. A linhagem de *Penicillium citrinum* utilizada por Guo-Qing et. al (2006) apresentou atividade de nuclease P1 cerca de 7,5 vezes maior que os ensaios deste estudo utilizando a linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994.

A Figura 11 ilustra a cinética de fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em meio de cultura, denominado nº2, com posto de 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,10% fosfato monobásico de potássio, 0,04% de

cloreto de cálcio, 0,05% de sulfato de magnésio e 0,03% de sulfato de zinco, pH 5,8 a 28°C e 200 rpm, descrito por Li *et. al* (2007). Foi obtida atividade máxima de 15,47 UmL<sup>-1</sup> de nuclease após 120 horas de fermentação a 28°C. Observou-se que o pH do meio de cultura diminuiu de pH 5,0 para 4,0 e a concentração de glicose inicial 5% (m/v) do meio de cultura diminuiu para 3,48% (m/v), sendo consumido cerca de 1,5% da fonte de carbono glicose, após 120 horas de fermentação.



**Figura 11.** Estudo da cinética de fermentação e produção de nuclease P1 pela linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994, em meio de cultura nº2 (Li *et. al.* 2007), em frascos agitados a 28°C e 200 rpm.

Li *et. al* (2007) utilizando a mesma linhagem do presente trabalho (*Penicillium citrinum* ATCC 14994) obteve 262U/mL de atividade de nuclease P1 após fermentação do fungo durante 49 horas a 28°C e a 120 rpm. Os autores relataram que a linhagem mutante AT1415 obtida por tratamento com irradiação com cobalto 60 apresentou atividade de nuclease de 813U/mL enquanto que a linhagem mutante HEP2312 obtida após a sequência de três tratamentos com NTG apresentou atividade de 1212U/mL de nuclease P1. A atividade de nuclease

P1 foi determinada por HPLC utilizando os nucleotídeos 5´CMP, 5´UMP, 5´AMP e 5´GMP como padrões para quantificação da hidrólise de uma solução 1% de RNA em tampão acetato de 0,125mol/L e pH 5.4 a 65°C por 15 minutos.

Li Tao (1993) relatou que na fermentação de uma linhagem *P. citrinum* em biorreator de 2 litros contendo meio de cultura composto de 5% de glicose, 0,5% de peptona, 0,05% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 0,05% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,04% de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,02% de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, após 72 horas a 28°C, aeração de 1,8 vvm e 300 rpm foi obtido 10 g/L de biomassa e 1,4 de absorbância a 260nm. A atividade de nuclease P1 foi determinada como descrito por Fujishima *et. al* (1972) e Fujimoto *et. al* (1974) sendo a unidade de atividade a leitura direta da absorbância a 260nm.

No presente trabalho o valor de máxima atividade de nuclease P1(46,93 UmL<sup>-1</sup>) foi obtido após 96 horas de fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 a 28°C e 200 rpm no meio de cultura nº1 , proposto por Guo-Qing *et. al* (2006), comparado com o meio de cultura nº2 descrito por Li *et. al* (2007) em que foi obtido 15,47 U/mL após 120 horas a 28°C e 200rpm. Foi obtido também crescimento celular cerca de três vezes maior na fermentação do fungo no meio de cultura nº1 (32,27g/L de biomassa seca) , comparado com o meio nº2 em que foi obtido 10,57g/L, o que pode estar diretamente relacionado com a produção de nuclease P1 nesses meios de cultivo. Dessa forma, o meio nº1 composto por 0,2% de peptona, 6,0% glicose, 0,5 % de farinha de amendoim, 0,1% de fosfato bibásico, 0,03% sulfato de zinco e 0,04% de carbonato de cálcio foi escolhido para próxima etapa do estudo.

#### **4.2.2 Delineamento experimental do tipo Plackett-Burman para a seleção dos componentes do meio de cultura para fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1**



A Tabela 7 ilustra os valores codificados e decodificados do primeiro delineamento do tipo Plackett-Burman para estudo dos efeitos dos componentes glicose, peptona, farinha de amendoim, ZnSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> do meio de cultura na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção da nuclease P1, estudados como descrito no item 3.2.2. As condições adotadas foram 72 horas de fermentação, 28°C e 200rpm de agitação.

**Tabela 7.** Matriz do primeiro delineamento PB de 12 ensaios e 3 pontos centrais com valores reais e codificados para estudo dos efeitos dos componentes do meio de cultura na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1.

Ensaio	Glicose (%)	Peptona (%)	Farinha de Amendoim (%)	ZnSO <sub>4</sub> (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	Atividade de nuclease P1 (U/mL)
1	9,0 (1)	0,1 (-1)	1,0 (1)	0 (-1)	0,02 (-1)	0,05 (-1)	2,00
2	9,0 (1)	0,3 (1)	0,1 (-1)	0,06 (1)	0,02 (-1)	0,05 (-1)	7,33
3	3,0 (-1)	0,3 (1)	1,0 (1)	0 (-1)	0,06 (1)	0,05 (-1)	4,27
4	9,0 (1)	0,1 (-1)	1,0 (1)	0,06 (1)	0,02 (-1)	0,15 (1)	17,33
5	9,0 (1)	0,3 (1)	0,1 (-1)	0,06 (1)	0,06 (1)	0,05 (-1)	17,73
6	9,0 (1)	0,3 (1)	1,0 (1)	0 (-1)	0,06 (1)	0,15 (1)	2,00
7	3,0 (-1)	0,3 (1)	1,0 (1)	0,06 (1)	0,02 (-1)	0,15 (1)	15,33
8	3,0 (-1)	0,1 (-1)	1,0 (1)	0,06 (1)	0,06 (1)	0,05 (-1)	26,80
9	3,0 (-1)	0,1 (-1)	0,1 (-1)	0,06 (1)	0,06 (1)	0,15 (1)	30,27
10	9,0 (1)	0,1 (-1)	0,1 (-1)	0 (-1)	0,06 (1)	0,15 (1)	7,33
11	3,0 (-1)	0,3 (1)	0,1 (-1)	0 (-1)	0,02 (-1)	0,15 (1)	2,67
12	3,0 (-1)	0,1 (-1)	0,1 (-1)	0 (-1)	0,02 (-1)	0,05 (-1)	7,87
13	6,0 (0)	0,2 (0)	0,5 (0)	0,03 (0)	0,04 (0)	0,1 (0)	44,80
14	6,0 (0)	0,2 (0)	0,5 (0)	0,03 (0)	0,04 (0)	0,1 (0)	48,40
15	6,0 (0)	0,2 (0)	0,5 (0)	0,03 (0)	0,04 (0)	0,1 (0)	41,87

Em relação às variáveis estudadas, a Tabela 8 ilustra que nenhuma variável apresentou efeito significativo ( $p$ -valor  $< 0,10$ ). O valor de atividade de nuclease P1 obtido variou de  $2,0 \text{ UmL}^{-1}$  a  $48,40 \text{ UmL}^{-1}$ . O maior valor obtido foi no ponto central, exatamente a composição do meio proposto por Guo-Qing *et. al* (2006) previamente avaliado no item 3.2.1. Isso explica a necessidade de ser realizado o procedimento de checagem da curvatura. Rodrigues e lemma (2009) relataram que quando se utiliza delineamentos incompletos como fatoriais fracionados e Plackett-Burman pode ocorrer que pontos centrais apresentem valores tanto inferiores quanto superiores aos das outras condições de ensaio. Quando isso ocorre, o erro padrão se torna muito alto, não se ajustando os resultados a um modelo de 1ª ordem, indicando a possível existência de uma curvatura.

Nesse sentido, conforme a Tabela 8 após a avaliação do efeito de curvatura sobre a influência de cada componente do meio de cultura sobre a atividade de nuclease P1 foi observado um efeito negativo na atividade enzimática e estatisticamente significativo ( $p$ -valor  $< 0,10$ ) quando foi aumentada a concentração de glicose e peptona no meio. Os componentes  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{CaCO}_3$  apresentaram efeitos positivos e estatisticamente significativo quando a concentração de ambos foi aumentada no meio de cultura ( $p$ -valor  $< 0,10$ ) para a produção de nuclease P1.

