URI – CAMPUS DE ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO DE UMA CELULASE COMERCIAL VISANDO A HIDRÓLISE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

GUILHERME ARDENGHI BALSAN

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim - RS, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

DEZEMBRO DE 2011

CARACTERIZAÇÃO DE UMA CELULASE COMERCIAL VISANDO A HIDRÓLISE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Guilherme Ardenghi Balsan

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de Alimentos. Comissão Julgadora:

Helen Treichel, D. Sc.
(Orientadora)

Marco Di Luccio, D. Sc.
(Orientador)

Marcio Antonio Mazutti, D. Sc.
(Orientador)

Gean Delise Leal Pasquali Vargas, D.Sc.
(UFFS)

Elisandra Rigo, D. Sc.
(URI - Campus de Erechim)

Erechim - RS, 16 de dezembro de 2011.

A maior de todas as torres começa aqui no solo. (Provérbio Chinês)

Dedico esta conquista à Haiala....

Por cada Dia... por todos os Dias... pelo Amor...

pela Amizade... pelo seu Tempo dedicado à

mim... por Você... Simplesmente: Obrigada por

existir e agigantar nosso desejo de viver,

"crescer" e vencer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ti Deus, que Faz existir e acontecer. Por conduzir-me a um caminho útil e cercado de pessoas as quais, como eu, são ferramentas de Seu Trabalho neste meu ignorante (ou insuficiente) entendimento a respeito da Vida e do Viver.

Desejo expressar minha gratidão àqueles que generosamente me ajudaram a desenvolver este trabalho com os fragmentos de seus conhecimentos e técnicas:

Aos meus familiares...

À Haiala.

Em especial, aos meus orientadores Professores Marcio Antonio Mazutti, Marco Di Luccio e Helen Treichel pela oportunidade e por compartilharem de seus conhecimentos, incentivarem e nortearem a realização deste trabalho, pelo respeito, confiança e amizade.

À Viviane, Tássio, Juliana, Débora, Pablo, Emanuel e Marceli pelo desenvolvimento de parte do trabalho e pela disponibilidade em me ajudar.

Aos demais colegas e amigos do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI Campus de Erechim - RS e dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Termodinâmica, pelos momentos de alegrias e descontração, e pelas experiências compartilhadas.

À URI – Campus de Erechim e ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação Apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Caracterização de uma celulase comercial visando a hidrólise de resíduos agroindustriais

Guilherme Ardenghi Balsan
Dezembro/2011

Orientadores: Helen Treichel

Marco Di Luccio

Marcio Antonio Mazutti

A enzima celulase possui grande aplicação em diferentes tipos de indústrias tais como têxteis, de papel, de produção de etanol a partir de biomassa, entre outras. As celulases atuam na hidrólise da celulose, o mais abundante polissacarídeo encontrado na natureza, presente na maioria dos materiais lignocelulósicos, incluindo madeiras, gramíneas e resíduos agrícolas. Os materiais lignocelulósicos despertam grande interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos, pois são uma fonte de carbono de baixo custo. A degradação desses materiais em açúcares monoméricos pela ação de enzimas celulolíticas tem grande importância, uma vez que os açúcares podem servir como matérias-primas para diversos processos de produção biotecnológica. As celulases oferecem uma oportunidade chave para alcançar enormes benefícios da utilização da biomassa. Portanto, as celulases podem tornar-se o maior volume de enzimas industriais, se o etanol a partir da biomassa lignocelulósica por via enzimática transformar-se viável economicamente. O presente trabalho propõe a caracterização de celulases comerciais em termos de pH e temperatura ótimos e de estabilidade, determinação de k_m e v_{max} para cada substrato estudado, ainda verificar a influência de cloreto sobre a atividade da enzima, objetivando a hidrólise de celulose de resíduos agroindustriais como bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, palha de trigo, inhame e yacon. A enzima apresentou temperatura e pH ótimo para a atividade hidrolítica na faixa de 40 - 50 °C e 5,2 - 5,5, respectivamente em tampão acetato de sódio 0,2 M. Em relação ao efeito do pH e temperatura sobre a estabilidade de celulase, observou-se que praticamente não houve perda de atividade em pH 5,0 e 5,5 e em temperatura entre 40 - 50 °C após 150 horas de reação. A enzima apresentou alta afinidade para a casca de soja, uma vez que seu valor de k_m 21,81 U.mL⁻¹ foi o menor entre os substratos, seguido de yacon, bagaço de cana, casca de arroz, palha de trigo e papel filtro. A menor afinidade foi obtida com inhame, com valor de k_m de 1207,68 μmol.mL⁻¹. A taxa de reação máxima (v_{max}) foi obtida usando o substrato inhame, seguido pelo filtro de papel, palha de trigo, yacon, bagaço de cana, casca de arroz e casca de soja. Quanto à adição de cloreto de sódio no meio reacional, observou-se que ocorreu inibição da enzima, uma vez que ocorreu diminuição da atividade enzimática.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

Characterization of a commercial cellulase for hydrolysis of agroindustrial residues

Guilherme Ardenghi Balsan
December/2011

Advisors: Helen Treichel

Marco Di Luccio

Marcio Antonio Mazutti

The cellulases may find many applications in different industries as textiles, paper, ethanol production from biomass, among others. These enzymes hydrolyze cellulose, the most abundant polysaccharide found in nature, which is present in most of lignocellulosic materials, including wood, grass and agriculture residues. The lignocellulosic materials are of great interest for the development of bioprocesses, since they are a low cost carbon source. The conversion of such materials into monomeric sugars by the action of cellulases is of great importance, since the sugars can be the substrate for many bioprocesses. The cellulases offer a key opportunity to the use of biomass. Thus, cellulases can become the largest volume of industrial enzymes, the ethanol from lignocellulosic biomass via enzymatic become economically viable. The present work characterizes commercial cellulases in terms of optimal pH and temperature for reactions, stability pH and temperature, determination of k_m and v_{max} for each studied substrate. The influence of chloride ion on enzyme activity was also assessed. The enzyme presented optima pH and temperature for hydrolytic activity between 40 – 50 °C and 5.2 and 5.5, respectively, in sodium acetate buffer 0,2 M. The activity was maintained at pH between 5,0 and 5,5, and at 40 - 50 °C, after 150 h of reaction. The enzyme apresented high affinity for soybean husk (k_m = 21,81 U.mL⁻¹), followed by yacon, sugarcane bagasse, rice husk, wheat straw and filter paper. The lowest affinity was found with yam (1207,68 µmol.mL⁻¹). Maximum reaction rate (v_{max}) was obtained using yam, followed by the rates obtained with filter paper, wheat straw, yacon, sugar cane bagasse, rice and soybean husk, with the addition of

viii

sodium chloride in the reaction, it was observed that there was inhibition of the enzyme, since a decrease in the enzyme activity.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO	X
LISTAS DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
II.1 Enzimas	6
II.2 Celulases	7
II. 3 Aplicações da enzima celulase	12
II. 4 Caracterização de celulase	15
II. 5 Materiais Lignocelulósicos	21
II.6. Composição dos materiais lignocelulósicos	22
II.6.1 Celulose:	23
II.6.2 Hemicelulose:	25
II.6.3 Lignina:	28
II.7 Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos	30
II.8 Considerações finais	33
CAPÍTULO III	35
MATERIAL E MÉTODOS	35
III.1 Enzima	36
III.2 Substratos avaliados	36
III.3 Caracterização da celulase	36
III.3.1 Temperatura e pH ótimos sobre a atividade de celulase	36
III.3.2 Determinação da energia de ativação da enzima	37
III.3.3 Determinação da termoestabilidade da celulase	37
	39

III.3.5 Influência da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade de celu	lase.39
III.3.6 Determinação das constantes de Michaelis-Menten	39
III.4 Medida de atividade de hidrólise em papel filtro	40
CAPÍTULO IV	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
IV.1 Temperatura e pH ótimo sobre a atividade de celulase	42
IV.2 Determinação da energia de ativação da celulase	51
IV.3 Termoestabilidade da celulase	52
IV.4 Influência do pH no estudo da estabilidade da enzima celulase	56
IV.5 Influência da concentração de cloreto sobre a atividade enzimática	57
IV.6 Efeito dos substratos sobre os parâmetros de Michaelis-Menten	59
CAPÍTULO V	67
CONCLUSÕES	67
CAPÍTULO VI	69
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
CAPÍTULO VII	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTAS DE FIGURAS

Figura II.1:	Complexo lignocelulósico: cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina	
Figura II.2:	Representação da cadeia linear de celulose	24
Figura II.3:	Componentes da hemicelulose	26
Figura IV.1:	Efeitos dos parâmetros do modelo que representam a atividade da enzima obtidos no primeiro DCCR utilizando tampão acetato de sódio	43
Figura IV.2:	Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) indicando a influência da temperatura e do pH sobre a atividade de celulase obtidos no primeiro DCCR utilizando tampão acetato de sódio	45
Figura IV.3:	Efeitos dos parâmetros do modelo que representam a atividade da enzima obtidas no segundo DCCR utilizando tampão fosfato de sódio	48
Figura IV.4:	Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) indicando a influência da temperatura e do pH sobre a atividade de celulase obtidos no primeiro DCCR utilizando tampão fosfato de sódio	50
Figura IV.5:	(a) Influência da temperatura entre 30 - 65 °C sobre a atividade enzimática, (b) Determinação da energia de ativação com base na equação de Arrhenius em uma faixa de temperatura entre 30 - 55 °C	52
Figura IV.6:	Influência da temperatura de 30 - 65 °C sobre a cinética de atividade enzimática	
Figura IV.7:	Determinação da energia de desativação com base na equação de Arrhenius em uma faixa de temperatura de 30 a 70 °C	55
Figura IV.8:	Influência do pH de 4,5 - 5,5 sobre a cinética de atividade enzimática	56
Figura IV.9:	Influência de cloreto de sódio (NaCl) sobre a atividade enzimática de celulase utilizando papel filtro e bagaço de cana como substratos	58

Figura IV.10:	Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Papel de filtro Watman	60
Figura IV.11:	Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Bagaço de cana	60
Figura IV.12:	Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Casca de soja	61
Figura IV.13:	Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Casca de arroz	61
Figura IV.14:	Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Palha de trigo	62
Figura IV.15:	Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Inhame.	62
Figura IV.16:	Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Yacon.	63
Figura IV.17:	Influência da concentração de substrato sobre a atividade enzimática	63

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1:	Diferenças entre celulose e hemicelulose	27
Tabela III.1:	Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2 ² , para otimização da atividade nos dois delineamentos experimentais (DCCRs)	37
Tabela IV.1:	Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura utilizando tampão acetato de sódio e papel filtro como substrato.	42
Tabela IV.2:	Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para atividade de celulase em termos do pH e da temperatura para o primeiro DCCR	44
Tabela IV.3:	ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o primeiro DCCR	44
Tabela IV.4:	Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura utilizando tampão fosfato de sódio e papel filtro como substrato	47
Tabela IV.5:	Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para atividade de celulase em termos do pH e da temperatura para o segundo DCCR	48
Tabela IV.6:	ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o segundo DCCR	49
Tabela IV.7:	Efeito da temperatura sobre o tempo de redução constante e inativação decimal obtidas durante a avaliação da termoestabilidade da celulase	53
Tabela IV.8:	Efeito do substrato sobre os parâmetros da equação de Michaelis- Menten sobre a atividade de celulase	64

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As enzimas celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol. É um componente essencial na degradação dos resíduos lignocelulósicos, produzidas por várias espécies de fungos, bactérias e protozoários. Aproveitando a capacidade hidrolítica destas enzimas, se permite a conversão eficiente de recursos naturais renováveis em açúcares fermentáveis (JORDAN, KUMAR e TEGHALAA, 2010).

Celulase (EC 3.2.1.4) se refere a uma classe de enzimas produzidas principalmente por fungos, bactérias e protozoários que catalisam a hidrólise de celulose. É um complexo enzimático composto por enzimas hidrolíticas e oxidativas, que sinergicamente promovem a degradação da celulose em glicose. Essa enzima é utilizada na indústria de alimentos, têxtil e farmacêutica. Também tem sido utilizado na indústria de papel e celulose para diversos fins. Tem havido um interesse crescente ao longo dos últimos anos sobre o uso de bioetanol, que se for produzido a partir de recursos renováveis, assim possibilitando seu uso como combustível (RAN *et al.*, 2009).

Atualmente as celulases são o terceiro maior mercado industrial de enzimas em todo o mundo, por volume de dólares, devido ao seu uso em processamento com algodão, reciclagem de papel, indústria de detergente, extração de suco, e como aditivos para a alimentação animal. No entanto, as celulases se tornarão o maior volume de enzimas na indústria, se o etanol, o butanol, ou algum outro produto de fermentação de açúcares, a partir da hidrólise da biomassa por estas enzimas, tornarem-se um dos principais combustíveis para o transporte (WILSON, 2009).

As tendências mundiais para o avanço científico e tecnológico na área de novos combustíveis destacam a importância da utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima nos processos de produção. A reutilização e reciclagem destes resíduos podem minimizar os problemas ambientais ligados ao seu acúmulo e diminuir o uso de combustíveis fósseis, além de resultar em uma melhora no aproveitamento da matéria-prima, que é de grande interesse na atualidade (RABELO, 2007). Tais resíduos são denominados também de biomassa lignocelulósica.

Para reduzir a dependência de combustíveis fósseis, novas alternativas precisam ser exploradas. A biomassa lignocelulósica é considerada uma fonte de energia alternativa atraente porque é renovável, disponível e abundante. Seus principais componentes

estruturais são a celulose e hemicelulose, polímeros de açúcares simples, que podem ser fermentados diretamente a etanol (RAHMAN *et al.*, 2009).

O Brasil é um dos principais países de atividade agrícola, e tem uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos gerada anualmente, possuindo um valor negativo na economia das operações agrícolas, provocando efeitos adversos sobre o ambiente, no decorrer da sua disposição final. A biomassa lignocelulósica, que consiste principalmente em celulose (35 - 50%), hemicelulose (25 - 30%) e lignina (25 - 30%) é uma potencial fonte de energia, combustíveis e produtos químicos. Na natureza, a lignocelulose é degradada de forma cooperativa por muitos microrganismos, mas esses microrganismos são difíceis de analisar, uma vez que é difícil ou até às vezes impossível cultiva-los (WANG *et al.*, 2011).

Diante desse cenário, há uma crescente busca pela maior utilização dos resíduos agroindustriais, devido a incessante demanda das atividades agrícolas. Entre estes resíduos, pode-se citar o bagaço de cana de açúcar, casca de soja, farelo, casca de arroz e palha de trigo, etc. A utilização destes resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos (PANDEY *et al.*, 2000).