**Tabela 8.** Efeitos estimados, erro padrão, Teste t-Student e p-valor do primeiro planejamento do tipo Plackett-Burman de 12 ensaios checando curvatura, para estudo dos efeitos da concentração de glicose, peptona, farinha de amendoim, ZnSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no meio de cultura para a fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	T(7)	p-valor (<0.10)
<b>Média</b>	11,74	0,80	14,67	0,000
<b>Curvatura</b>	63,70	3,58	17,79	0,000
<b>Glicose*</b>	-5,57	1,60	- 3,48	0,010
<b>Peptona*</b>	-7,04	1,60	- 4,40	0,003
<b>Farinha</b>	-0,91	1,60	- 0,57	0,588
<b>ZnSO<sub>4</sub>*</b>	14,77	1,60	9,23	0,000
<b>CaCO<sub>3</sub>*</b>	5,98	1,60	3,73	0,007
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1,49	1,60	0,93	0,384

R<sup>2</sup> = 98,46% \* Fatores com efeito significativos

Para a realização do segundo delineamento experimental do tipo Plackett-Burman com 12 ensaios e mais 3 pontos centrais as concentrações das variáveis peptona, farinha de amendoim e fosfato monobásico de potássio foram reduzidas no meio de fermentação baseado em seus efeitos no primeiro PB realizado, enquanto os valores das variáveis sulfato de zinco e carbonato de cálcio foram aumentados (Tabela 10). Os resultados obtidos do segundo delineamento do tipo Plackett-Burman com 12 ensaios mostraram atividade de nuclease P1 entre 0 e 77,6 UmL<sup>-1</sup> para 72 horas de fermentação (Tabela 9).

Avaliando a Tabela 11 de efeitos, apenas a peptona e a farinha de amendoim foram estatisticamente significativos (p-valor < 0,10) para a atividade de nuclease P1, mesmo tendo seus níveis reduzidos para esse delineamento. Para os novos níveis utilizados, as variáveis, carbonato de cálcio e sulfato de zinco, não apresentaram efeitos estatisticamente significativos para a produção de nuclease P1. A glicose e o fosfato monobásico de potássio permaneceram estatisticamente não significativos.

**Tabela 9.** Variáveis reais e codificadas (em parênteses) do segundo planejamento do tipo PB-12 ensaios e 3 pontos centrais para estudo dos efeitos da concentração de glicose, peptona, farinha de amendoim, ZnSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> do meio de cultura para a fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1.

Ensaio	Glicose (%)	Peptona (%)	Farinha de Amendoim (%)	ZnSO <sub>4</sub> (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	Atividade de nuclease (UmL <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	Residual de Glicose (g/L)
1	9,0 (1)	0 (-1)	0,5 (1)	0,03 (-1)	0,04 (-1)	0 (-1)	14,67	3,27
2	9,0 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	0,15 (1)	0,04 (-1)	0 (-1)	63,47	3,25
3	3,0 (-1)	0,2 (1)	0,5 (1)	0,03 (-1)	0,12 (1)	0 (-1)	77,60	0,29
4	9,0 (1)	0 (-1)	0,5 (1)	0,15 (1)	0,04 (-1)	0,10 (1)	23,73	3,35
5	9,0 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	0,15 (1)	0,12 (1)	0 (-1)	37,07	3,17
6	9,0 (1)	0,2 (1)	0,5 (1)	0,03 (-1)	0,12 (1)	0,10 (1)	64,27	2,83
7	3,0 (-1)	0,2 (1)	0,5 (1)	0,15 (1)	0,04 (-1)	0,10 (1)	40,27	0,01
8	3,0 (-1)	0 (-1)	0,5 (1)	0,15 (1)	0,12 (1)	0 (-1)	21,60	0,43
9	3,0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,15 (1)	0,12 (1)	0,10 (1)	10,40	2,57
10	9,0 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,03 (-1)	0,12 (1)	0,10 (1)	0	2,53
11	3,0 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	0,03 (-1)	0,04 (-1)	0,10 (1)	14,13	0,62
12	3,0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,03 (-1)	0,04 (-1)	0 (-1)	5,60	1,53
13	6,0 (0)	0,1 (0)	0,25 (0)	0,09 (0)	0,08 (0)	0,05 (0)	13,33	2,70
14	6,0 (0)	0,1 (0)	0,25 (0)	0,09 (0)	0,08 (0)	0,05 (0)	12,27	2,50
15	6,0 (0)	0,1 (0)	0,25 (0)	0,09 (0)	0,08 (0)	0,05 (0)	13,87	2,58

\* Atividade enzimática de nuclease P1 após 72h de fermentação, 200rpm, 28°C.

**Tabela 10.** Efeitos estimados, erro padrão, Teste t-Student e p-valor para a atividade da nuclease P1 do segundo planejamento do tipo Plackett-Burman de 12 ensaios checando a curvatura para estudo dos efeitos da concentração de glicose, peptona, farinha de amendoim, ZnSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> do meio de cultura para a fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	T(7)	p-valor (<0,10)
<b>Média*</b>	31,07	4,09	7,59	0,000
<b>Curvatura*</b>	- 35,82	18,30	- 1,96	0,091
<b>Glicose</b>	10,04	8,18	1,22	0,259
<b>Peptona*</b>	36,80	8,18	4,50	0,003
<b>Farinha de Amendoim*</b>	18,58	8,18	2,27	0,057
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	3,38	8,18	0,41	0,692
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	8,18	8,18	0,99	0,350
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	- 6,76	8,18	- 0,82	0,463

R<sup>2</sup> = 82,30% \*Fatores com efeito significativo

De acordo com os resultados obtidos foi possível alcançar um incremento no valor de atividade enzimática no segundo delineamento experimental do tipo PB. A maior atividade de nuclease P1 obtida no primeiro delineamento apresentou 48,40U mL<sup>-1</sup> enquanto que no segundo delineamento sequencial após ajustar as concentrações dos componentes do meio foi possível atingir a atividade de 77,60U mL<sup>-1</sup> (ensaio 03), reduzindo a fonte de carbono para metade e aumentando a concentração de carbonato de cálcio em três vezes. Outro ponto interessante observado nesse experimento foi à relevância de adicionar uma fonte de nitrogênio para a síntese da enzima pelo fungo, ou seja, os ensaios 9, 10 e 12 em que a peptona e farinha de amendoim foram retiradas dos meios de cultivos apresentaram valores reduzidos ou nulos de atividade enzimática, comprovando o efeito positivo que a peptona mostrou na produção da enzima, como indicado na análise estatística.

Após a realização de dois delineamentos experimentais sucessivos do tipo Plackett-Burman com 12 ensaios foram realizados 3 ensaios de fermentação da linhagem de *P. citrinum* ATCC 14994 utilizando-se meio de cultura contendo os componentes nas concentrações que resultaram em maior atividade de nuclease P1, conforme citado no ensaio 03 da Tabela 09. A Tabela 11 apresenta a concentração de cada variável e os valores de atividade de nuclease P1.

**Tabela 11.** Avaliação da reprodutibilidade da fermentação da linhagem *Penicillium citrinum* ATCC14994 na produção de nuclease P1 no meio de cultura nº3 obtida por delineamento PB.

	Glicose (%)	Peptona (%)	Farinha de Amendoim (%)	ZnSO <sub>4</sub> (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	Atividade de nuclease (U/mL)
<b>Ensaio 1</b>	3,0	0,20	0,5	0,03	0,12	0	<b>69,1</b>
<b>Ensaio 2</b>	3,0	0,20	0,5	0,03	0,12	0	<b>73,6</b>
<b>Ensaio 3</b>	3,0	0,20	0,5	0,03	0,12	0	<b>71,2</b>

Dessa forma, foi possível verificar que o meio escolhido reproduziu os níveis de atividade de nuclease P1 obtido no segundo delineamento experimental do tipo PB.