Os materiais lignocelulósicos são matérias primas de grande potencial para produção de etanol por meio da tecnologia conhecida como hidrólise. A hidrólise dos materiais lignocelulósicos tem sido estudada com grande interesse nos últimos anos (DIAS, 2008). Esses materiais são uma fonte renovável de grande abundância no mundo, onde a celulose pode ser hidrolisada por enzimas, para a bioconversão destes compostos em açúcares fermentáveis para a produção de etanol. Estudos recentes já apontam esta alternativa para o processo de fermentação (DAWSON e BOOPATHY, 2007).

O complexo enzimático celulase possui um altíssimo valor econômico, e tem aplicações na área farmacêutica, industrial, alimentar agropecuária e outras. A possibilidade de transformar via ação enzimática os resíduos lignocelulósicos em glicose, ponto de partida para inúmeras outras aplicações, inclusive produção de bioetanol, o qual tem despertado o interesse geral da área acadêmica (DAOUD, KADDOUR e SADOUN, 2010; LI *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática do polímero de celulose é uma reação complexa com muitos fatores e dinâmica de mudança no conjunto à parte da reação geral. Várias pesquisas têm enfocado a avaliação de métodos que aumentaram a atividade de celulase, melhorando o rendimento e a taxa de reação de hidrólise. O custo de utilização da hidrólise enzimática é

baixo em comparação com outros tipos de hidrólise como a ácida ou a hidrólise alcalina porque a hidrólise enzimática é geralmente realizada em condições brandas de pH (pH 4,8) e temperatura (45 - 50 °C) (SINGH *et al.*, 2009).

Considerando o exposto acima, este trabalho propõe a caracterização da enzima celulase comercial Novozym NS 50013 objetivando a hidrólise de celulose de resíduos agroindustriais como bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, palha de trigo, inhame e yacon, além de papel filtro.

,	
CAPITULO II	
1 A DITI I I I I I I	
	

II.1 Enzimas

As enzimas são moléculas proteicas de alta massa molecular que atuam como catalisadores biológicos. São capazes de diminuir a energia de ativação (ordem de 10¹⁴) requerida para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto, aumentando a velocidade da reação sem alterar a constante de equilíbrio ou a variação de energia livre. São catalisadores de reações bioquímicas em sistemas biológicos, envolvendo reações com substratos. Estas são geralmente de natureza proteica, altamente específica e apresentam grande poder catalítico (LEMOS, 2006).

O uso de enzimas industriais foi gradualmente estendido nos últimos anos para uma variedade de campos como a produção de alimentos, cerveja, produtos farmacêuticos, têxtil e de detergentes, bem como em pesquisa e desenvolvimento. A especificidade catalítica da enzima, a eficiência hidrolítica, atoxicidade, solubilidade em água, biodegradabilidade e leve condições operacionais brandas de pH, temperatura, pressão, são os principais vantagens sobre os catalisadores inorgânicos (DAOUD, KADDOUR e SADOUN, 2009).

As enzimas são importantes componentes do metabolismo de todos os seres vivos, possuem a capacidade de catalisar reações. Assim são consideradas produtos naturais encontradas em abundância no corpo humano e na natureza, proteínas capazes de promover e acelerar reações químicas, os quais regulam grande número de processos biológicos. Presentes em microrganismos, animais e vegetais, elas são usadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos, mas sua importância só foi reconhecida em meados do século 19, quando cientistas descobriram como atuam. A partir de então, principalmente no século 20, o conhecimento sobre essas substâncias aumentou rapidamente. Foram estabelecidos os mecanismos de ação e as estruturas de milhares delas. Essa maior compreensão possibilitou o uso dessas proteínas especiais em processos industriais de diferentes áreas: médica, alimentícia, têxtil, química, de papel e celulose e muitas outras (MUSSATO *et al.*, 2007).

Grande parte das proteínas sintetizadas na célula são enzimas, definidas como enzimas intracelulares, citoplasmáticas, que somente podem ser obtidas e avaliadas por rompimento da célula. Há microrganismos que também têm a capacidade de sintetizar enzimas que são excretadas para fora da célula, podendo ser encontradas no meio de cultivo ou de propagação celular, as quais são facilmente isoladas e avaliadas e são

chamadas de enzimas extracelulares. A maioria das enzimas produzidas em escala industrial é extracelular, considerando que sua recuperação dos meios ou caldos de cultivo é geralmente mais simples, embora elas se encontrem numa forma muito diluída nestes meios, o que pode tornar esse processo muito dispendioso (KIELING, 2002).

Dentre as enzimas mais utilizadas atualmente, pode-se citar as proteases estão entre as enzimas mais utilizadas, estando presentes na indústria de detergentes, processamento de carne e soja e tratamento de couro (CHERRY e FIDANTSEF, 2003). A utilização de lipases ocorre em forma de catalizadores na produção do biodiesel e no aumento do poder de limpeza em detergentes (HASAN et al., 2006). As amilases estão presentes na formulação de detergentes enzimáticos e são importantes para conferir maior qualidade no processo de panificação e na fermentação da cerveja (MITIDIERI et al., 2006). As pectinases ajudam clarificar e melhoram o rendimento da extração de sucos de frutas (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005). Essa grande variedade de enzimas e ramos de aplicação para as mesmas, aliado com a necessidade da utilização de processos industriais menos agressivos ao meio ambiente demonstra o potencial para a aplicação de enzimas e justificam as pesquisas sobre elas (MUSSATO et al., 2007). Dentro deste contesto, há um grande espaço para aplicações de celulases.

As principais aplicações industriais de celulases estão na indústria têxtil e de detergentes domésticos para melhorar a maciez e o brilho, bem como na indústria de celulose e papel. No entanto, elas podem se tornar o maior volume de enzimas industriais, se o etanol a partir da biomassa lignocelulósica por via enzimática torna-se um importante combustível para transporte (WILSON, 2009).

II.2 Celulases

A celulase é uma enzima multicomponente que consiste em três diferentes enzimas (endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases) que agem sinergicamente para degradar o polímero de celulose, que é transformado em açúcares solúveis. O uso biotecnológico de celulase começou no início de 1980, primeiro na alimentação animal seguido de outros alimentos. Durante as últimas duas décadas, o uso de celulase aumentou consideravelmente, na indústria de celulose e papel e, especialmente, na indústria têxtil como agente para modificações de fibras e tecidos. As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua

hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (DAOUD, KADDOUR e SADOUN, 2009; WEDA, 2009; LIU e XIA, 2006).

Há uma grande variedade de microrganismos envolvidos na produção de celulases, incluindo fungos e bactérias aeróbias e anaeróbias. A maioria das celulases utilizadas em aplicações industriais é produzida por fungos filamentosos, tais como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, etc. No entanto, poucos fungos e bactérias possuem capacidade para produzir celulases com especificidades suficientes para solubilizar a celulose cristalina (SINGHANIA *et al.*, 2010).

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo, normalmente existe em uma forma complexa de celulose, lignina, hemicelulose, o que é conhecida como lignocelulose (WANG, 2011). A celulose é convertida em açúcares através de hidrólise ácida ou enzimática para depois ser fermentada para produzir etanol ou outros produtos de valor agregado. A degradação microbiana da celulose é total e específica. A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. Devido à estrutura cristalina, a celulose é insolúvel em água e é difícil de ser hidrolisada. A celulose pode ser convertida em um polímero solúvel em água e passível à ação de enzimas hidrolíticas por esterificação. As celulases, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira das células vegetais e, dessa forma, o acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento do processo de degradação (PALJEVAC *et al.*, 2007).

A bioconversão de resíduos de celulose até glicose é catalisada pelo grupo de enzimas celulases é um processo de crucial importância na ciclagem de nutrientes, sendo que a celulose representa cerca de 40% do material de origem vegetal. As celulases são enzimas que hidrolisam as ligações-β-1,4 em celulose e são encontrados em muitas famílias de glicosídeo hidrolases (PALJEVAC *et al.*, 2007; KHOSHNEVISAN *et al.*, 2011).

Para que ocorra a hidrólise enzimática da celulose são necessárias três etapas: adsorção de celulase para a superfície da celulose, hidrólise de celulose em glicose, e dessorção de celulase. Para que a hidrólise enzimática da celulose seja possível é necessário que ocorra a adsorção da enzima à superfície do substrato, com a formação de um complexo-enzima e celulose. A adsorção das celulases sobre o substrato promove, não

somente um contato físico entre estes componentes, mas em muitos casos pode desempenhar um importante papel na eficiência da hidrólise de celulose. (KLYOSOV, 1990).

As moléculas de celulose são lineares e associam-se umas as outras formando feixes fibrosos. Estes feixes apresentam duas regiões bastante distintas: uma região bastante organizada apresentando grandes quantidades de ligações de hidrogênio, chamada de região cristalina, dificultando bastante o processo de hidrólise, e outra completamente desorganizada, chamada de amorfa. Cada tipo de celulase acaba atacando preferencialmente uma região específica da celulose. A lignina é um componente não principal da celulose, e devido à sua alta cristalinidade, age como um fator limitante na velocidade da hidrólise da celulose, diminuindo a atividade enzimática (HAN e CHEN, 2009).

Segundo Lynd e Zhang (2002) e Hsu *et al.* (2011), o complexo celulásico é o conjunto de enzimas envolvidas na degradação da celulose. Este complexo origina-se de microrganismos, animais e plantas, dividindo-se em três grupos conforme seu local de atuação no substrato celulósico.

As celulases são pertencentes à família das glicohidrolases (3.2), e são classificadas por suas diferentes formas de ação:

Endoglicanases:

Endo-1,4-β-D-glicana (EC 3.2.1.4): Também conhecidas como endo-β-1,4 glicanases e carboximetil celulases. Enzimas cuja função é iniciar a hidrólise através da rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em moléculas menores. Catalisam a hidrólise interna de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose aleatoriamente, gerando oligossacarídeos de menor peso molecular, chamados de celodextrinas e consequentemente novas cadeias terminais, além de celobiose. Agem de forma aleatória ao longo da cadeia, produzindo novas locais de ataque para as exoglicanases, resultando em uma rápida diminuição da viscosidade e aumento relativamente pequeno do poder redutor. A região catalítica da enzima é dada pela forma que permite a ligação da enzima e a hidrólise na parte média da fibra da celulose. Seu substrato natural é a celulose e xeloglicana. Atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade diminui conforme o encurtamento da cadeia de celulose

(PALJEVAC et al., 2007; LYND et al., 2002; PERCIVAL e ZHANG et al., 2006; CHEN et al., 2010).

Exoglicanases:

São enzimas divididas em duas classificações: glicanohidrolases ou 1,4-β-glicana glicanohidrolases (E.C. 3.2.1.74) e celobiohidrolases ou 1-4-β-celobiohidrolases (3.2.1.91). As glicanohidrolases possuem estratégias de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, devido à sua capacidade de liberar glicose diretamente do polímero. As celobiohidrolases atuam como exo-enzimas na liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose (CHEN *et al.*, 2010).

As exoglicanases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose. Quebram as unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora do polímero, respectivamente. Logo, as exoglicanases liberam a celobiose rompendo as ligações β-1,4-D-glicosídicas. São responsáveis pela amorfogênese, fazendo parte da hidrólise primária da fibra. A amorfogêne é um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, através do aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, porque torna as regiões cristalinas mais expostas às celulases (LYND e ZHANG, 2002; UEDA *et al.*, 2009).

β-glicosidases

β-D-glicosídeo glicohidrolase (EC 3.2.1.21): Também conhecidas como celobiases.

Não são considerados como celulases legítimas, mas desempenham um papel importante no processo, porque completam o processo através da hidrólise da celobiose e outros oligossacarídeos curtos à glicose (CHEN *et al.*, 2010). São classificados em três famílias de β-glicosidases ou GH: GH1, GH3 e GH9. A GH1 e a GH3 são famílias com um mecanismo de retenção, enquanto a GH9 apresenta um mecanismo de inversão e contém principalmente endoglicanases. Caracterizam-se como enzimas que possuem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose. Perdem sua atividade com o aumento da extensão da cadeia de celulose. Efetuam a hidrólise de resíduos terminais de β-D-glicose em oligossacarídeos (UEDA *et al.*, 2009; LYND *et al.*, 2002; SAIBI e GARGOURI, 2011). São muito importantes para os fungos produtores de celulases por hidrolisarem a celobiose,

que é um forte inibidor de celobiohidrolases, e minimizam a inibição do produto final, que são as enzimas celulases. Mas também convertem celobiose em sefarose, que é um indutor muito potente de genes celulolíticos (SAIBI e GARGOURI, 2011).

Diversos estudos têm relatado a ação sinérgica dos componentes individuais do sistema de celulases, principalmente endo e exoglicanase sobre a celulose insolúvel (MEDER, 2003). As endoglicanases e celobiohidrolases podem causar dispersão da celulose, seja por ação hidrolítica ou mecânica. A ação de dois ou mais componentes celulolíticos individuais é maior do que a soma de cada ação individual e aumentam a taxa de hidrólise dos substratos. Os estudos sobre esses mecanismos de ação são complexos, pois o efeito sinérgico varia em relação às múltiplas formas dos componentes celulolíticos (diferentes celulases e isoformas), às fontes de celulases e às amostras de celulose (SCHÜLEIN, 2000).

A hidrólise enzimática das pontes glicosídicas ocorre via um mecanismo ácido/base, sendo necessários dois resíduos de aminoácidos: um atuando como ácido fornecendo um próton ao oxigênio da ligação e o segundo resíduo atuando como um nucleófilo que interage com o oxocarbono ou promove a formação do íon OH da molécula de água (SCHWARS, 2001; RABINOVICH *et al.*, 2002a). O mecanismo catalítico mediado por β-glicosidades requer a presença de dois resíduos de aminoácidos no sítio catalítico. A reação ocorre em um ou dois passos de deslocamento, dependendo do espaço entre os dois resíduos de ácido, 9,5 ou 5,5 °A, respectivamente, levando a um mecanismo de inversão ou retenção de acordo com a configuração do carbono anomérico da molécula glicona liberada (SAIBI e GARGOURI, 2011)..