#### **4.2.3 Avaliação do efeito da concentração de peptona e farinha de amendoim no meio de cultura para a fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 utilizando delineamento experimental do tipo DCCR**

Considerando os efeitos da peptona e da farinha de amendoim ser estatisticamente significativos ( $p$ -valor  $<0,10$ ) no segundo ensaio de PB foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para essas

duas variáveis independentes na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 como descrito no item 3.2.3. A Tabela 12 mostra os níveis de peptona e farinha de amendoim adotado no experimento.

**Tabela 12.** Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> com as variáveis codificadas, valores reais e atividade de nuclease P1 (UmL<sup>-1</sup>) após 72h de fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994.

Ensaio	% Peptona (x1)	% Farinha de Amendoim (x2)	Atividade de nuclease UmL <sup>-1</sup>
1	0,2 (-1)	0,5 (-1)	64,53
2	0,2 (-1)	1,0 (+1)	71,29
3	0,4 (+1)	0,5 (-1)	66,93
4	0,4 (+1)	1,0 (+1)	67,46
5	0,3 (0)	0,40 (-1,41)	14,76
6	0,3 (0)	1,10 (+1,41)	68,18
7	0,16 (-1,41)	0,75 (0)	52,09
8	0,44 (+1,41)	0,75 (0)	83,91
9	0,3 (0)	0,75 (0)	58,67
10	0,3 (0)	0,75 (0)	64,62
11	0,3 (0)	0,75 (0)	65,33

Os termos dos coeficientes das variáveis % peptona e farinha de amendoim (lineares e quadráticos) não apresentaram efeito significativo ( $p$ -valor  $<0,10$ ) consequentemente não foi possível realizar a análise de variância ANOVA e construir o modelo de equação com os termos significativos (Tabela 13).

**Tabela 13.** Coeficientes de regressão do DCCR  $2^2$  para determinação dos efeitos da peptona e farinha de amendoim no meio cultura para a fermentação da linhagem *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1.

Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	T(7)	p-valor (<0,10)
Média*	62,87	8,97	7,01	0,001
Peptona (L)	10,36	5,49	1,89	0,118
Peptona (Q)	- 7,50	5,49	0,99	0,367
Farinha de amendoim (L)	5,45	6,54	-1,15	0,303
Farinha de amendoim(Q)	5,77	6,54	0,88	0,418
Peptona x Farinha de Amendoim	-1,56	7,77	-0,20	0,849

\*Termos significativos ( $p$ -valor < 0,10). L = linear; Q = quadrático.

#### 4.2.4 Avaliação do efeito do pH e do inóculo na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 utilizando delineamento experimental do tipo DCCR

A avaliação da interação das duas variáveis independentes, pH e quantidade de inóculo na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção da nuclease P1 utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), foi realizado como descrito no item 3.2.3. Foi utilizado um delineamento completo central rotacional  $2^x + 2K + 5$  pontos centrais conforme Tabela 14. Foram obtidos valores de atividade de nuclease na faixa de 73,07 UmL<sup>-1</sup> a 30,93 UmL<sup>-1</sup>.



**Tabela 14.** Matriz do DCCR 22 com as variáveis codificadas e valores reais, pH final de fermentação, % de glicose residual e atividade de nuclease P1 (U/mL<sup>-1</sup>) após 72h de fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994.

Ensaio	pH/x1	Inóculo (mL)/ x2	Atividade de nuclease U/mL	pH final	% glicose residual
1	5,0 (-1)	5,0 (-1)	45,33	4,44	0,002
2	5,0 (-1)	15,0 (+1)	32,00	4,70	0,011
3	7,0 (+1)	5,0 (-1)	58,40	4,34	3,200
4	7,0 (+1)	15,0 (+1)	50,13	4,70	0,000
5	6,0 (0)	2,9 (-1,41)	39,73	4,17	2,150
6	6,0 (0)	17,1 (+1,41)	30,93	4,65	0,006
7	4,6 (-1,41)	10,0 (0)	32,27	4,52	0,002
8	7,4 (+1,41)	10,0 (0)	44,27	4,67	0,004
9	6,0 (0)	10,0 (0)	66,13	4,67	0,008
10	6,0 (0)	10,0 (0)	67,20	4,68	0,004
11	6,0 (0)	10,0 (0)	58,67	4,70	0,004
12	6,0 (0)	10,0 (0)	70,67	4,40	0,008
13	6,0 (0)	10,0 (0)	73,07	4,62	0,004

Os termos dos coeficientes das variáveis pH inicial do meio de cultura e quantidade de inóculo (quadráticos) apresentaram efeito significativo ( $p$ -valor <0.10) (Tabela 15). Enquanto os coeficientes dos termos lineares e a interação entre as duas variáveis não foram considerados no modelo.

A Tabela 16 apresenta a análise de variância (ANOVA) aplicada para analisar a adequação estatística do modelo quadrático codificado aos pontos reais. O teste de Fischer através do  $F$  calculado evidencia que a ANOVA indica que a regressão foi significativa, uma vez o valor de  $F_{cal}$  apresenta um valor três vezes maior que o  $F_{tab}$ .

**Tabela 15.** Coeficientes de regressão do DCCR 2<sup>2</sup> para determinação dos efeitos do pH inicial do meio de cultura e quantidade de inóculo na fermentação da linhagem *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1.

Fatores	Coeficientes	Erro Padrão	T(7)	p-valor (<0.10)
Média*	67,14	4,57	14,69	<0,001
pH (L)	- 0,58	7,23	- 0,16	0,877
pH (Q)*	- 12,02	7,75	- 3,10	0,017
Inóculo (L)	2,34	7,23	0,65	0,537
Inóculo (Q)*	- 13,49	7,75	- 3,48	0,010
pH x Inoculo	1,26	10,22	0,25	0,247

\*Termos significativos ( $p$ -valor < 0.10). L = linear; Q = quadrático.

**Tabela 16.** ANOVA do estudo dos efeitos do pH inicial do meio de cultura e quantidade de inóculo na fermentação da linhagem *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1.

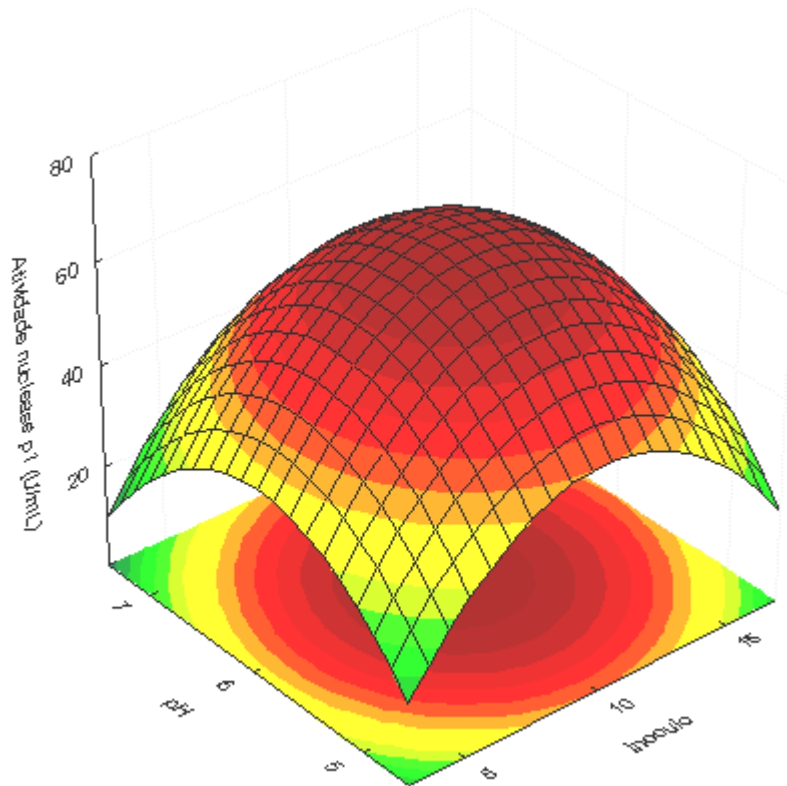
Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	2272,0	3	757,33	9,66
Resíduos	784,3	10	78,43	
Total	3056,3	12		

% variação explicada  $R^2 = 71,95$ ;  $F_{3;10;0,10} = 2,73$

O modelo quadrático codificado excluindo as variáveis que não foram estatisticamente significativas é mostrado abaixo:

Modelo de equação quadrática para máxima produção de nuclease p1..

$$\text{Atividade de nuclease P1 (U/mL)} = 67,14 - 12,02 x_1^2 - 13,49 x_2^2$$



**Figura 12.** Efeito do pH do meio de cultura e da quantidade de inóculo em volume (mL) na fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 e produção de nuclease P1 (UmL-1).