A maioria das enzimas celulolíticas são proteínas multifuncionais, sendo compostas por pelo menos três elementos estruturais, com diferentes funções: domínio catalítico (DC); domínio ligador de celulose (*cellulose binding domain*) e interdomínio. As enzimas com sequencias similares (domínios catalíticos) têm diferentes especificidades (exo ou endo-hidrólise), sugerindo que seja em consequência de detalhes na estrutura tridimensional da proteína. As sequencias dos domínios ligadores são menos variáveis, são identificados como módulos ligadores a carboidratos (*carbohydrate-binding-module*) e são definidos como uma sequencia de aminoácidos contíguos, dentro de uma enzima ativa sobre o carboidrato. As enzimas celulolíticas compreendem 15 famílias das 99 famílias de glicosil hidrolases. Esta nomenclatura é aplicada para uma variedade de domínios catalíticos da enzima. Entretanto, baseado nos domínios ligadores à celulose, pode-se ainda

fazer uma nova classificação, dentro de 13 famílias, a qual não necessariamente acompanha as mesmas famílias de domínio catalítico (DC) (LYND *et al.*, 2002; RABINOVICH *et al.*, 2002b).

Embora as enzimas celulolíticas possuam especificidades para ligações β -1,4, as celulases isoladas de várias fontes e de um mesmo microrganismo, demonstram importantes diferenças funcionais em sua maneira de atuar: em relação ao substrato (grau de pureza, cristalinidade, tamanho das partículas), quanto às suas características moleculares (massa molecular, composição e sequência de aminoácidos, ponto isoelétrico), na adsortividade sobre a celulose, em sua atividade catalítica e especificidade ao substrato (MEDER, 2003).

II. 3 Aplicações da enzima celulase

As celulases tiveram seu uso mais intenso no início da década de 80, inicialmente na indústria da alimentação animal e também na indústria de alimentos. Posteriormente verificou-se sua aplicação na indústria têxtil e lavanderia. O grupo de enzimas formado por celulases, pectinases e hemicelulases corresponde a aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas, possuindo o gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* como principais produtores (BHAT, 2000; DAOUD, KADDOUR e SADOUN, 2009).

As comunidades científicas têm fortes interesses nas celulases devido às suas aplicações em indústrias de processamento de amido, de produção de alimentos de origem animal, fermentação de álcool de cereais, malte e cerveja, extração de sucos de frutas e vegetais, celulose e indústria de papel, e indústria têxtil. No entanto, a grande dificuldade na aplicação da celulase na indústria é o alto custo da enzima e da produção. Uma substancial redução de custos poderá ser possível se forem exploradas formas de conversão de celulose utilizando enzimas produzidas por microrganismos (GAO *et al.*, 2008).

Na indústria de alimentos, as celulases são utilizadas em processos de maceração, normalmente associadas com hemicelulases e pectinases. A extração de sucos de frutas e óleo de sementes é um exemplo. Outra importante aplicação é na filtração e clarificação dos sucos de frutas, para aumentar a efetividade da extração da cor de sucos e na liquefação do tecido vegetal, possibilitando melhor extração de pigmentos dos frutos (BHAT, 2000; DAOUD, KADDOUR e SADOUN, 2009). Enzimas como as celulases e α-amilases são usadas atualmente por várias indústrias para hidrolisar celulose ou amido para

gerar produtos como dextrinas, xaropes e açúcares. Tais reações representam o primeiro passo fundamental em direção à produção de uma variedade de produtos químicos úteis e adoçantes (SAVILLE, 2004).

As celulases comerciais são principalmente enzimas extracelulares produzidas por fungos mesofílicos ou termofílicos. Assim, o uso de enzimas celulose degradantes está relacionada ao processamento industrial e operacional em alta temperatura, e a aplicação de enzimas termoestáveis produzidas por fungos mesofílicos ou termofílicos torna-se vantajosa pois podem produzir enzimas com maior estabilidade à altas temperaturas (GAO *et al.*, 2008).

Durante a fabricação do vinho, no âmbito das celulases, as β -glicosidases possuem poder de liberar compostos aromáticos, como terpenos, compostos fenólicos de capacidade antioxidante, nutracêutica e flavorizante (DAROIT *et al.*, 2007). Para indústria de alimentos, a grande importância refere-se à utilização de infusões de β -glicosidases associadas com pectinases propiciando que aromas e características voláteis de frutas e vegetais aumentem (BHAT, 2000).

No contexto da indústria têxtil, o uso das celulases visa à remoção do excesso de corantes em tecidos jeans, configurando um processo denominado bioestonagem. Através deste processo, os jeans adquirem aparência "lavada", causando menores danos às fibras do tecido se comparado com a utilização de pedras-pomes (MUSSATO *et al*, 2007). Neste mesmo campo tem-se ainda, através da utilização de celulases, a redução do tempo de uso das máquinas que realizam a estonagem, o aumento da produtividade, a melhoria nas condições de segurança no ambiente de trabalho e condições de automação do processo. O principal desafio da aplicação das celulases na indústria têxtil é o uso de formulações corretas para a utilização das enzimas (BHAT, 2000).

Nas lavanderias, as celulases podem auxiliar na remoção de microfibras desfiadas de algodão, formadas depois de repetidas lavagens do tecido. Atuam também na restauração da cor e brilho de roupas de algodão, para evitar a formação de fibras pequenas que saem da superfície do tecido e também na formação de glomérulos de fibras atadas ao tecido (pilling) (BHAT, 2000; CHEN *et al.*, 2006).

O uso de celulases no processo de fabricação da polpa de celulose possibilitou uma economia de energia em 20%, podendo chegar até 40%, conforme o momento e tipo de enzima aplicada. Essas enzimas são utilizadas na modificação das propriedades das fibras, permitindo o desenxague das fibras, aumentando a velocidade da fabricação do

papel (BHAT, 2000). Na indústria da polpa de papel, as celulases auxiliam na fabricação de papel reciclado, uma vez que sua ação enzimática ajuda no processo de despigmentação da matriz celulósica, gerando o aumento da drenagem da água presente na polpa do papel para a formação das folhas de papel (PELACH, 2003). Na indústria de papel, as celulases são usadas ocasionalmente para dissolver o lodo das fibras e para melhorar a drenagem das fibras esteiras. A remoção de lodo das fibras reduz oclusão dos poros na folha. O uso de enzimas celulases para converter lodo fibroso celulósico em produtos com maior valor agregado foi proposto, mas ainda não foi amplamente aplicado (LU, REYE e BANERJEE, 2010).

Outra aplicação é na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, que se configura como tendência mundial, buscando obtenção de açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (PERCIVAL ZHANG et al., 2006). A hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos e fermentação de açúcares redutores para a produção de biocombustíveis e metabólitos desejados é uma estratégia promissora para a utilização eficiente de recursos renováveis. O principal entrave nesta área é o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção de enzimas, e a necessidade de produzir enzimas mais eficientes para hidrólise (CHENG, 2002). As formas puras de substrato, tais como papel filtro e algodão são matérias primas caras usadas pelos pesquisadores para a produção de celulase em larga escala. A significativa redução do custo será importante para o uso comercial das celulases, produzindo essas enzimas usando substratos mais baratos (SINGH et al., 2009).

A demanda por celulases esta consistentemente em ascensão devido às suas diversas aplicações, resultando em várias empresas envolvidas na produção de celulases. Globalmente, existem duas grandes companhias conhecidas na produção de celulase para a conversão de biomassa, a "Genencor" e a "Novozymes". Ambas as empresas tem desempenhado um papel significativo em reduzir o custo das celulases devido às várias pesquisas ativas e por adoção de tecnologias inovadoras (SIGHANIA *et al.*, 2010).

A expectativa é de que o mercado de celulases pode ser superior a 400 milhões de dólares por ano, sendo estas aplicadas para a hidrólise de resíduos agrícolas nos Estados Unidos da América visando a produção de etanol de biomassa (PERCIVAL ZANGH *et al.*, 2006). Em decorrência destas necessidades e tendências, prevê-se um aumento significativo do consumo destas enzimas a nível internacional. Este cenário é

particularmente importante para o Brasil, em função do investimento no desenvolvimento de tecnologia referente à hidrólise enzimática de materiais amiláceos e lignocelulósicos para a produção de etanol de segunda geração. No entanto, um dos maiores empecilhos da utilização de enzimas para a hidrólise de resíduos agroindustriais para a produção de etanol é o custo destas enzimas, o qual gira em torno de 30 - 50% do custo total de produção. De acordo com o relatório elaborado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos de 2011, o Brasil tem um excedente de 4,7 bilhões de kg de bagaço de cana seco, que renderia aproximadamente 1,2 bilhões de litros de etanol. Considerando o uso de 10 U.m.L⁻¹ de celulase por grama de bagaço, o Brasil necessitaria de uma produção estimada de 47 trilhões de U.m.L⁻¹ por ano. Se for considerada a hidrólise de resíduos ricos em amido, este cenário é ainda mais amplo. De acordo com o mesmo relatório, o etanol de segunda geração somente será viável do ponto de vista econômico caso o custo total com as enzimas ficar abaixo de US\$ 0,16 por litro de etanol.

II. 4 Caracterização de celulase

A caracterização bioquímica das enzimas ganha destaque por fornecer dados para compreender a atuação e as alterações ocorridas, além de fornecer dados que devem ser considerados no momento da aplicação da enzima em um processo. Temperatura e pH ótimos, estabilidade de temperatura e de pH, além de outros parâmetros são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático (LU, REYE e BANERJEE, 2010). Contudo, o conhecimento de temperatura e influência de pH na atividade enzimática é mesmo importante para determinação de taxas de reação ótimas. Temperatura alta e pH baixo podem diminuir o risco de contaminação, melhorando a solubilidade de algum substratos, e podem também reduzir a formação de cor em alguns xaropes. Apesar dessas vantagens, o uso de enzimas em aplicações industriais tem sido limitado, em primeiro lugar porque a maioria das enzimas é relativamente instável. Segundo, porque os custos de isolamento e purificação de enzimas ainda são elevados, e finalmente, é tecnicamente caro para recuperar as enzimas ativas a partir da mistura de reação após a conclusão do processo catalítico (VANDAMME e DERYCKE, 1983; DAOUD, KADDOUR e SADOUN, 2009).

As reações enzimáticas são influenciadas pela temperatura, onde o aumento da temperatura leva ao aumento da velocidade de reação em função da maior energia das moléculas. O resultado destas interações é um perfil com uma velocidade máxima a uma

temperatura denominada de temperatura ótima e em seguida a desnaturação da enzima. Em relação ao pH, observa-se o mesmo comportamento da temperatura. Este efeito ocorre em função de 3 fenômenos independentes: pela desnaturação irreversível das enzimas em valores extremos de pH, em função da perda da estrutura pela ruptura e pela ionização do substrato ou pelo estado de ionização da enzima. O pH no qual a enzima atinge a sua máxima atividade as vezes não coincide com o pH em que se observa a sua máxima estabilidade (MINGUÍA e RAMÍREZ, 1987; TREICHEL, 2004).

Vários estudos vêm enfocando a caracterização de celulase em termos de parâmetros como pH e temperatura, os quais estão sendo realizados devido à um grande interesse na compreensão da ação destas enzimas nas mais distintas condições de processo. Entretanto, a maioria desses estudos descreve a avaliação de um parâmetro em um momento. Encontrar o pH e temperatura ótimos inclui um estudo de ambas as variáveis ao mesmo tempo. Neste contexto, o uso de ferramentas estatísticas que resultam na aplicação de delineamento experimental seguido por metodologia de superfície de resposta (RSM) para identificar os valores ótimos de pH e temperatura, bem como analisar as relações entre estes parâmetros torna-se muito interessante. Essa interação pode resultar em um efeito sinérgico, ou seja, um pH e uma condição de temperatura em que as enzimas têm um valor maior de atividade. O método convencional de otimização de um sistema de análise de um fator de cada vez pode consumir muito tempo e, além disso, tal metodologia não acessa a interação de efeitos entre as variáveis (FARINAS et al., 2010). As celulases comerciais geralmente operam com máxima eficiência em temperaturas de aproximadamente 50 °C hidrolisando substratos como papel de filtro ou celulose cristalina. Uma desvantagem desse ponto ótimo da enzima é que a mesma necessita de calor e com isso aumenta os custos do processo (LU, REYE e BANERJEE, 2010).

Um dos principais microrganismos produtores de celulase é o *Trichoderma reseei*. Porém, a celulase produzida por esse fungo possui uma deficiência no sistema de atividade, o que leva à hidrólise incompleta de celobiose, causando forte inibição das enzimas. Este problema pode ser superado pela adição extra de β-glucosidase produzidas a partir de *Aspergillus niger* (JEYA *et al.*, 2010). Como podem ser observados, vários fatores afetam a hidrólise enzimática de celulose, incluindo os substratos, a atividade de celulase, e as condições de hidrólise, tais como a temperatura e pH. Assim, a presente pesquisa buscou a otimização do processo de hidrólise e o reforço da atividade de celulase, a fim de melhorar o rendimento e a taxa de a hidrólise enzimática.

As enzimas, como qualquer outra proteína, sofrem desnaturação térmica, perdendo sua atividade parcial ou totalmente. Desta forma, é de grande importância o conhecimento da estabilidade térmica, sendo que dentro de um contexto biológico, o calor é o que provoca mais modificações nas proteínas (SANTOS, 2002; GOMES, *et al.*, 2007). As proteínas possuem temperaturas características nas quais apresentam o máximo de estabilidade. A maioria das proteínas são estáveis à temperatura de refrigeração, outras em temperatura ambiente (caso das celulases). À medida que a temperatura se eleva acima de 40 - 50 °C, praticamente todas as proteínas tornam-se instáveis, tendendo a uma alteração de sua conformação original (SOUZA, 2008).

Geralmente esta desnaturação é irreversível, significando perda definitiva do poder catalisador. Esta desnaturação pode ser mais ou menos rápida, dependendo das condições do meio. Em relação à temperatura, ela é mais estável quanto mais baixa for o valor da temperatura. Outros fatores também influenciam na estabilidade da enzima: por exemplo, pH, concentração de sais, concentrações de íons, etc. O ideal é conhecer estas condições de ótima estabilidade não só para o armazenamento do produto, como também para minimizar a perda durante um processo (BAILEY e OLLIS, 1986).

A estabilidade térmica é dependente das condições do meio em que se encontra a enzima, se a mesma está imobilizada e/ou complexada a outro componente e ainda pode ser influenciada pela própria concentração de substrato (BAILEY e OLLIS, 1986). É a capacidade que a enzima solúvel ou imobilizada possui de manter seu potencial catalítico quando submetida a uma dada temperatura por um dado tempo (ARROYO et al., 1999). As características de termoestabilidade do sistema enzimático celulolítico é a chave para o interesse industrial de hidrólise da celulose. Enzimas celulolíticas termostáveis têm larga aplicação em indústrias de alimentos e glicose, onde o processo de alta temperatura, como a pasteurização, é usado (SINGH et al., 2009).