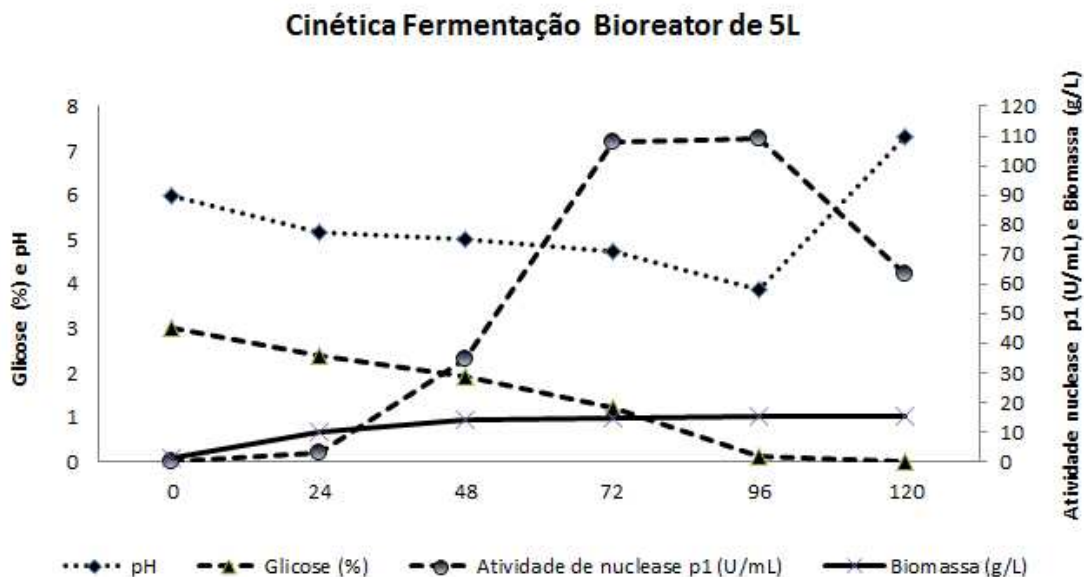
A Figura 12 ilustra que ajustando o pH do meio de cultura n°3 composto de 3% de glicose, 0,2% de peptona, 0,5% de farinha de amendoim, 0,03% de ZnSO<sub>4</sub> e 0,12% de CaCO<sub>3</sub> para 6,0 e utilizando-se 10mL de inóculo contendo 10<sup>8</sup> esporos/mL para fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 foi obtido maior atividade de nuclease P1.

Essa ferramenta segundo Rodrigues e lemma (2009) proporciona para o experimento condições de avaliar a informação da robustez do processo empregado, definindo o tipo de controladores, sensores e ferramentas mais adequadas para sua execução, o que pode afetar diretamente sua implementação e viabilidade.

#### 4.2.5 Fermentação de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em biorreator Bioflo 310 NBS utilizando meio de cultura otimizado

Na fermentação da linhagem de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em biorreator Bioflo 310 NBS utilizando 3L de meio de cultura n°3 composto de 3% de glicose, 0,2% de peptona, 0,5% de farinha de amendoim, 0,03% de ZnSO<sub>4</sub>, 0,04% de CaCO<sub>3</sub> e 0,1% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ajustado para pH inicial de 6,0; 2% de inóculo, 10vvm de aeração, 300 rpm de agitação e 30°C, foi obtido 108,9 UmL<sup>-1</sup> de atividade de nuclease P1 na fase estacionária após 96 horas de fermentação sendo que a atividade diminuiu para 63,2 UmL<sup>-1</sup> após 120 horas (Figura 13). O pH inicial (6,0) do meio de cultura diminuiu para 3,89 após 96 horas de fermentação, sendo que aumentou para 7,3 após 120 horas. Observou-se que a concentração inicial de glicose (3%) diminuiu para 1,2%, 0,12% e 0,01% após 72h, 96h e 120 de fermentação, respectivamente. O crescimento celular apresentou uma rápida evolução entre as 48 horas iniciais de fermentação, estabilizando em torno de 15g/L (massa seca). Conforme observado por Li Tao (1992) a produção de nuclease P1 ocorreu na fase estacionária do *Penicillium citrinum* onde a síntese proteica ocorre em menor intensidade permitindo a metabolização das moléculas de RNA para o aproveitamento dos blocos de nucleotídeos como precursores de produtos de seu metabolismo.

Qinting He *et. al* ( 2011) estudaram a produção de nuclease P1 pela linhagem mutante *Penicillium citrinum* N409 em biorreator do tipo Airlift de 30 litros e obtiveram quantidade máxima de biomassa (12g/L) após 18 horas de fermentação e atividade máxima de nuclease P1 (400 UmL<sup>-1</sup>) no final da fase logarítmica de crescimento após 24 horas de fermentação.



**Figura 13.** Cinética de fermentação submersa do fungo *Penicillium citrinum* ATCC 14994 em meio de cultura nº3 em biorreator do tipo Bioflo 310 NBS e produção de nuclease P1.

### 4.3 Produção, purificação parcial e determinação de algumas características da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994

#### 4.3.1 Produção e purificação parcial da nuclease de *Penicillium citrinum* ATCC 14994

O extrato bruto de nuclease obtido por fermentação de *P. citrinum* ATCC 14994 em biorreator como descrito no item 3.3.1. apresentou  $108,9 \text{ U mL}^{-1}$  de atividade de nuclease P1. Após tratamento do extrato de nuclease durante 15 minutos a  $65^\circ\text{C}$  a atividade diminuiu para  $74,0 \text{ U mL}^{-1}$ , representando uma perda de 30,65% na atividade enzimática. O tratamento térmico do extrato enzimático bruto de nuclease a  $60\text{-}65^\circ\text{C}$  permite a inativação de enzimas contaminantes termosensíveis 3'-fosfodiesterases e 5'-fosfomonoesterases que também degradam RNA (Gerald e Tilak, 1991). Guo Qing *et. al* (2006) relataram que após tratamento térmico do extrato bruto de nuclease P1 de *P. citrinum*, foi obtido 99,5% de recuperação enzimática.

A Tabela 17 ilustra que no fracionamento do extrato enzimático de nuclease P1 previamente submetido a tratamento térmico, durante 15 minutos a 65°C, seguido de precipitação fracionada com sulfato de amônio e diálise, descrito no item 3.3.2.2. foi obtido preparação contendo 634,89 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup>. O fator de purificação e rendimento obtido foi de 4 vezes e 39,63%, respectivamente.

A preparação de nuclease P1 obtida por ultrafiltração do extrato bruto previamente tratado a 65°C durante 15 minutos e filtrada em membrana de polietersulfona de retenção de 30kDa, como descrito no item 3.3.2.3. apresentou 222,67 U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> indicando que foi concentrada cerca de 2,08 vezes. Foi obtido fator de purificação de 1,16 vezes em relação ao extrato enzimático bruto ou sobrenadante do meio de cultura, e rendimento de 20,87% (Tabela 17).

Guo-Qing *et. al* (2006) concentraram cerca de 10 vezes o extrato bruto de nuclease P1 de uma linhagem de *Penicillium citrinum*, por ultrafiltração com membrana de polietersulfona de 10kDa e obtiveram fator de purificação de 1,43 vezes e 97,1% de recuperação da enzima.

Lu-E-Shi *et. al* (2009) utilizaram um sistema de ultrafiltração com membrana de 30 kDa para produção de nucleotídeos 5' fosfato a partir de RNA e não observaram atividade de nuclease P1 no permeado. A atividade da enzima foi detectada somente no retentado, indicando que a enzima foi retida pela membrana.