A triagem e desenvolvimento de enzimas de degradação de celulose com características especiais são questões chave na pesquisa atual das celulases. A termoestabilidade elevada e a tolerância ao pH alcalino são alguns dos objetivos mais comuns para fornecer melhoria da enzima sob vários processos realizados em temperaturas e pHs elevados. Em muitos dos processos o papel essencial das celulases termoestáveis e alcalinas é claramente definido, enquanto que em outras aplicações, como na hidrólise da lignocelulose para produzir açúcares solúveis que posteriormente podem ser fermentados para etanol ou outros produtos químicos, a disponibilidade de celulases com temperatura e

pH ótimos ainda não foi definida como um pré-requisito para um processo ser viável (SZIJARTÓ et al., 2008).

Com a caracterização de celulases têm sido alcançados consideráveis avanços em relação à identificação e caracterização de catalisadores, resíduos de ligação e a captura de complexos de enzima substrato. No entanto, a compreensão do mecanismo de degradação do substrato natural de celulose cristalina permanece um grande desafio, pois há vários obstáculos ainda há serem superados. Uma série de características específicas, tais como maior eficiência catalítica em substratos celulósicos insolúveis, uma maior estabilidade a temperaturas elevadas e com um pH seguro, e tolerâncias mais elevadas à inibição do produto final são desejáveis em enzimas celulases para a conversão de biomassa lignocelulósica (SINGHANIA *et al.*, 2010).

A estabilidade da enzima em relação ao pH, é uma informação de grande importância na etapa de caracterização. Entretanto, esta etapa depende de outros fatores, como por exemplo: temperatura, força iônica, concentração de íons metálicos, natureza química do tampão, concentração do substrato e concentração da enzima (SANTOS, 2002). Em aplicações industriais, a hidrólise enzimática de celulose para produção de etanol geralmente ocorre em baixos valores de pH (GAO *et al.*, 2011). Devido ao fato da enzima possuir vários grupos ionizáveis, mudanças no pH afetarão o sítio catalítico e a conformação da enzima. Em geral, enzimas são ativas numa faixa limitada de pH e para cada enzima existe um ótimo ou uma faixa ótima de atuação (BAILEY e OLLIS, 1986).

Como pode ser observado, a etapa de caracterização da enzima é essencial tanto para o estabelecimento das condições de trabalho e aplicações, quanto para a determinação da temperatura e pH ótimos e de estabilidade.

Liu *et al.* (2011) estudaram celulases produzidas em estado sólido pelo fungo *Aspergillus fumigatus* utilizando materiais lignocelulósicos como substratos e verificaram que a enzima apresentou temperatura e pH ótimos para a atividade de carboximetilcelulase (CMCase) de 50 °C e 5,0, respectivamente. A enzima mostrou-se estável quando incubada em faixas de temperatura de 40 - 50 °C e pH de 4,0 - 8,0.

Triverdi *et al.* (2010) verificaram que a celulase purificada produzida por cepas de *Bacillus flexus* NT isolados de Ulva lactuca apresentou temperatura ótima de 45 °C e pH ótimo de 10,0. A enzima apresentou boa estabilidade para pH, sendo estável na faixa de 9,0 - 12,0 e manteve sua atividade residual em cerca de 70 %, mesmo com a adição de sal (NaCl 18%). Quanto a termoestabilidade, a enzima manteve 100% de atividade a 4 °C e

diminuiu para 47% a 35 °C. Os íons metálicos Cd²⁺ e Li¹⁺ foram indutores, enquanto Cr²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ e o metal quelante EDTA inibiram significativamente a atividade da enzima. A atividade enzimática foi insensível ao etanol e isopropanol, enquanto parcialmente inibida por cicloexano, acetona e benzeno.

Celulases ativas e estáveis a altas temperaturas e intervalos de pH alcalinos são de especial interesse na indústria de detergentes, onde as enzimas devem estar ativas em condições severas para lavagem (WANG et al., 2005, SIMONAKA et al., 2006). Além disso, as celulases podem ser aplicadas para facilitar a destintagem nas células de flotação na indústria de reciclagem de papel, que geralmente operam sob condições de temperatura e pHs alcalinos (SINGH et al., 2009).

Heidorne *et al.* (2005) estudaram celulases de *Ceriporiopsis subvermispora* cultivadas de cavacos de madeira de *Eucalyptus grandis* e *Pinus taeda* após 30 dias de cultivo. As características bioquímicas das celulases produzidas em ambas às espécies de madeira foram similares. Os pHs ótimos das enzimas foram entre 4,0 e 5,0 e a temperatura ótima foi de 60 °C.

Ko *et al.* (2010) caracterizaram celulases purificadas de *Paenibacillus campinasensis* BL11 (Cel-BL11), com peso molecular de 38 kDa. A temperatura e o pH ótimos foram, respectivamente, 60 °C e 7,0. A enzima manteve mais de 80% de atividade após 8 horas a 60 °C em pH 6,0 e 7,0. Os íons Hg²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺ inibiram fortemente a atividade enzimática, enquanto que Mn²⁺ e Co²⁺ promoveram fortemente a atividade da enzima. Outros surfactantes, SDS, Triton X-100, Tween 20, e EDTA, inibiram a atividade celulolítica em extensões menores.

Busto, Ortega e Perez-Mateos (1996) caracterizaram celulases obtidas de culturas de *Trichoderma reesei*. Utilizando carboximetilcelulose como substrato, a enzima apresentou atividade máxima em uma faixa de pH de 4,5 - 5,5, diminuindo acentuadamente em pH superior a 5,5. A estabilidade da enzima foi entre 50 e 70 °C, com atividade máxima a 60 °C.

Ueda *et al.* (2010) estudaram um complexo de celulases purificadas obtidas de *Clostridium* sp., também utilizando carboximetilcelulose como substrato e a enzima demonstrou temperatura e pH ótimos de 40 °C e 5,0, respectivamente. O complexo enzimático foi estável até 40 °C e apresentou boa estabilidade em baixas temperaturas, mantendo 44% da atividade a 15 °C. Ao que tange à estabilidade de pH, o complexo enzimático de celulases purificadas mostrou-se estável na faixa de 7,0 – 9,0.

Dienes, Egyházi e Réczey (2003) trabalharam com celulases comerciais de *Trichoderma* sp. Uma mistura de diferentes componentes da celulase (Pergalase A40) foi comparada com endoglucanase III (IndiAge Super L) com base em seus efeitos sobre a drenagem, retenção de água de valor, distribuição de comprimento da fibra e propriedades do papel (ar permeabilidade, índice de tração, índice de ruptura, índice de rasgo). Características das enzimas foram investigadas a fim de estabelecer a aplicabilidade industrial. A IndiAge Super L contendo apenas endoglucanase III provou ser mais estável do que a Pergalase A40 em termos de temperatura e pH pois exibiu excelentes faixas de estabilidade tecnologicamente desejáveis na indústria (pH de 4,0 – 6,0 e temperatura de 30 - 50 °C). Com base nesses resultados, pode-se concluir que a aplicação de IndiAge Super L no processo de reciclagem de papel é mais viável em relação a Pergalase A40.

Mawadza *et al.* (2000) estudaram celulases purificadas produzidas por duas cepas de *Bacillus* CH43 e HR68, isolados de fontes de água quente no Zimbabwe, utilizando vários substratos. Ambas as enzimas tinham massa molecular de 40 kDa e ponto isoelétrico de 5,4. As celulases foram otimamente ativas nas faixas de pH de 5,0 - 6,5 e temperatura de 65 e 70 ° C para CH43 e HR68, respectivamente. A enzima produzida por *Bacillus* CH43 foi estável a 50 °C em uma faixa de pH de 6,0 – 10,0, enquanto a enzima de *Bacillus* HR68 foi estável na faixa de pH de 6,0 – 8,0. Ambas as enzimas mantiveram 100% de atividade por pelo menos 24 horas a 50 °C. As enzimas apresentaram maior atividade utilizando β-glucana como substrato, seguido de carboximetilcelulose (CMC). A atividade das enzimas não foi influenciada por íons metálicos com mais de 1 mM de concentração, mas foi aumentada em cerca de 38% com o íon Co²⁺. A inibição pelos íons Hg²⁺ e Mn²⁺ foi maior para a enzima de *Bacillus* CH43 do que para a produzida por *Bacillus* HR68. O íon Ag⁺ inibiu a atividade da enzima de CH43, porém estimulou a atividade para a enzima de HR68. A celulase CH43 foi inibida por N-bromosuccinimida e iodoacetamida, enquanto a celulase HR68 não foi afetada.

Wang *et al.* (2009) em um estudo com celulases haloestáveis purificadas de cepas de *Salinivibrio* sp. NTU-05 com peso molecular de 29 kDa, observaram que a temperatura e o pH ótimos da enzima foram 35 °C e 7,5, respectivamente. Quanto à estabilidade, a celulase foi altamente estável na faixa de temperatura entre 10 - 40 °C. A atividade enzimática declinou rapidamente em temperaturas acima de 60 °C. A 10 °C, a enzima não apresentou nenhuma perda de atividade, mesmo após 24 horas de incubação. A celulase

reteve mais de 80% de atividade na faixa de pH entre 6,5 e 8,5 e manteve apenas 35% de atividade em pH 5,0

II. 5 Materiais Lignocelulósicos

Devido a incessante demanda das atividades agrícolas nas últimas décadas, há uma crescente busca da maior utilização dos resíduos agroindustriais. Entre estes resíduos, pode-se citar o bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, farelo e casca de arroz, casca de soja, etc. O acúmulo de resíduos na biomassa aumenta a cada ano, causando danos ao meio ambiente e perda de recursos. Esse aumento é uma contribuição significante para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Vários processos são desenvolvidos para utilização desses materiais para transformá-los em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. A utilização desta biomassa de resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma racional alternativa para produção de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental (PANDEY et al., 2000).

A biomassa lignocelulósica (todas as plantas e materiais derivados de plantas) é o material mais abundante e renovável do planeta com grande potencial para produção de bioenergia e produtos químicos (RASTOGI *et al.*, 2010; PALJEVAC *et al.*, 2007)

As lignoceluloses são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera abrangendo aproximadamente 50% da biomassa no mundo, com uma produção anual estimada entre 10 e 50 x 10⁹ toneladas. Esta produção é devido às atividades da agricultura, florestas, frutas e vegetais. Estes compostos agrupam-se em polímeros com ligações covalentes e pontes de hidrogênio acompanhadas diretamente na combinação com ligações de forças Van der Waals (KHOSHNEVISAN *et al.*, 2011).

Mundialmente são produzidos aproximadamente 1,55 bilhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos por ano, incluindo casca de soja, casca de arroz bagaço de cana, palha de cevada, de trigo, de arroz, de sorgo, etc (EPOBIO, 2007).

A quantidade de resíduos lignocelulósicos gerada no Brasil anualmente é de aproximadamente 350 milhões de toneladas. A safra de 1990/1991 gerou cerca de 154,8 milhões de toneladas de resíduos, subindo para 345,4 milhões de toneladas na safra de 2005/2006. Com essa grande quantidade de resíduo, tem-se a capacidade de produção de 147 milhões de toneladas de açúcares (sacarose e glicose). Essa produção corresponde a

2,6 vezes a produção do Brasil e dos Estados Unidos juntos. Se forem consideradas as eficiências de hidrólise e fermentação, a capacidade de produção de etanol é de aproximadamente 60 bilhões de litros (PEREIRA Jr., 2007).

O termo biomassa refere-se a qualquer tipo de matéria orgânica oriunda de fontes vegetais ou animais, ou de seus processos de transformação naturais ou artificiais. Estes materiais têm em comum a origem direta ou indireta do processo de fotossíntese. Por esta razão, são formados periodicamente e sua produção não está limitada no tempo, em outras palavras, são renováveis. Dentre a matéria orgânica de origem vegetal, podemos citar as biomassas: natural, alimentícia, residual e de cultivos energéticos (PEREIRA Jr., 2007).

A utilização de resíduos provenientes da exploração da biomassa lignocelulósica para obtenção de bioprodutos é uma alternativa para a produção de energia e de alimentos, pois a madeira e os resíduos da agroindústria constituem reservas naturais renováveis disponíveis em grandes quantidades. Os materiais lignocelulósicos incluem vários resíduos agrícolas (palhas, cascas, cavacos), madeiras duras provenientes de árvores de folhas decíduas (dicotiledôneas), madeiras moles provenientes de coníferas e resíduos das indústrias de papel (TAMANINI, 2004).

A composição destes materiais é bastante variável, pois os constituintes possuem características químicas semelhantes às da madeira e são identificados em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento. A biomassa lignocelulósica é composta de celulose (~35 - 50%), hemicelulose (~20 - 35%), lignina (~10 - 25%), além de pequenas quantidades de outros componentes (extrativos) (~5 - 20%) (RABELO, 2007; WANG, 2011).

Atualmente, os maiores usos da lignocelulose concentram-se nas polpas e indústrias de papéis, proteína para ração, em meios tecnológicos de alimentação, além de poderem gerar energia através da produção de etanol (BALLESTEROS, 2001).

II.6. Composição dos materiais lignocelulósicos

A lignocelulose é conhecida como uma forma complexa que envolve celulose, lignina e hemicelulose Os resíduos lignocelulósicos são considerados como uma abundante fonte renovável, que pode ser usada como substrato para a produção de produtos químicos ou bioetanol por conversão química ou enzimática (PALJEVAC *et al.*, 2007). A lignocelulose representa mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal, sendo composta

pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, unidos fortemente entre si por ligações covalentes e não covalentes. Nas paredes celulares de tecidos vasculares de plantas terrestres superiores, as fibrilas de celulose estão localizadas em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose. A quantidade de cada um dos polímeros varia com a espécie e a idade da planta, bem como entre as partes de uma planta. Em média, a lignocelulose consiste de 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina (WANG *et al.*, 2011). A figura II.1 representa como basicamente é formado o composto lignocelulósico.

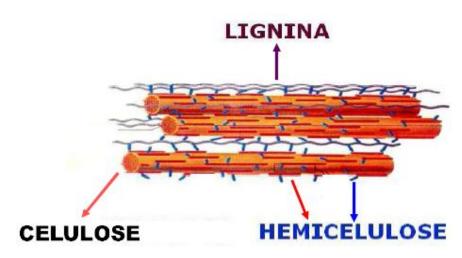


Figura II.1: Complexo lignocelulósico: cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina.