Deoda e Singhal (2003) purificaram cerca de 5 vezes a nuclease P1 do extrato enzimático bruto de radícula de malte utilizando membrana de polietersulfona de 20kDa e recuperaram cerca de 81,2% da enzima.

As preparações de nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 parcialmente purificada por ultrafiltração e por precipitação fracionada por sulfato de amônio, obtidas como descrito nos itens 3.3.2.2. e 3.3.2.3., respectivamente, foram analisadas após 30 dias a 4°C, e foi observado que não perderam atividade enzimática.

Guo-Qing *et. al* (2006) observaram que a preparação de nuclease P1 purificada de uma linhagem de *Penicillium citrinum*, manteve-se estável após 90 dias a 4°C em tampão acetato de sódio 50mM com 3mM  $Zn^{+2}$ , pH 5,4, sem da atividade enzimática.

**Tabela 17.** Resumo da purificação de nuclease P1 produzida por *P. citrinum* ATCC 14994.

Etapa de Purificação	Volume mL	Atividade de Nuclease U/mL	Total Atividade nuclease P1 U/mL	Proteína mg/mL	Total Proteína mg/mL	Atividade Específica (U/mg proteína)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto (sobrenadante do meio de cultura)	1000	106,7	106700	5,34	5335	20,0	1,00	100
Extrato bruto após tratamento a 65°C durante 15 minutos	1000	74,0	74000	3,46	3457,9	21,4	1,07	69,35
Fracionamento do extrato bruto após tratamento a 65°C durante 15 min. com sulfato de amônio	66,6	634,89	42284	7,94	528,5	80,00	4,00	39,63
Ultrafiltração do extrato bruto após tratamento a 65°C durante 15 min em membrana de 30KDa	100	222,67	22267	9,63	963,52	23,11	1,16	20,87



#### **4.3.1 Avaliação da presença da micotoxina citrinina na preparação enzimática de nuclease P1 parcialmente purificada obtida por tratamento a 65°C por 15 minutos seguido de ultrafiltração em membrana de 30kDa.**

A preparação enzimática de nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC14994 obtida por tratamento a 65°C por 15 minutos e em seguida ultrafiltração em membrana de 30kDa não apresentou a micotoxina citrinina em um limite de 10ppb (Figura 14) dando perspectivas positivas de sua utilização para a produção de 5´nucleotídeos monofosfato para o mercado de nutrição animal, humana e farmacêutica.

O controle da fermentação, insumos utilizados, temperatura e pH empregados e contaminação com outros micro-organismos gerando competição no meio, são itens citados como promotores da produção desse metabólito secundário por linhagens de *Penicillium citrinum* (Norberg 1993).


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - DAL**  
**LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL**  
 Rua Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001  
 Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3321-3392 / 3331-5391 - E-mail: labcal@ccia.ufsc.br



### CERTIFICADO DE ENSAIO

**Protocolo:** 3494 / 2013 **Data de Entrada:** 12/03/2013  
**Nome do Produto:** FERMENTADO - 160000006991  
**Data de Fabricação:** NA **Data de Vencimento:** NA  
**Marca:** **Nº do Lote:** NA  
**Data e Hora da Coleta:** NA/ - **Nº do Lacre:** NA  
**N. Amostras:** 1 **Peso/Volume:** 0035 mililitro  
**Amostrado e Coletado por:** Cliente **Embalagem:** frasco plástico  
**Fabricante:** AÇUCAREIRA QUATA S/A  
**Solicitante:** AÇUCAREIRA QUATA S/A  
**Responsável:** AÇUCAREIRA QUATA S/A  
**Av./Rua:** Fazenda São José, S/N  
**Complemento:**  
**Bairro:** Fazendas **CEP:** 17290000  
**Cidade:** São Paulo **UF:** SP  
**CNPJ/CPF:** 60.855.574/0002-54 **Inscrição Estadual:** 429061985110  
**Observações Gerais:**

#### RESULTADOS DE ENSAIOS

MICOTOXINAS E CONTAMINANTES ALIMENTARES	Técnico responsável:	Vídes Maria Scussel - DRF/SC 660
Citrinina	Não detectada (CTR) Adolfo Lutz, 1985.	(LDC: 10 µg/kg para citrinina) Instituto

**Metodologia(s):**

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. São Paulo: IMESP, 1985. 630 p.

#### CONCLUSÃO

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

Florianópolis-SC, 26 de Março de 2013

Obs.: Este CERTIFICADO DE ENSAIO, refere-se somente ao material submetido à análise e não poderá ser reproduzido, total ou parcialmente, sem a prévia autorização por escrito do LABCAL.

  
 Drª Vídes Maria Scussel  
 Gerente do Lab. de Micotoxinas e Contaminantes  
 Alimentares - CAL/CCAUFSC

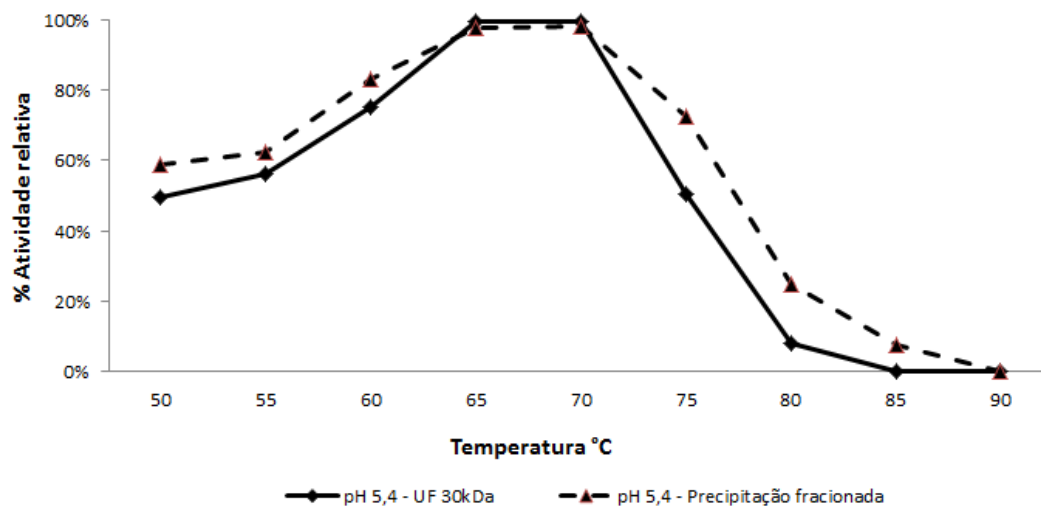
**Figura 14.** Certificado de ensaio de citrinina realizado na preparação enzimática de nuclease P1 obtida por tratamento a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração em membrana de 30kDa.

### **4.3.2 Características bioquímicas da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC 14994**

#### **4.3.2.1 Temperatura ótima de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC 14994.**

A Figura 15 ilustra que a nuclease P1 de *Penicillium citrinum* das preparações enzimáticas parcialmente purificadas por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos seguido de fracionamento com sulfato de amônio (item 3.3.2.2.) e tratamento térmico a 65°C por 15 minutos seguido por ultrafiltração em membrana de 30kDa (item 3.3.2.3.) apresentou temperatura ótima de atividade na faixa de 65 e 70°C em pH 5,4.

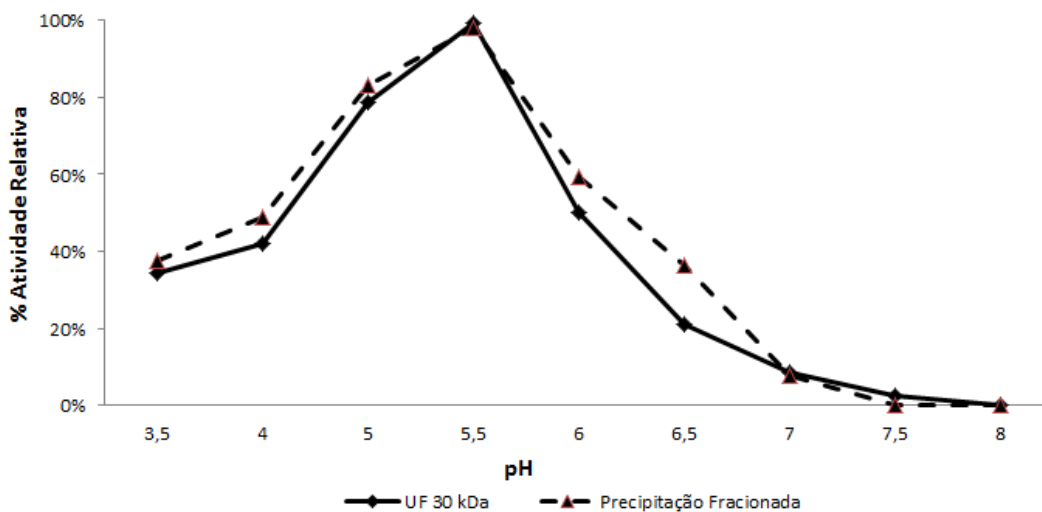
Os resultados obtidos para a temperatura ótima da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 incubadas em tampão acetato 0,125M pH 5,4 apresentou um valor muito próximo do obtido por Kuninaka *et. al* (1961) que relataram que a temperatura ótima de atividade da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* parcialmente purificada foi de 65°C. Guo Qing *et. al* (2006) purificaram e caracterizaram a enzima nuclease P1 de uma linhagem de *Penicillium citrinum* e a temperatura ótima da enzima purificada foi 69°C.



**Figura 15.** Temperatura ótima de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC14994 em pH 5,4.

#### 4.3.2.2 pH ótimo de atividade da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC14994

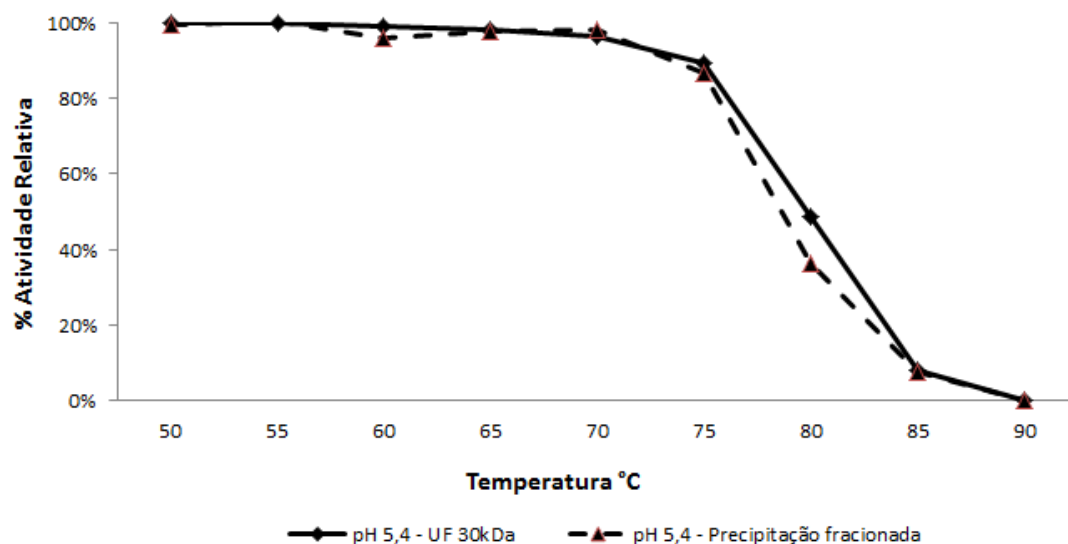
A Figura 15 ilustra que a nuclease P1 de *Penicillium citrinum* das preparações enzimáticas parcialmente purificadas por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos seguido de fracionamento com sulfato de amônio (item 3.3.2.2.) e tratamento térmico a 65°C por 15 minutos seguido por ultrafiltração em membrana de 30kDa (item 3.3.2.3.) apresentou pH ótimo de atividade em torno entre 5,4 e 5,5.



**Figura 16.** pH ótimo de atividade de nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC14994.

#### 4.3.2.3 Temperatura de estabilidade da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC14994

A Figura 17 ilustra que a nuclease P1 das preparações enzimáticas obtidas por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos, seguido de fracionamento com sulfato de amônio (item 3.3.2.2.) e por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos seguido por ultrafiltração em membrana de 30kDa (item 3.3.2.3.) mostrou-se estável a 70°C, retendo mais que 97% da atividade inicial após 30 minutos de tratamento térmico em pH 5,4. Após 30 minutos a 75°C e 80°C a enzima reteve respectivamente 90% e 50% da atividade inicial, sendo completamente inativada a 90°C por 30 minutos.



**Figura 17.** Temperatura de estabilidade da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC14994.

#### 4.4 Aplicação da nuclease P1 parcialmente purificada de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 na hidrólise de RNA e produção de 5' nucleotídeos monofosfato

No estudo da aplicação da preparação enzimática de nuclease P1 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos seguido de ultrafiltração em membrana de 30kDa e da preparação comercial de nuclease RP-1 da empresa Amano padronizada a 258U<sub>mL</sub><sup>-1</sup> de atividade na hidrólise de 100mL de solução de 1% de RNA de levedura foram obtidos respectivamente 77,3% e 58,9% de 5' nucleotídeos monofosfato. A Tabela 18 ilustra a porcentagem de 5' nucleotídeos monofosfato obtidos.

**Tabela 18.** Hidrólise enzimática de RNA em 5´nucleotídeos monofosfato utilizando nuclease comercial e de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 min e ultrafiltração em membrana de 30KDa.

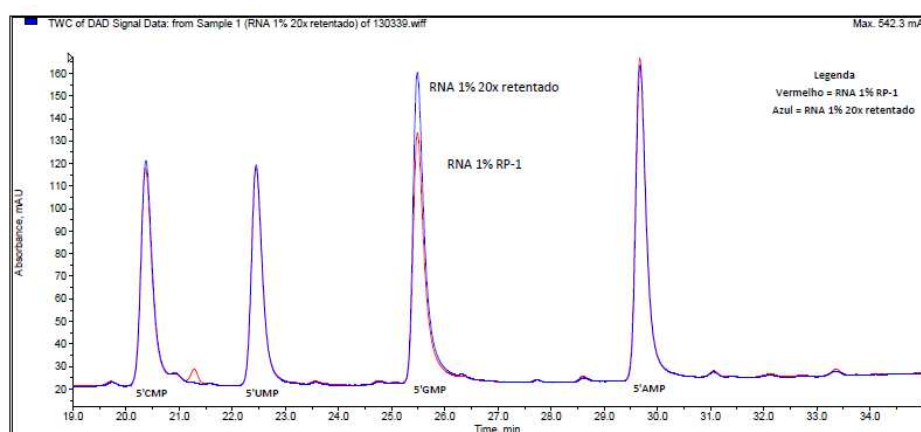
5´Nucleotídeos monofosfato	Nuclease Comercial RP-1 (AMANO)	Preparação enzimática de Nuclease de <i>Penicillium citrinum</i> ATCC 14994 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 min e ultrafiltração em membrana de 30KDa
5´CMP	9,60%	11,10%
5´UMP	17,50%	19,00%
5´GMP	14,60%	24,00%
5´AMP	10,70%	17,80%
<b>Total 5´Nucleotídeos monofosfato</b>	<b>58,90%</b>	<b>77,3%</b>

A Figura 19 ilustra os cromatogramas sobrepostos dos nucleotídeos 5´ fosfato formados após hidrólise de 1% de RNA de levedura utilizando-se preparações de nuclease P1 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração e enzima comercial Amano RP-1, analisados por HPLC em coluna C18 detector de arranjo de diodos.

Kuninaka *et. al* (1959) utilizando solução de 0,5% de RNA de levedura obtiveram 66,5% de hidrolise utilizando a nuclease de *Penicillium citrinum*.

Beinages *et. al* (1990) descreveram a produção de 5´ribonucleotídeos monofosfato por hidrólise enzimática de RNA de levedura utilizando nuclease parcialmente purificada de radícula de cevada. Os autores verificaram que era necessário utilizar baixa concentração de RNA (~0,1%), tempo de aproximadamente 1h, 60°C, pH 7,0, para obter bom rendimento de 5´ribonucleotídeos monofosfato. Os autores observaram inibição da nuclease de radícula de cevada em concentrações iniciais de RNA acima de 1,5g/L.