Fonte: Pereira Jr., 2007

II.6.1 Celulose:

A celulose é o principal componente estrutural da parede da célula vegetal. É a fonte mais abundante de carbono disponível na biosfera, respondendo isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva desse elemento na base dos componentes orgânicos. Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99%. É o principal componente das paredes celulares da planta e o mais abundante recurso renovável biológico na biosfera. A fabricação de etanol a partir de lignocelulose é uma possível estratégia para reduzir a corrente dependência do petróleo. A hidrólise enzimática da

celulose é de importância central na conversão de lignocelulose, e está sendo ativamente investigada (RABELO, 2007; HAN e CHEN, 2007; GAO *et al.*, 2011).

A celulose é um polissacarídeo, insolúvel, fibroso e cristalino composto por β -D-glicopiranosil unidas por ligações 1,4-glicosídicas e constitui o principal componente estrutural das paredes das células vegetais. Devido à estrutura cristalina da celulose, a celulose é insolúvel em água e difícil de hidrolisar (HAN e CHEN, 2007).

É um polímero linear de subunidades de glicose, unidas por ligações β-1-4 e cada resíduo de glicose é rotacionado 180° em relação ao resíduo vizinho. O comprimento da cadeia varia de 100 a 14 000 resíduos. Durante a biossíntese de celulose, as cadeias individuais de glicose são unidas por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares e forças de Van der Walls, o que lhes confere uma forma rígida com microfibrilas insolúveis e geralmente resistentes à hidrólise enzimática. As cadeias de microfibrilas são orientadas em paralelo com uma extremidade redutora e outra não redutora. Esta estrutura resulta em regiões altamente ordenadas e cristalinas intercaladas por regiões paracristalinas ou amorfas. A região amorfa é mais facilmente hidrolisável, pois possui menos ligações de hidrogênio e é facilmente hidratada e mais acessível às enzimas. (SCHWARZ, 2001; MANSFIELD e MEDER, 2003).

A Figura II.2 representa a estrutura linear da celulose com indicação do tipo de ligação e da unidade estrutural.

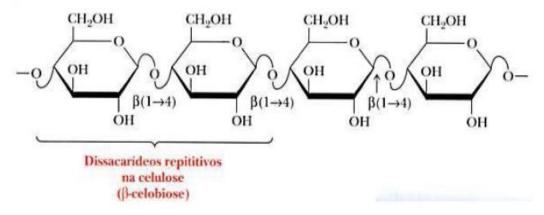


Figura II.2: representação da cadeia linear de celulose

Fonte: Campbell, 2000

O grau de cristalinidade depende da origem e do pré-tratamento e pode variar de 0% (amorfa) até próximo de 100%. O grau de cristalinidade da maioria das celuloses comerciais varia de 30 – 70%. A celulose pura é comercialmente disponível em várias

formas (algodão, papel filtro, avicel) e é geralmente utilizada como substrato para avaliar os sistemas de celulases. As formas amorfas e solúveis são frequentemente empregadas por sua rápida taxa de hidrólise, dentre elas podemos citar a carboximetilcelulose (CMC) e a hidroximetilcelulose (BÉGUIN e AUBERT, 1994).

II.6.2 Hemicelulose:

Vários resíduos agrícolas contêm cerca de 20 - 30% de hemicelulose, o segundo biopolímero mais abundante encontrado na natureza. É um polímero heterogêneo de pentoses, hexoses e ácidos. Nos últimos anos, a bioconversão de hemicelulose tem recebido muita atenção por causa de suas aplicações práticas na produção de combustíveis e produtos químicos, deslignificação de polpa de papel, a melhoria da digestão da matéria-prima animal, clarificação de sucos e melhoria na consistência de cerveja (MENON, PRAKASH e RAO, 2010).

As hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos, que estão localizados entre a lignina e as fibras de celulose e, dependendo das espécies de madeira ou vegetais, constituem cerca de 20 - 30% da biomassa natural vegetal lignocelulósica. São compostas de heteropolímeros ramificados e lineares de D-xilose, Larabinose, D-manose, D-glucose, D-galactose, L-ramnose, L-fucose e ácido D-glucurônico, que podem ser acetilados ou metilados. São geralmente classificadas de acordo com os resíduos de açúcar principais no suporte principal da cadeia. Os homopolímeros de xilose, os chamados homoxilanas só existem em algas marinhas (algas vermelhas e verdes). As duas principais hemiceluloses na madeira são xilanas e glicomanas, sendo que ambas estão presentes em madeiras macias, enquanto que em madeiras duras, a xilana é o componente principal. A xilana é o segundo polissacarídeo mais abundante, compreendendo até 30% do material da parede celular de plantas vegetais, 15 - 30% de madeiras duras e 7 - 10% de madeiras macias (MENON, PRAKASH e RAO, 2010).

As hemiceluloses são macromoléculas, constituídas de pelo menos dois tipos de unidades de açúcares, apresentando peso molecular muito menor do que a celulose, com 100 a 200 moléculas de monômeros polimerizadas. Na planta, as hemiceluloses estão em sua maioria, ligadas às ligninas, através de ligações covalentes, e assim fixadas à estrutura fibrosa (SCHUDART e RIBEIRO, 2001).

Estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, sobretudo, nas camadas primárias e secundárias, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. Cerca de 30% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais referem-se à hemicelulose, sendo assim, um carboidrato abundante na natureza. A fração hemicelulósica de uma planta (15% - 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda, ácidos hexurônicos, como os ácidos-β-glucurônico, α-D-4-O-metilglucurônico e ácido-α-D-galacturônico, e deoxiexoses (Figura II.3). A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA *et al.*, 2009).

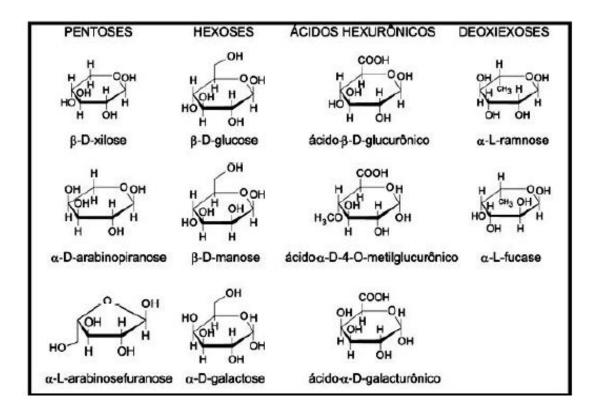


Figura II.3: Componentes da fração hemicelulose (MORAIS, 2005) Fonte: Morais, 2005.

A hemicelulose assemelha-se à celulose, porém é formada por unidades de pentoses (xilanas) ou unidades alternadas de manoses e glicoses ou unidades de galactoses.

Com o diferencial de que todas as hemiceluloses possuem cadeias laterais constituídas de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e deoxihexoses (α-L-raminose, α-L-fucose), as quais são responsáveis pela solubilidade da hemicelulose em água e/ou em álcalis. O sistema hemicelulolítico é muito complexo e varia de planta para planta. É composto por várias unidades de açúcares e o suporte principal é substituído e envolve entre outras enzimas, a endo-1,4-β-D-xilanase (EC 3.2.1.8), que corta as ligações internas da cadeia de xilana, e a β-xilosidase (CE 3.2.1.37), que cliva xyloligossacarídeos para produzir xilose (SCHUDART e RIBEIRO, 2001; SONG e WEI, 2010).

A hemicelulose, diferentemente da celulose, apresenta baixa massa molecular (100 - 200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (SUN e CHENG, 2005).

A Tabela II.1 resume as principais características da celulose e hemicelulose. O entendimento destas características é essencial para a definição das estratégias de aproveitamento das biomassas como matérias-primas para a produção de bioetanol e de outras substâncias químicas (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Tabela II.1: Diferenças entre hemicelulose e celulose

Celulose	Hemicelulose
- Consiste em unidades de glicose ligadas	- Consiste em várias unidades de pentoses e
entre si	hexoses ligadas entre si
- Alto grau de polimerização (1000 a 15000)	- Baixo grau de polimerização (50 a 300)
- Forma arranjo fibroso	- Não forma arranjo fibroso
- Apresenta regiões cristalinas e amorfas	- Apresentam somente regiões amorfas
- É atacada lentamente por ácido inorgânico	- São atacadas rapidamente por ácido
diluído a quente	inorgânico diluído a quente
- É insolúvel em álcalis	- São solúveis em álcalis

Fonte: Pereira Júnior, 2008.

A hemicelulose de estrutura heteropolissacarídica, pode ser extraída quase que integralmente do complexo lignocelulósico através de processos envolvendo utilização de tratamento térmico e presença de ácido inorgânico como catalisador em pequenas concentrações. (LARSSON *et al.*, 1999).

As hemiceluloses são totalmente amorfas e, desse modo, mais suscetíveis à hidrólise enzimática. Embora não existam evidências de que a celulose e as hemiceluloses estejam ligadas quimicamente, as pontes de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas tornam a sua separação quantitativa impossível. A presença das hemiceluloses junto à celulose resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (MENON, PRAKASH e RAO, 2010).

II.6.3 Lignina:

Depois da celulose da hemicelulose, a lignina é a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas. Ela esta presente principalmente na lamela média e na parede secundária. A lignina é a substância que confere rigidez à parede das células. A distribuição da lignina nas células e nas plantas não é uniforme, assim como sua constituição em cada espécie não é a mesma. Devido ao fato de a lignina apresentar muitas variações (dependentes da espécie da planta, da parte da planta em que se encontra, da época do ano em que é sintetizada, do solo, do clima e outros) e a grande dificuldade de se isolar a macromolécula sem que esta sofra alterações em sua estrutura original (degradação, condensação), não é possível formular sua estrutura química (ZIEGLER *et al.*, 2004).

As ligninas são polímeros formados pela união covalente de três tipos de monômeros: álcoois p-cumarílico, guaiacílico e sinapílico. A distribuição e proporção destes monômeros estão relacionadas com a origem filogênica de cada vegetal. Estas ligações do tipo éter resistem a vários agentes hidrolíticos e diversos sistemas enzimáticos degradativos. A quantidade relativa de cada monômero se diferencia significativamente, conforme a origem da lignina (angiospermas, gimnospermas) (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2003).

Para a planta, a importância primordial da lignina é a resistência à compressão e a rigidez que ela fornece à parede celular, fornecendo resistência ao ataque da maior parte dos microrganismos. Outra função da lignina é impermeabilizar a parede celular, facilitando o transporte de água para cima nas células condutoras do xilema (RAVEN *et al.*, 2001).

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares por meio de um complexo encadeado de reações, começando pelo CO₂ e H₂O, e originando os ácidos shikímico, prosseguindo via aminoácido aromático L-fenilalanina. A fenilalanina amônialiase, é uma enzima regulatória do metabolismo fenólico nas células vegetais, que converte a fenilalanina no ácido trans-cinâmico. A concentração de lignina na célula primária e secundária é estimada em 70 a 90% do total de lignina presente. Mesmo com vários estudos em andamento para o entendimento do processo degradativo, a degradação da lignina ocorre essencialmente por um processo multi-enzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoredutases (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio), e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular. Estas enzimas são elaboradas por uma série de microrganismos, principalmente algumas espécies de fungos (LEONOWICZ et al., 2001; PALMIERI et al., 2000).

A lignina configura-se como um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza e é o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química. Apesar de ser possível produzir diversos produtos com base na lignina, atualmente o foco dos estudos tem se voltado para o uso desse material como fonte de energia para os processos, o que garantiria a autossuficiência e, eventualmente, até a possibilidade de exportar alguma energia elétrica excedente. Naturalmente, essa situação é positiva tanto para a viabilidade econômica da tecnologia quanto para os quesitos ambientais, já que reduziria a dependência por recursos energéticos fósseis externos (PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Existe uma classificação para as diferentes ligninas de acordo com a abundância de seus precursores: a lignina guaiacil, que ocorre em quase todas as madeiras moles (softwood), é produzida pela polimerização do álcool coniferílico, a lignina guaiacilsiringil, típica de madeiras duras (hardwood), que é um copolímero dos álcoois sinapílico e coniferílico; a lignina siringil-guaiacil-p-cumaril, formada a partir dos álcoois sinapílico, coniferílico e a lignina p-hidroxi-cumarílico, que é comumente encontrada em gramíneas como a cana-de-açúcar (GRABBER, 2005). Por exemplo, as madeiras mais moles são quase que exclusivamente formadas de núcleos guaiacílicos, enquanto as madeiras duras possuem núcleos guacílicos e serigílicos na lignina (ZIEGLER et al., 2004).

É necessário quebrar as ligações lignina - polissacarídeo para o isolamento da hemicelulose. Em baixas temperaturas isso é feito com soluções alcalinas, porém apresenta rendimentos insatisfatórios. Altos rendimentos podem ser obtidos com a deslignificação antes do tratamento alcalino. Quando separadas por explosão a vapor, obtém-se furfural como produto principal, que forma resinas com fenol ou ureia, ou pode ser hidrolisado para ácido maleico. Através da hidrogenação catalítica obtém-se o xilitol (umectante, adoçante, plastificante, aditivo de alimentos) a partir da xilose; manitol (adoçante, plastificante, secante) a partir da manose, e uma grande variedade de produtos (SCHUCHARDT e RIBEIRO, 2001).

II.7 Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos

A hidrólise enzimática da celulose tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas visando a utilização da biomassa lignocelulósica como fonte renovável de energia, buscando reduzir as emissões de dióxido de carbono, bem como diminuir o aquecimento global (CHEN *et al.*, 2010; UEDA *et al.*, 2009). Por exemplo, o Brasil tem um excedente de 4,7 bilhões de kg de bagaço de cana seco, que renderia aproximadamente 1,2 bilhões de litros de etanol. Considerando o uso de 10 FPU de celulase por grama de bagaço, o Brasil necessitaria de uma produção estimada de 47 trilhões de FPU por ano. Se for considerada a hidrólise de resíduos ricos em amido, este cenário pode tornar-se ainda mais amplo (CGEE, 2011).

A celulase, uma enzima multicomponente que consiste em três enzimas diferentes (endoglicanases, exoglicanases e β-glicosidades), que atuam em sinergismo, é responsável pela bioconversão de celulose em açúcares solúveis. No entanto, nenhuma prática eficiente de processo foi ainda relatada para a hidrólise enzimática da celulose. A principal razão para isto é o alto custo da enzima celulase, porque é uma enzima livre de atividade específica baixa, suscetível à inativação e difícil de ser reciclada (LI *et al.*, 2006). De acordo com o Relatório elaborado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, o etanol de segunda geração somente será viável do ponto de vista econômico caso o custo total com as enzimas ficar abaixo de US\$ 0,16 por litro de etanol. Atualmente, este custo está em torno de US\$ 0,50. As alternativas disponíveis para minimizar o impacto da enzima no preço final do etanol é a sua produção em teores aproximados de 25 U.mL⁻¹ (Atualmente o que se obtém experimentalmente gira em torno de 15 U.mL⁻¹), ou aumentar o poder

catalítico das enzimas através de diferentes estratégias, as quais incluem inclusive a caracterização completa do complexo enzimático utilizado.

O bioetanol derivado da bioconversão de resíduos lignocelulósicos continua atraindo o interesse global como uma alternativa potencialmente compatível com o ambiente. No entanto, consideráveis melhorias técnicas ainda são necessárias antes que a biomassa lignocelulósica possa se tornar eficiente e economicamente viável. Uma das principais limitações deste processo é o elevado custo das enzimas envolvidas na conversão do componente celulose em açúcares fermentáveis (ARANTES e SADDLER, 2011).

O produto da hidrólise é geralmente açúcares redutores, incluindo a glicose. O custo da hidrólise enzimática é baixo se comparado com a hidrólise ácida porque a hidrólise enzimática é usualmente conduzida em condições suaves (pH 4,8 e temperatura entre 45 – 50 °C), além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos. A utilização de celulases na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos, e exibe elevada especificidade, eliminando a chance de ocorrência de substâncias tóxicas (furfurais e derivados de lignina) às células microbianas que serão utilizadas para fermentação do meio hidrolisado (SINGH et al., 2009).

Uma das principais barreiras enfrentadas pelas enzimas celulases durante a hidrólise de lignocelulose é o seu acesso limitado a grande parte da celulose, que está envolvida dentro de uma bem ordenada arquitetura fibrilar de micro fibrilas de celulose. Os materiais celulósicos são tipicamente pouco suaves para hidrólise, e são substratos porosos heterogêneos, sua área de superfície disponível geralmente pode ser dividida em superfícies exteriores e interiores. A superfície interior pode consistir de poros internos, fissuras e micro rachaduras, que normalmente surgem de "descontinuidades" do empacotamento molecular constituído na celulose no momento em que o substrato sólido é gerado. A área da superfície externa da celulose é rica em materiais, e em grande parte determinado pelas dimensões das fibras em geral (ARANTES e SADDLER, 2011).

O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, tais como: tipo de prétratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação. Consequentemente é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir

o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (VALLANDER e ERIKSSON, 1985).

A hidrólise enzimática da celulose e conversão dos açúcares liberados em moléculas de interesse, tal como o etanol, podem ser conduzidas de forma sequencial (processo HSF, hidrólise separada da fermentação) ou simultânea (SSF, sacarificação simultânea à fermentação) (OLOFSSON, BERTILSSON e LIDÉN, 2008).

O processo SSF contribui com menor custo de investimento à planta, visto que nele são agrupadas duas etapas em um mesmo vaso reacional. Nessa forma de condução, as enzimas são menos passíveis de inibição pelos produtos de hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada. A manutenção de uma baixa concentração de glicose no meio também favorece o equilíbrio das demais reações de hidrólise, no sentido de formação de mais produto, além de reduzir riscos de contaminação no sistema. Já o processo HSF apresenta como uma das principais vantagens frente ao SSF a possibilidade de ambas as etapas, de hidrólise e de fermentação, serem conduzidas em suas condições ótimas. As celulases comumente apresentam melhor atividade catalítica em temperaturas acima de 50 °C, bem acima da temperatura ideal para a etapa fermentativa. Nesse caso, como não há matéria-prima em suspensão durante a fermentação, as células podem ser recicladas ao sistema. No entanto, essa estratégia apresenta como desvantagens: o acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, causando inibição às enzimas; e redução na conversão final de glicose, devido à adsorção de parte do açúcar no sólido residual da hidrólise (OLOFSSON, BERTILSSON e LIDÉN, 2008).

A hidrólise enzimática da celulose tem seu rendimento aumentado com incrementos na carga enzimática, até uma concentração limite, a partir da qual não é compensatório continuar adicionando enzimas ao processo, pois os sítios da matriz do substrato já se encontram saturados pelos biocatalisadores. Esse aumento da dose de celulase no processo em certa medida, pode melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, mas iria aumentar significativamente o custo do processo (SINGH *et al.*, 2009;) Wilkins, Widmer e Grohmann (2007) avaliaram o efeito da concentração de celulases sobre a hidrólise do bagaço de frutas cítricas, utilizado celulases comerciais Celuclast 1.5 L e Novozym 188, da empresa Novozymes, em um processo do tipo SSF (sacarificação simultânea à fermentação), e verificaram que em concentrações a partir de 13 UI g.L⁻¹ e 0,02 FPU g.L⁻¹, respectivamente, o rendimento final do produto de interesse, etanol, não era mais incrementado.

Ao se efetuar uma comparação entre os processos de hidrólise pode-se perceber que a hidrólise enzimática conduz a rendimentos mais elevados de monossacarídeos do que a hidrólise ácida. Isso porque as enzimas celulases catalisam somente as reações de hidrólise e não as reações da degradação do açúcar, e devido à esta rota de hidrólise enzimática poder atingir altos rendimentos de conversão com menores impactos ambientais e com condições mais brandas operação do processo. No entanto, esta rota ainda requer o desenvolvimento de tecnologias para reduzir os custos das enzimas que degradam biomassa (FARINAS *et al.*, 2010).

Alguns autores vêm demonstrando a eficiência da hidrólise enzimática em relação à hidrólise ácida. Segundo Krishna *et al.* (1998) aproximadamente 75 e 65% da sacarificação foram conseguidas com 7,5% (p/p) de H₂SO₄ e HCl, respectivamente, a 15 psi em 45 minutos. No caso da hidrólise enzimática, o pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar foi essencial, mas altas pressões não foram requeridas. O hidrolisado enzimático apresentou uma conversão de 92% do substrato quando usado no bagaço o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a 2,5% (p/v). A formação dos açúcares foi obtida a 50 °C e pH 4,5, usando celulase de *Trichoderma reesei* com 40 U/g de substrato em 48 h. A produção de álcool foi mais elevada utilizando o hidrolisado enzimático do que o hidrolisado ácido.

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente e tenham maiores chances de se tornarem economicamente viáveis em um futuro próximo, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro (RABELO, 2007).

II.8 Considerações finais

Com base no apresentado no decorrer deste capítulo, alguns aspectos são evidenciados. Existe um grande interesse na obtenção da enzima celulase devido ao seu potencial de aplicação industrial, principalmente na indústria de bioetanol. A busca pelo aumento da taxa de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos faz com que aumente a necessidade de investigações sobre substratos e principalmente sobre as formas de condução do processo para que a obtenção da glicose a partir da hidrólise enzimática de resíduos se torne viável economicamente.

Atualmente, os processos de hidrólise enzimática vêm ganhando espaço e a atenção de pesquisadores por apresentar vantagens práticas e econômicas perante a hidrólise ácida, porém são necessários estudos mais aprofundados no que se refere ao comportamento das enzimas, bem como às suas ações específicas perante os substratos. A futura aplicação em resíduos lignocelulósicos para produção de bioetanol e produtos de valor agregado, por sua vez, requer o desenvolvimento de técnicas de hidrólise eficientes para que as celulases possam se tornar o maior volume de enzimas utilizadas no mundo.

Portanto, é de grande valia a busca de estratégias para o aumento da taxa de hidrólise da enzima celulase, e consequentemente, a caracterização desta enzima, possibilitando maior conhecimento referente às suas propriedades.

,	
CAPITULO	TTT
CALITULO	

MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Enzima

A enzima utilizada neste estudo foi o complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* (NS 50013) gentilmente doadas pela Novozymes Latin América (Brasil). Esta preparação de celulase catalisa a decomposição de material celulósico em glicose, celobiose, e maiores polímeros de glicose. A celulase NS 50013 pode ser usada para a redução da viscosidade ou para o aumento no rendimento de extração de diversos produtos de origem vegetal. Os principais produtos da reação de hidrólise da celulose com NS 50013 são celobiose e glicose.

III.2 Substratos avaliados

Os substratos avaliados neste estudo foram os resíduos agroindustriais bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, palha de trigo, inhame (ralado) e yacon (ralado), além de papel filtro watman, que está incluso na metodologia de Mandels *et al.*, (1976) como fonte de celulose.

III.3 Caracterização da celulase

O estudo de caracterização da enzima foi realizado em termos de temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo e estabilidade ao pH. Além disso, foi verificada a influência de cloreto de sódio (NaCl) sobre a atividade da celulase e foram determinados os parâmetros cinéticos para cada substrato estudado.

III.3.1 Temperatura e pH ótimos sobre a atividade de celulase

A temperatura e o pH ótimo na dosagem da atividade enzimática foram avaliados por meio de dois delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCRs). No primeiro DCCR foi avaliado o efeito da temperatura e do pH na faixa de 40 a 70 °C e 4,5 a 5,5, respectivamente, utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M. Pela análise dos efeitos do primeiro DCCR, foi realizado um segundo DCCR para avaliar os efeitos de temperatura e pH na faixa de 35 a 60 °C e 5,2 a 8,0, respectivamente, utilizando tampão fosfato de sódio 0,2 M. A Tabela III.1 e apresenta os níveis das variáveis independentes investigados nos

dois DCCRs. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados médios são apresentados. A atividade da celulase foi determinada como descrito no item III.4 e sua unidade foi expressa como U.mL⁻¹.

Tabela III.1: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2², para otimização da atividade nos dois delineamentos experimentais (DCCRs)

Variáveis independentes/Níveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Primeiro delineamento e	experimental				
pH	4,5	4,6	5,0	5,4	5,5
Temperatura (°C)	40,0	44,4	55,0	65,6	70,0
Segundo delineamento experimental					
pH	5,2	5,6	6,6	7,6	8,0
Temperatura (°C)	35,0	39,0	47,0	56,0	60,0

III.3.2 Determinação da energia de ativação da enzima

Para a determinação da energia de ativação da enzima, foi determinada a atividade da celulase para uma faixa de temperatura variando de 30 a 65 °C em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5 (pH ótimo). A energia de ativação foi calculada com base na equação de Arrhenius III.1, descrita a seguir:

$$\ln A = \ln K - \frac{Ea}{RT} \tag{III.1}$$

Onde:

A = Atividade da enzima obtida em cada temperatura

K =constante de proporcionalidade

Ea = energia de ativação enzimática

R = constante dos gases ideais (8,314 J/mol.K)

T = temperatura absoluta (K)

III.3.3 Determinação da termoestabilidade da celulase

O tratamento de inativação isotérmica foi realizado em banho-maria, na faixa de 50 - 65 °C em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5. A atividade residual da celulase foi

determinada como descrito acima. A inativação enzimática frequentemente segue a cinética de primeira ordem (MAZUTTI *et al.*, 2007). Em condições isotérmicas e isobáricas, a diminuição da atividade enzimática em função do tempo de tratamento pode ser descrita por:

$$A = A_0 \exp(-kt) \tag{III.2}$$

Onde k é a constante de inativação térmica; A_0 e A são a atividade inicial da enzima e a atividade remanescente após o aquecimento para o tempo t, respectivamente.

É comum expressar reações de primeira ordem em termos do valor D (MAZUTTI et al., 2007). O tempo de redução decimal, ou valor D, é definido como o tempo, à temperatura e pressão constantes, necessários para uma redução de 90% da atividade inicial. Para as reações de primeira ordem, o valor D é inversamente proporcional à taxa constante de inativação:

$$D = \frac{2.303}{k} \tag{III.3}$$

A energia de desativação também foi calculada com base na equação de Arrhenius, conforme:

$$\ln k = \ln K - \frac{Ed}{RT} \tag{III.4}$$

Onde:

k =constante de inativação térmica

K =constante de proporcionalidade

Ed = energia de desativação enzimática

R = constante dos gases ideais (8,314 J/mol.K)

T = temperatura absoluta (K)

Outro parâmetro frequentemente utilizado para representar a inativação de enzimas é o parâmetro z, que expressa à variação do tempo de redução decimal com a temperatura, e representa o aumento de temperatura necessário para reduzir 90% o tempo de redução decimal. A relação entre o tempo de redução decimal de enzimas e a temperatura é apresentada na seguinte equação, onde o tempo de redução decimal é plotado em um gráfico como uma função da temperatura. É visto um comportamento linear, onde z é dada por:

$$\log(D) = \frac{1}{z} \cdot (T - T_{ref}) + \log(D_{ref})$$
(III.5)

Onde T e T_{ref} são a temperatura do tratamento e a temperatura de referência (em °C), respectivamente, D e D_{ref} são o tempo de redução decimal à temperatura do sistema e à temperatura de referência (em horas), respectivamente. Neste trabalho, foi adotada a temperatura de referência de 50 °C, correspondente à temperatura ótima para atividade da enzima, que foi determinada através de testes preliminares do estudo. Já a D_{ref} foi determinada como descrito anteriormente, para a temperatura de 50 °C.

III.3.4 Efeito do pH na estabilidade da enzima

O efeito do pH na atividade enzimática foi investigado no intervalo de 3,5 - 5,5 usando tampão acetato de sódio 0,2 M à 50 °C. A atividade residual da celulase foi determinada como descrito no item III.4.

III.3.5 Influência da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade de celulase

Com o objetivo principal de avaliar a estabilidade da enzima em relação ao NaCl, foi investigado o efeito do sal na atividade enzimática através da adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio de 0; 0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 3 e 5 M na solução enzimática mantida em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,5 à 50 °C em um intervalo de tempo de 1 hora. A atividade residual da celulase foi determinada como descrito no item III.4.