Em 2009 Noordan & Kortes estudaram a produção de 5´ribonucleotídeos em grande escala usando RNA de levedura. A suspensão de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* foi aquecida a 95°C por 10 minutos para inativação das enzimas endógenas. Em seguida a suspensão foi ajustada para pH 6,0 e tratada com protease comercial a 60°C por 4 horas. A suspensão foi ajustada para 65°C e pH 5,3 e tratada com 5´fosfodiesterase para a hidrólise do RNA da levedura e em seguida foi tratada com AMP – deaminase a 55°C e pH 5,1 para a conversão de 5´AMP em 5´IMP e ultrafiltrada em membrana de 100kDa. Foi obtido 1104kg de permeado em base seca contendo 13,5% de 5´GMP e 11,57% de 5´IMP analisados em HPLC.



**Figura 18.** Comparação dos cromatogramas sobrepostos da quantificação de 5´nucleotídeos monofosfato após hidrólise enzimática de solução 1% RNA pela preparação enzimática de nuclease P1 obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 min e ultrafiltração e enzima comercial.



## 5 Conclusão

No estudo da fermentação submersa de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 realizadas em frascos Erlenmeyer em incubador rotativo utilizando-se planejamentos experimentais para o estudo da composição do meio de cultura foi obtido um aumento da atividade de nuclease P1 de 46,93 U mL<sup>-1</sup> para 77,6 U mL<sup>-1</sup>, utilizando-se 50mL de meio de cultura nº3 composto de 3% de glicose, 0,2% de peptona, 0,5% de farinha de amendoim, 0,03% de ZnSO<sub>4</sub> e 0,12% de CaCO<sub>3</sub> ajustado para pH 6,0 e 1mL de inóculo contendo 10<sup>8</sup> esporos/mL.

No aumento de escala em biorreator de 5L utilizando o meio de cultivo nº3 nas condições definidas pelos planejamentos experimentais, foi obtido um aumento de 40,33% na produção de nuclease P1 após 96 horas de fermentação a 30°C, comparado com a fermentação em frascos Erlenmeyer agitados, sendo obtido 108,9U mL<sup>-1</sup> de atividade enzimática no extrato bruto.

Na purificação parcial da nuclease P1 de *Penicillium citrinum* ATCC 14994 do extrato bruto obtido pela fermentação em biorreator de 5 litros, utilizando tratamento térmico a 65°C por 15 min seguido de precipitação fracionada por sulfato de amônio foi obtido preparação enzimática contendo 634,89 U mL<sup>-1</sup> de atividade de nuclease P1, um fator de purificação de 4 vezes, e rendimento de 39,63%. Na purificação parcial do extrato bruto utilizando tratamento térmico seguido da ultrafiltração com membrana de 30kDa foi obtido preparação enzimática contendo 222,67U/mL<sup>-1</sup>, um fator de purificação de 1,16 vezes e rendimento de 20,87%.

A preparação enzimática de nuclease P1 parcialmente purificada obtida por tratamento térmico a 65°C por 15 min e ultrafiltração em membrana de 30KDa não apresentou micotoxina citrinina no limite de detecção de 10ppb.

A nuclease P1 parcialmente purificada apresentou atividade ótima na faixa de 65 a 70°C e em torno de pH 5,4 -5,5. A enzima mostrou-se estável após tratamento térmico a 70°C em pH 5,4 durante 30 minutos. Após 30 minutos de

tratamento térmico a 75°C e 80°C em pH 5,4 a enzima reteve respectivamente 90% e 59% da atividade inicial, sendo inativada completamente após 30 minutos a 90°C em pH 5,4.

No estudo da aplicação da preparação enzimática de nuclease P1 parcialmente purificada por tratamento térmico a 65°C por 15 minutos e ultrafiltração utilizando membrana de 30kDa na hidrólise de RNA de levedura foi obtida conversão de 77,3% em 5´GMP, 5´CMP, 5´UMP e 5´AMP, resultados que podem ser comparados com os obtidos pela nuclease comercial utilizada nesse estudo.

## 6 Referências Bibliográficas

AIRD, S. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v.40, p. 335–393, 2002.

ANDRADE, C.; ALMEIDA, V.V.; COSTA, L. B.; BERENCHTEIN, B.; MOURÃO, G. B.; MIYADA, V. S. Levedura hidrolisada como fonte de nucleotídeos para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.4, p.788-796, 2011.

BATISTA, P.P.; SANTOS, J.F.; OLIVEIRA, N.T.; PIRES, A.P.; MOTTA, C.M.; LUNA-ALVES, L. E. A. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p.706–717, 2008.

BEINAGES, M. D.; LÓPEZ-SANTIN, J.; SOLÁ, C. Partial purification of 5'-phosphodiesterase activity from barley rootlets. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p. 444-451, 1989.

BEINAGES, M.D.; LÓPEZ-SANTIN, J.; SOLÁ, C. Production of 5'-ribonucleotides by enzymatic hydrolysis of RNA. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p. 86-88, 1990.

BELLAVER, C. O uso de micro ingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. In: CONGRESSO MERCOSUL DE PRODUÇÃO SUÍNA. 2000, Buenos Aires, Anais, Buenos Aires: EMBRAPA, p.93-108, 2000.

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** 72, 248-254 (1976).

BELUHAN, S.; KARMEIC, I.; NOVAK, S.; MARIC, V. Partial purification and biochemical characterization of alkaline 5'-phosphodiesterase from barley malt sprouts. **Biotechnology Letters** v.25: 1099–1103, 2003.

BOWLES, L, K. 5'-Phosphodiesterase from barley shoots for RNA hydrolysis and its production. PCT WO 8909276; 1989, (cited from Chem. Abstr. 113: 4680 w (1990).

DAVIS, N. D.; DALBY, D.K.; DIENER, U. L.; SANSING, G. A. Medium-scale production of citrinin by *Penicillium citrinum* in a semisynthetic medium. **Applied Microbiology**, Jan, p. 118-120, 1975.

DEODA, A.J.; SINGHAL, R.S. 5'-Phosphodiesterase (5'-PDE) from germinated barley for hydrolysis of RNA to produce flavor nucleotides. **Bioresource Technology**, v.88, p. 245-250, 2003.

FUJIMOTO, M.; FUJIYAMA, K.; MIDORIKAWA, Y.; FUJISHIMA, T.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H. Properties of 5'- Phosphodiesterase from *Aspergillus niger*. **Agriculture Biology Chemistry**, v.41, n°5, p.737-744, 1977.

FUJIMOTO, M.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H. Specificity of nuclease from *Penicillium citrinum*. **Agriculture Biology Chemistry**, v.33, n°10, p.1517-1518, 1969.

FUJIMOTO, M.; KUNIKAKA, A.; YOSHINO, H. Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum*. **Agriculture Biology Chemistry**, v.38, p.777-783, 1974.

FUJIMOTO, M.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H. Distribution of P1 type nuclease in Genus *Penicillium*. **Agriculture Biology Chemistry**, v.41, n°7, p.1125 – 1131, 1977.

FUJIMURA, Y.; HASEGAWA Y.; KANEKO, Y. Studies on the nucleases produced by microorganism. Part III. Properties of partially purified phosphodiesterase (5'-nucleotide-Forming) Produced by *Pellicularia sp.* **Agriculture Biology Chemistry**, v.31, n°1, p.92 – 100, 1967.

FUJISHIMA, T.; UCHIDA, K. ; YUSHINO, H. Enzyme production by molds in sponge culture. **Journal Fermentation Technology**, 50:724-30, 1972.

GOMES, E.; SILVA, R.; SERZEDELLO, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. **Review Microbiology**, vol. 29, n°3 São Paulo Sept, 1998.

HARADA, S.; ITOU, J.; YANO, M.; AOYAGI, Y.; MAEKAWA, H. Yeast extract and process for its preparation. Patente EPO0299078A1, 26p. 1988.

JACKSON, L. K; CIEGLER, A. Production and analysis of citrinin in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Sep. p. 408-411, 1978.

KUNINAKA, A. Enzymic degradation of yeast ribonucleic acid and its related compounds by *Aspergillus oryzae*. **Journal of General and Applied Microbiology**, vol. 3, n°01, 1957.

KUNINAKA, A.; OTSUKA, S.; KOBAYASHI, Y.; SAKAGUCHI, K. Formation of nucleoside 5' - monophosphate from yeast ribonucleic acid by *Penicillium citrinum*. **Bull. Agr. Chem. Soc. Japan**, vol. 23, n°3, p. 239-243, 1959.

KUNINAKA, A.; KIBI, M.; YOSHINO, H.; SAKAGUCHI, K. Studies on 5'-phosphodiesterases in microorganisms, Part II. Properties and application of *Penicillium citrinum* 5'-phosphodiesterase. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 25, nº9, p.663-701, 1969.

LI, KE-DE; ZENG, Q.; XIANG, Z. Selection of biochemical mutants that overproduce nuclease P1 and optimization of the fermentation conditions. **Journal of Yunnan Agricultural University**, v. 22, p.556-562, Nov. 2007.

LI TAO. The environmental control of nuclease P1 synthesis by *Penicillium citrinum* AS3.2788 in submerged Fermentation. **Process Biochemistry**, v.28, p.467-473, 1992.

LU-E SHI; YI YU; TANG ZHEN-XING; XIONG WEN-YUE; MEI JIANG-FENG; GUO-QING YING. Nuclease P1 immobilized on DEAE cellulose. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27; nº1, p. 31-39, 2010.

LUE-E SHI; GUO-QING YING; TANG ZHEN-XING; CHEN JIAN-SHU; XIONG WEN-YUE, HONG WANG. Continuous enzymatic production of 5'-nucleotides using free nuclease P1 in ultrafiltration membrane reactor. **Journal Membrane Science**, v.345, p.217-222, 2009.

LUE-E SHI; GUO-QING YING; XIAO-YING ZHANG; ZHEN-XING TANG; JIAN-SHU CHEN; WEN-YUE XIONG; HUA-ZHANG LIU. Medium optimization for 5'-phosphodiesterase production from *Penicillium citrinum* using Response Surface Methodology. **Food Technology Biotechnology**, v.45, p.126-133, 2007.

LU-E SHI; TANG ZHEN-XING. Adsorption of nuclease P1 on chitosan nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.26, nº2, p. 435-443, 2009.

MACHADO, A. P. S. Uso de técnicas de detecção rápida de fungos filamentosos na água. **Dissertação de Mestrado em Tecnologia do Ambiente. Escola de Engenharia da Universidade do Minho, 2006, 99p.**

MONTANI, M.; VAAMONDE, G.; RESNIK, S. L.; BUERA, P. Temperature influence on *Penicillium citrinum* Thom growth and citrinin accumulation kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, nº 2, p. 115–122, 1988.

NAGODAWITHANA, T. W. Savory Flavors, 468p, 1995.

NAKAO, Y. Microbial production of nucleosides and nucleotides. **Microbial Technology Microbial Processes**, vol. 1, H.J. Peppler and D. Perlman (eds). Academic Press, New York, p. 311-354, 1962.

NIHEI, T.; CANTONI, G.L. Studies on soluble ribonucleic acid: the action of snake venom phosphodiesterase on soluble ribonucleic acid in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, nº12, p.234 – 237,1963.

NINOMIYA,K.; ROZIN, E. The fifth taste of human beings UMAMI the world. Cross Media Limited, 80p, 2ed, 2007.

NORBERG, A. N.; SERRA-FREIRE, N. M. Caracterização da dose letal mínima por irradiação gama para *Penicillium citrinum*. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v.35, nº6, p. 527-533, 1993.

NOORDAM, B.; KORTES, J.G. Processo for production of compositions containing ribonucleotides and their use as flavouring agents. Patente US20090148559A1, 10p, 2009.

OLMEDO, F; ITURBE, F.; GOMEZ-HERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ-MUNGUÍA. Continuous production of 5´-ribonucleotides from yeast RNA by hydrolysis with immobilized 5´-phosphodiesterase and 5´-adenylate deaminase. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.10, p.36-40, 1994.

OWEN, A. M.; BUTLER, L. G. The catalytic mechanism of bovine intestinal 5´-nucleotide phosphodiesterase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, nº11, p. 6941-6946, 1983.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage, 2.ed, Maryland: Aspen Publishers Inc. 1997.

PITT, J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic, London, p. 1–634, 1979.

POZO, S.; GIL, A. Nucleotides as semi essential nutritional components. **British Journal of Nutrition**, v.87, nº 1, p. S135–S137, 2002.

PUI, L.P.; ABDULKARIM, S.M.; GHAZALI, H.M. Effects of germination conditions on 5´-phosphodiesterase activity of selected seeds. **International Food Research Journal** v.19, nº4, p. 1641-1648, 2012.

QINTING HE; LI NAN; CHEN, X.; YE QI; BAI J.; XIONG J.; YING, H. Mutation breeding of nuclease P1 production in *Penicillium citrinum* by low-energy ion beam implantation. **Korean Journal Chemical of Engineering**, v.28, nº2, p.544-549, 2011.

REED, G.; NAGODAWHITANA, T. W. Yeast Technology, 2nd ed., 454 p.1991,

REINECCIUS, G. Flavor Chemistry and Technology, 2nd ed. CRC Press, p. 317-335, 2005.

RODRIGUES M. I; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2ª edição – Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, p.618, 2009.

ROKUGAWA, K.; FUJIMOTO, M.;KUNINAKA, A.;YOSHIDO, H. The role of zinc atoms in Nuclease P1. **Agriculture Biology Chemistry**, v.44 (8), p.1987-1988,1980.

SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology** v.49, p.1–266. 2004.

SILVA, E.N. Antibióticos intestinais naturais: bacteriocinas. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas, Anais Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p.15-24, 2000.

SINSHEIMER, L.; KOERNER, J. F. – **The Journal of Biological Chemistry**, v.6, p.293–296, 1952.

STEENSM, A.; VAN DIJCK, P.W.M.; HEMPENIUS, R.A. Safety evaluation of phosphodiesterase derived from *Leptographium procerum*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 935-944, 2004.

SUGITA, Y. Flavor Enhancers. Food Additives, CRC Press, capítulo 14, 2002.

TAVARES, V.B.; SIVIERI, K.; CERON, C.R.; SILVA, R.S.; TRABUCO, E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Quimica Nova**, v.21, p.722-725, 1998.

TUSSEL,R.T.; LAPPE, P.; ULLOA, M.; RAMAYO, A. Q.; FARFÁN, M.C.; SAAVEDRA, A.L.; BRITO, D.P. A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. **Molecular Biotechnology**, v.33, 2006.

VALÉRIO, A.A.; CORRADINI, A.C.; PANUNTO, P.C.; MELLO, S.M.; HYSLOP, S. Purification and characterization of a phosphodiesterase from bothrops alternatus Snake Venom. **Journal of Protein Chemistry**, Vol. 21, n. 8, Novembro, 2002

VOLBEDA, A.; LAHM, A.; SAKIYAMA, F.; SUCK, D. Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8 Å resolution, vol.10, n.7, p 1607-1618, 1991.

YING GUO-QING; LU-E SHI; YI YU; TANG ZHEN-XING; CHEN JIAN-SHU. Production, purification and characterization of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*. **Process Biochemistry**, v.41, p.1276-1281, 2006.

YING GUO-QING; LU-E SHI; YI YU; TANG ZHEN-XING; CHEN JIAN-SHU. The applications of mononucleotides and producing methods. **Food Research and Development**, v.25, 120-123 (2004).

YONEDA, M. Studies on the ribonuclease of *Streptomyces aureus*. **The Journal of Biochemistry**, v. 55, n<sup>o</sup>5, p. 475, 1964.

ZHU, Y.; KNOL, W.; SMITS, J.P.; BOL, J. Novel solid state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. **Biotechnology Letters**, v.16, p.643-648, 1992.

ZHU, Y.; KNOL, W.; SMITS, J.P.; BOL, J. Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.108-112, 1996.