III.3.6 Determinação das constantes de Michaelis-Menten

Ensaios enzimáticos com 1,5 $U.mL^{-1}$ de celulase foram realizadas em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,5 à 50 °C, variando-se a concentração de substratos de 5 - 100 g. L^{-1} . Os substratos estudados foram papel filtro, bagaço de cana, casca de arroz, casca de soja, palha de trigo, inhame e yacon. As constantes k_m e v_{max} foram determinadas para cada substrato estudado através da linearização utilizando o método de Lineweaver-Burk, descrito a seguir:

$$v = \frac{v_{\text{max}} \quad [S]}{k_m + [S]} \tag{III.6}$$

Através da linearização da Equação III.6 tem-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_{\text{max}}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\text{max}}}$$
 (III.7)

O resíduo agroindustrial mais adequado para a reação enzimática foi determinado através da análise dos parâmetros da equação de Michaelis-Mentem. Para baixas concentrações de substrato, a reação pode ser aproximada por primeira ordem; em concentrações intermediárias de substrato, há uma queda da taxa de reação de primeira ordem para ordem zero; em concentrações altas de substrato, a taxa de reação é de ordem zero. Do ponto de vista industrial, é desejável em reações enzimáticas, uma taxa constante e máxima, que só poderia ser obtida em concentrações baixas de substrato. Neste sentido, a equação de Michaelis-Menten pode ser simplificada, conforme:

$$v = v_{\text{max}} \cdot \frac{S}{k_m + S} \approx \frac{v_{\text{max}}}{k_m} \cdot S = \alpha \cdot S$$
 (III.8)

Onde α (min⁻¹) representa uma constante expressando a relação entre a taxa de reação máxima (v_{max}) e a constante de saturação (k_m). Quanto mais alto for o valor de α , mais adequado é o substrato para a reação enzimática, uma vez que é desejável alta taxa de reação e baixos valores para a constante de saturação, pois isso indica uma alta afinidade da enzima pelo substrato.

III.4 Medida de atividade de hidrólise em papel filtro

Seguindo a proposta de Mendels *et al.* (1976) com algumas alterações, foram pesados 50 mg de papel filtro Whatman (fonte de celulose) e adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,5. Um volume de 1 mL da solução enzimática foi adicionado ao tubo em banho termostático a 50 °C por 1 hora. A amostra foi incubada em temperatura de ebulição por 5 minutos e depois em banho de gelo. Os açúcares redutores liberados foram medidos com ácido dinitrosalicílico (DNS) em leitura espectrofotométrica a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade de celulase foi determinada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto a partir do papel de filtro original.

CAPÍTULO IV

IV.1 Temperatura e pH ótimo sobre a atividade de celulase

O pH e a temperatura ótimos para atividade de celulase foram determinados através da consecução de 2 delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCRs). Um DCCR utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M e outro utilizando tampão fosfato de sódio 0,2 M totalizando 11 experimentos cada DCCR (4 ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais). A Tabela IV.1 apresenta os resultados obtidos no primeiro DCCR para verificar a atividade da enzima em função da temperatura e do pH utilizando tampão acetato de sódio 0,2 M. Os valores de atividade enzimática obtidos experimentalmente variaram entre 0,73 U.mL⁻¹ (experimento 3) a 3,24 U.mL⁻¹ (experimento 2). Os resultados mostraram que a máxima atividade de celulase (3,24 U.mL⁻¹- ensaio 2-), foi obtida em pH 5,4 e a 44,4 °C.

Tabela IV.1: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura utilizando tampão acetato de sódio e papel filtro como substrato.

Exp.	рН	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
1	4,6 (-1)	44,4 (-1)	2,07
2	5,4 (1)	44,4 (-1)	3,24
3	4,6 (-1)	65,6 (+1)	0,73
4	5,4 (1)	65,6 (+1)	1,10
5	4,5 (-1,41)	55,0 (0)	1,32
6	5,5 (+1,41)	55,0 (0)	2,58
7	5,0 (0)	40 (-1,41)	3,02
8	5,0 (0)	70 (+1,41)	0,76
9	5,0 (0)	55,0 (0)	2,63
10	5,0 (0)	55,0 (0)	2,71
11	5,0 (0)	55,0 (0)	2,53

Os dados da Tabela IV.1 foram tratados estatisticamente com o objetivo de determinar os efeitos das variáveis estudadas sobre a atividade enzimática. Os resultados são apresentados na Figura IV.1 como um gráfico de Pareto.

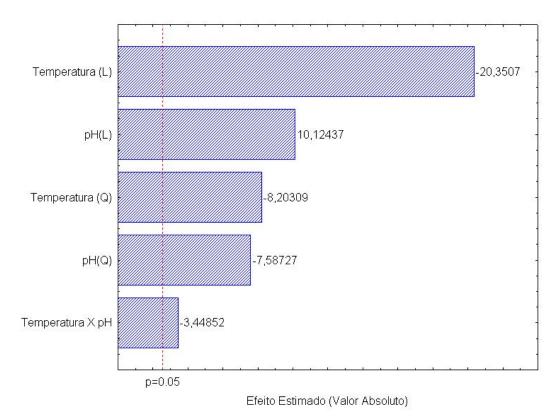


Figura IV.1: Efeitos dos parâmetros do modelo que representam a atividade da enzima obtidos no primeiro DCCR utilizando tampão acetato de sódio

Os termos lineares de temperatura e pH mostraram que um aumento do pH e uma diminuição da temperatura poderia melhorar a atividade enzimática. Ambos os termos quadráticos apresentaram influência negativa sobre a atividade, indicando a presença de um ponto de máximo. A Tabela IV.2 apresenta a análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes. Como se pode observar, todos os termos do modelo foram estatisticamente significativos (p <0,05) no intervalo avaliado.

Tabela IV.2: Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para atividade de celulase em termos do pH e da temperatura para o primeiro DCCR.

	Efeito	Erro Padrão	P
Média	2,62	0,05	<0,0005
pH Linear (pH)	0,83	0,06	0,0058
pH Quadrática (pH²)	-0,74	0,07	0,0103
Temperatura Linear (T)	-1,67	0,06	0,0014
Temperatura Quadrática(T ²)	-0,80	0,07	0,0088
pH X Temperatura (pH x T)	-0,40	0,09	0,0472

A Tabela IV.3 apresenta a análise da variância (ANOVA) e foi empregada para a validação do modelo matemático codificado usado para a predição da atividade de celulase dentro das faixas de pH e temperatura estudadas. O valor de F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo. Na Tabela IV.3 (anova) o valor calculado de F foi 129,230, o qual é aproximadamente 26 vezes maior que o valor tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação (R²) de 0,95 sugere que o modelo gerado a partir dos dados da Tabela IV.1 pode explicar 95% da variação total dos resultados. Isto implica numa representação satisfatória do processo pelo modelo apresentado na equação IV.1.

Tabela IV.3: ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o primeiro DCCR.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F
Regressão	8,412	5	1,680	129,230
Resíduo	0,068	5	0,013	
Falta de ajuste	0,051	3		
Erro Puro	0,017	2		
Total	8,480	10		

 $R^2=0.95$ $F_{0.95:5:5}=5.05$.

A Equação IV.1 apresenta o modelo codificado gerado pela análise de regressão:

$$Y_{SAB} = 2.62 + 0.41 \cdot pH - 0.37 \cdot pH^{2} - 0.83 \cdot T - 0.40 \cdot T^{2} - 0.20 \cdot pH \cdot T$$
 (IV.1)

Onde Y_{SAB} é atividade enzimática calculada ($U.mL^{-1}$) usando tampão acetato de sódio, pH e T são os valores codificados de pH e temperatura, respectivamente.

O modelo codificado representado pela Equação IV.1 e validado pela análise de variância foi usado para gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de celulase em função da temperatura e do pH em tampão acetato de sódio 0,2 M, as quais estão apresentadas na Figura IV.2. As Figuras IV.2 (a) e (b) apresentam o efeito de interação do pH e temperatura na atividade de celulase em tampão acetato de sódio 0,2 M. A atividade máxima da celulase foi obtida para uma temperatura e faixa de pH (40 - 50 °C e 5,2 - 5,5), respectivamente.

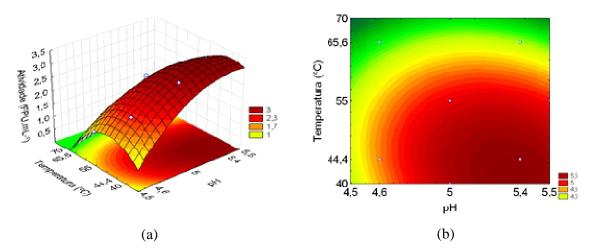


Figura IV.2: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) indicando a influência da temperatura e do pH sobre a atividade de celulase obtidos no primeiro DCCR utilizando tampão acetato de sódio.

Essa faixa de temperatura e pH (40 - 50 °C e 5,2 - 5,5), respectivamente, permite uma grande flexibilidade na utilização da enzima, uma vez que as variações em torno do ponto ótimo não afetam a atividade enzimática. Além disso, pode-se verificar claramente que há uma tendência de que o aumento no pH e na diminuição da temperatura pode aumentar a atividade enzimática, tal como já verificado pela análise dos efeitos.

A celulase comercial Accelerase® 1500 tem um pH ótimo entre 4,6 - 5,0, mas fica inativa em um pH abaixo de 4,0 ou acima de 7,0. Normalmente é usado temperatura de 50 °C para a hidrólise empregando celulases (SUKUMARAN *et al.*, 2009).

Liu e Xia (2006), estudaram a celulases comerciais obtidas de *Trichoderma viride*, e a enzima apresentou pH ótimo entre 4,0 e 5,2 e uma temperatura ótima entre 50 e 60 °C,

para a hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) e quitosana, respectivamente. Porém, Ko et al. (2010) obtiveram uma temperatura e pH ótimo de 60 °C e 7,0, respectivamente, para celulase não comercial produzida por *Paenibacillus campinasensis*. O mesmo observou-se nos estudos de Lee et al. (2008), que encontraram um pH ótimo de 7,0 e uma temperatura ótima de 50 °C para celulase purificada e produzida por *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3. Resultados similares foram reportados por Garda et al. (1997), onde celulases produzidas por *Streptomyces halstedii* apresentaram máxima atividade em pH 6,0 e temperatura de 50 °C. Celulases produzidas por outros gêneros de actinomicetos e Thermomonospora sp., apresentaram pH e temperatura ótimos em 5,0 e 50 °C, respectivamente.

Com base nestes resultados, foi realizado um segundo DCCR alterando os níveis das variáveis como indicado, e os resultados são apresentados na Tabela 6. É importante ressaltar a necessidade de mudar o tampão, uma vez que o tampão acetato de sódio corresponde a uma faixa de pH entre 3,0 - 5,5. Nesse sentido, foi utilizado tampão fosfato de sódio (0,2 M), que representa uma faixa de pH entre 5,2 - 8,0.

As atividades da enzima diminuíram (em média), variando de 0,09 U.mL⁻¹ (experimento 8) à 1,43 U.mL⁻¹ (experimento 11) se comparadas com as obtidas no primeiro DCCR utilizando tampão acetato de sódio. Este resultado pode ser devido a alterações na forma iônica, o que pode alterar a estrutura terciária da enzima, com uma consequente alteração de atividade. Segundo Bailey e Ollis (1986), os grupos ionizáveis presentes na estrutura das enzimas fazem parte, geralmente, do sítio ativo. Assim, a enzima ativa catalíticamente atua somente em um estado de ionização definido. Ademais, variações no pH do meio resultam em mudanças na forma iônica do sitio ativo e mudanças na atividade das enzimas. Mudanças no pH podem também alterar a forma tridimensional da enzima (SHULER, 1992).

Tabela IV.4: Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática em função do pH e da temperatura utilizando tampão fosfato de sódio utilizando papel filtro como substrato.

Ensaio	pН	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
1	5,6 (-1)	39,0 (-1)	0,98
2	7,6 (1)	39,0 (-1)	0,77
3	5,6 (-1)	56,0 (+1)	1,12
4	7,6 (1)	56,0 (+1)	0,17
5	5,2 (-1,41)	47,0 (0)	1,02
6	8,0 (+1,41)	47,0 (0)	0,18
7	6,6 (0)	35 (-1,41)	0,81
8	6,6 (0)	60 (+1,41)	0,09
9	6,6 (0)	47,0 (0)	1,21
10	6,6 (0)	47,0 (0)	1,30
11	6,6 (0)	47,0 (0)	1,43

Os dados da Tabela IV.4 foram tratados estatisticamente para determinar os efeitos significativos (p <0,05) dos parâmetros do modelo que representam a atividade da enzima e os resultados são apresentados na Figura IV.3 como um gráfico de Pareto.

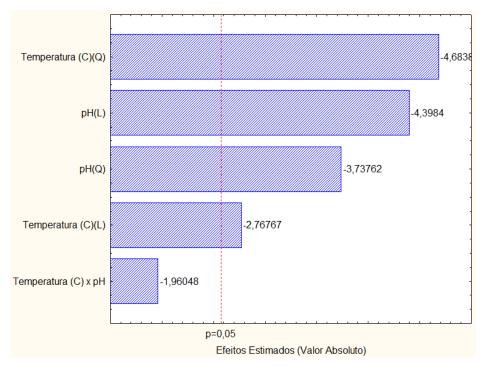


Figura IV.3: Efeitos dos parâmetros do modelo que representam a atividade da enzima obtidas no segundo DCCR utilizando fosfato de sódio.

Pode-se observar que ambos os termos lineares da temperatura e pH apresentaram efeitos negativos, indicando que o aumento dessas variáveis leva a uma diminuição da atividade enzimática. A Tabela IV.5 apresenta a análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes. Como pode ser observado, todos os termos do modelo foram estatisticamente significativos (p <0,05) no intervalo avaliado, com exceção da interação de temperatura e pH.

Tabela IV.5: Análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes para atividade de celulase em termos do pH e da temperatura para o segundo DCCR.

	Efeito	Erro Padrão	P
Média	1,31	0,10	<0,0005
pH Linear (pH)	-0,58	0,13	0,0070
pH Quadrática (pH ²)	-0,59	0,15	0,0134
Temperatura Linear (T)	-0,36	0,13	0,0394
Temperatura Quadrática(T ²)	-0,74	0,15	0,0054
pH X Temperatura (pH x T)	-0,37	0,18	0,1072

A equação IV.2 apresenta os parâmetros do modelo quadrático codificado em função de pH e temperatura:

$$Y_{SPB} = 1.31 - 0.29 \cdot pH - 0.29 \cdot pH^2 - 0.18 \cdot T - 0.37 \cdot T^2 - 0.18 \cdot pH \cdot T$$
 (IV.2)

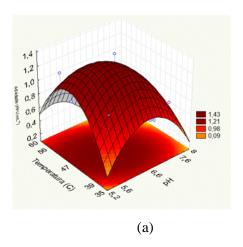
Onde Y_{SPB} é atividade enzimática calculada (FPU.mL $^{-1}$) usando tampão fostato de sódio, pH e T são os valores codificados de pH e temperatura, respectivamente.

Tabela IV.6: ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o segundo DCCR.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F
Regressão	8,412	5	0,392	6,320
Resíduo	0,068	5	0,062	
Falta de ajuste	0,051	3		
Erro Puro	0,017	2		
Total	8,480	10		

 $R^2=0.95$ $F_{0.95:5:5}=5.05$.

O modelo foi validado pela análise da tabela de variância (ANOVA), permitindo a apresentação de superfícies de resposta e curvas de contorno, mostrando a variação da atividade enzimática em função do pH e temperatura. A Figura IV.4 apresenta os gráficos de contorno obtidos no segundo DCCR utilizando o tampão fosfato de sódio.



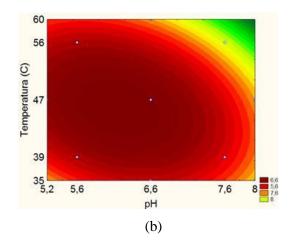


Figura IV.4: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) indicando a influência da temperatura e do pH sobre a atividade de celulase obtidos no segundo DCCR utilizando tampão fosfato de sódio.

Como pode ser observado na Figura IV.4, a atividade máxima da celulase foi obtida na temperatura e pH variando entre 40 a 50 °C e 5,6 - 6,6, respectivamente. No entanto, essas atividades foram inferiores às obtidas no DCCR anterior. É importante observar a consistência dos resultados, já que a região ideal para a temperatura foi semelhante nos dois DCCRs. Com base nos resultados obtidos no primeiro DCCR usando tampão acetato de sódio, verificou-se que a atividade ótima da celulase foi obtida em uma faixa de pH 5,2 - 5,5.

Celulases ácidas são geralmente mais desejáveis para a bioconversão, já que em situações em que o pré-tratamento ácido da biomassa é empregado ou quando a enzima tem que trabalhar no *pool* com enzimas de *Trichoderma reesei*, a atividade ideal está próxima de 5 U.mL⁻¹, e em uma faixa de pH entre 4,0 - 6,0. A maioria das celulases tem um melhor desempenho de bioconversão na faixa de pH de 4,0 - 6,0 (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Krishna (2000), em estudos de produção e aplicação de celulases de *Trichoderma reesei* QM-9414 na hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos, obteve temperatura ótima de 50 °C, porém o pH ótimo foi de 4,5.

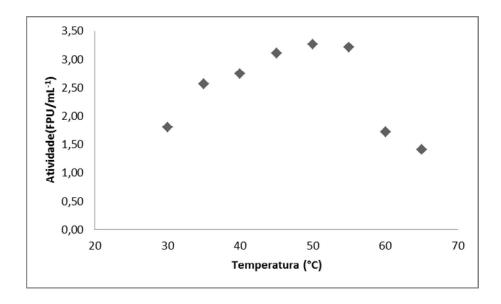
Trivedi *et al.* (2010) obtiveram melhor atividade da enzima celulase purificada produzidas por *bacillus flexus* em pH 10,0 e em 45 °C de temperatura. Resultados semelhantes em termos de temperatura e pH ótimos para produção de celulases fúngicas

encontrados neste estudo tem sido relatados na literatura (RAN et al., 2009; JORDAN et al., 2011).

IV.2 Determinação da energia de ativação da celulase

Para determinar a energia de ativação da celulase foram realizados experimentos em uma faixa de temperatura entre 30 - 65 °C em pH 5,5 (tampão acetato), durante 60 minutos. A figura IV.5 (a) apresenta os resultados obtidos, onde pode-se observar que o aumento da atividade foi até 50 °C, diminuindo em temperaturas acima deste valor. Os dados obtidos entre 30 - 50 °C foram utilizados para estimar a energia de ativação para a celulase utilizando um gráfico de Arrhenius (Figura IV.5 (b)), que produz uma linha reta com uma inclinação de - Ea/R.

Neste trabalho foi demonstrado que uma energia de ativação de 14,1 kJ.mol⁻¹, o que é a energia mínima necessária para romper a barreira de energia que impede a formação do complexo E-S que leva a liberação do produto. Do ponto de vista industrial, são desejáveis menores valores para a energia de ativação, uma vez que nesta condição a enzima é mais reativa. Não existem relatos na literatura referentes à energia de ativação para celulases. No entanto, Ettalibi e Baratti (2001) relataram valores de 29,4 e 26 kJ.mol⁻¹, respectivamente, para inulinase livre e imobilizada de *A. niger* em tampão acetato de sódio. Santos *et al.* (2007) relataram valores de 45,9 e 42,0 kJ.mol⁻¹ para inulinase livre e imobilizada de *K. marxianus* ATCC 16045 em meio tampão citrato, respectivamente.



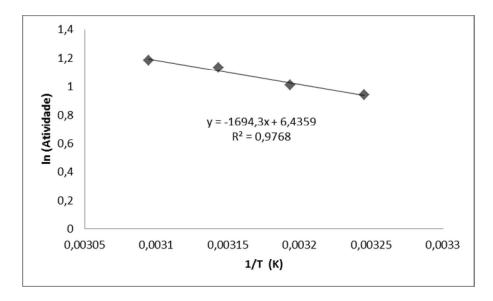
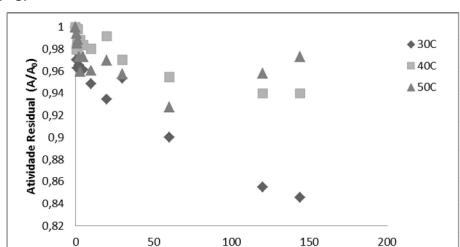


Figura IV.5: (a) Influência da temperatura entre 30 - 65 °C sobre a atividade enzimática, (b) Determinação da energia de ativação com base na equação de Arrhenius em uma faixa de temperatura entre 30 - 50 °C.

IV.3 Termoestabilidade da celulase

Os resultados obtidos sobre a termoestabilidade da celulase são mostrados na Figura IV.6. Foi avaliado o intervalo de 30 a 65 °C. Entretanto, Os resultados em 60 e 70 °C não foram apresentados, uma vez que uma perda total de atividade em menos de duas



Tempo (h)

horas de reação foi verificada, mostrando uma estabilidade muito baixa em temperaturas acima de 50 $^{\circ}$ C.

Figura IV.6: Influência da temperatura de 30 - 65 $^{\circ}$ C sobre a cinética de atividade enzimática.

Como pode ser observado, houve uma redução máxima de 15% na atividade da enzima após 150 horas de reação.

Um modelo de primeira ordem foi utilizado para ajustar os dados da Figura IV.6 e a Tabela IV.7 resume os resultados obtidos em relação à constante de inativação e o tempo de redução decimal.

Tabela IV.7: Efeito da temperatura sobre o tempo de redução constante e	inativação
decimal obtidas durante a avaliação da termoestabilidade da celulase.	

Temperatura (°C)	k (h ⁻¹)	D (h)	\mathbb{R}^2
30	$0,0010\pm8,3x10^{-5}$	2318,6±136,1 ^a	0,9639
40	$0,0011\pm9,7x10^{-5}$	2109,5±131,5 ^a	0,9577
50	$0,0123\pm0,0023$	$194,0\pm25,6^{b}$	0,9358
60	$0,9555\pm0,0418$	$2,4\pm0,07^{c}$	0,9962
70	1,0176±0,1753	$2,3\pm0,28^{c}$	0,9583

a, b, c letras diferentes representam uma diferença significativa de 95% (p < 0.05 – teste de Tukey).

A partir dos resultados, pode-se observar que a constante de inativação aumenta com a temperatura, indicando que temperatura superior a 50 °C acelera a taxa de inativação. Além disso, o tempo de redução decimal diminuiu com o aumento da temperatura, como era esperado.

A enzima mostrou boa estabilidade nas temperaturas de 30 a 40 °C, apresentando um valor D superior a 1000 horas, não mostrando diferenças estatísticas (p < 0,05). A celulase comercial NS 50013 apresentou estabilidade moderada a 50 °C, pois o valor D foi de cerca de 200 horas nesta temperatura. No entanto, em temperaturas acima de 50 °C foi observada uma baixa estabilidade, uma vez que o valor D foi inferior a 3 horas.

Os dados de tempo de redução decimal são importantes em reações enzimáticas, pois é possível fazer previsões do tempo de processamento. Enzimas termoestáveis possuem grande importância biotecnológica, tendo em vista que as celulases termoestáveis podem ser utilizadas na indústria alimentícia, onde ocorrem processos que requerem altas temperaturas, como por exemplo, na pasteurização. Outras aplicações incluem as indústrias de polpa e papel, tratamento de efluentes industriais e processamento de materiais celulósicos (JANG e CHENG, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes a vários outros encontrados na literatura para celulases produzidas por actinomicetos, como é o caso de celulases produzidas por *Streptomyces* T3-1, que se mostraram altamente termoestáveis a 40° C e 50 °C (JANG e CHEN 2003) e de *Streptomyces drozdowiczii* M7A, onde a enzima foi capaz de reter 100% de sua atividade a 50 °C por uma hora, e também perdeu consideravelmente a atividade em 60 °C (GRIGOREVSKI-LIMA *et al.*, 2005).

Song e Wei (2010), em um estudo com celulases produzidas por *Cellulosimicrobium cellulans*, obtiveram boa estabilidade térmica em 30 °C. Já Liu e Xia (2006) apresentaram estabilidade térmica para celulase comercial entre 30 e 70 °C para hidrólise de quitosana e carboximetilcelulose (CMC) em 2 horas de incubação.

Lee *et al.* (2006), em um estudo com celulase purificada produzida por *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3, observaram que a enzima reteve 80% da atividade original em temperaturas variando de 50 a 70 °C após 20 horas de incubação.

A estabilidade de temperatura também foi recentemente reportada por Ko *et al*. (2010) no trabalho com celulases Cel-BL11 purificadas com peso molecular de 38 kDa, que apresentou boa estabilidade na faixa de 30 até 60 °C, após 7 horas de incubação. Por outro lado, existem referências de celulases mais estáveis, como uma produzida por uma

estirpe de actinomicetos *Streptomyces* sp., que quando incubada a 60 °C reteve 84% de sua atividade inicial ao término das 3 horas de incubação (ALANI, ANDERSON e MOOYOUNG, 2008).

De acordo com a equação III.4, os dados da Tabela IV.7 foram utilizados para calcular a energia de desativação (Ed) para a celulase utilizando a equação de Arrhenius e são apresentados na Figura IV.7.

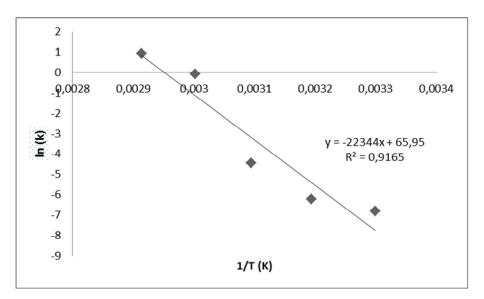


Figura IV.7: Determinação da energia de desativação com base na equação de Arrhenius em uma faixa de temperatura de 30 a 70 ° C.

O valor da Energia de desativação (Ed) para celulase obtido neste estudo foi de 185,8 kJ.mol⁻¹, foi consideravelmente inferior ao relatado por Mazutti *et al.* (2007) e Treichel *et al.* (2009) para inulinase (343,9 e 527 kJ.mol⁻¹, respectivamente), e semelhante ao relatado por Wolski *et al.* (2009) para a lipase de *Penicillium* sp. obtida por fermentação em estado sólido (100,6 kJ.mol⁻¹) e fermentação submersa (72,8 kJ.mol⁻¹).

Outro parâmetro frequentemente utilizado para representar a desativação da enzima é o parâmetro z. Os dados da Tabela IV.7 também foram utilizados para determinar o valor de z de acordo com metodologia previamente definida. A celulase investigada neste estudo apresentou um valor z de 12,7, indicando que para a redução de 90% no tempo de redução decimal é necessário aumentar a temperatura em 12.7 °C.

IV.4 Influência do pH no estudo da estabilidade da enzima celulase

A influência do pH na estabilidade da celulase foi verificada nas faixas de pH 3,5 - 5,5, usando tampão acetato de sódio 0,2 M a 50 °C (temperatura ótima) em diferentes intervalos de tempos. Os resultados estão apresentados na Figura IV.8.

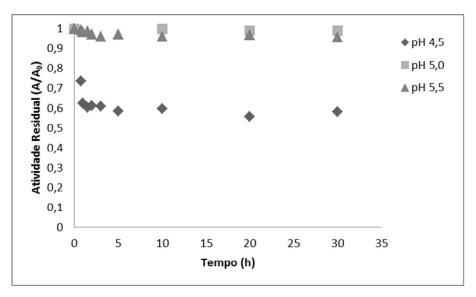


Figura IV.8: Influência do pH de 4,5 - 5,5 sobre a cinética de atividade enzimática.

A análise dos resultados demonstram que a maior estabilidade da enzima foi verificada em valores de pH 5,0 e pH 5,5. Como pode ser observado, praticamente não houve perda de atividade enzimática em pH 5,0 e 5,5. No entanto, para pH 4,5, houve uma redução de 40% da atividade nas primeiras horas de reação, estabilizando ao longo do tempo de avaliação. Utilizando pH 3,5, foi verificada a perda total da atividade em poucos minutos de reação. Provavelmente por este pH ser muito próximo do ponto isoelétrico da proteína, o que pode levar à desnaturação da enzima.

A estabilidade de pH foi recentemente reportada por Ko et~al.~(2010) no trabalho com celulases Cel-BL11 purificadas com peso molecular de 38 kDa, que encontraram boa estabilidade para pH neutro. Já Liu e Xia (2006) apresentaram estabilidade da enzima comercial entre pH 3,0 - 7,0 na hidrólise de quitosana e CMC (carboximetilcelulose). No entanto, a estabilidade de pH de celulase produzida por B.~amyloliquefaciens~DL-3 apresentou ampla faixa de pH (4,0 - 9,0) após 20 h de incubação a 50 °C (LEE et~al., 2008).

Trivedi *et al.* (2010), em um estudo com celulases purificadas produzidas por *bacillus flexus*, verificaram que a atividade mostrou-se estabilizada na faixa de pH entre 8,0 – 12,0, indo de encontro com outros estudos relatados com *Marinobacter* sp. MS1032 (SHANMUGHAPRIYA *et al.*, 2010), *Bacillus* sp. 243 HSH-810 (KIM *et al.*, 2005), *Vibrio* sp. G21 (GAO *et al.*, 2010) e *Stachybotrys atra* BP-A (PICART *et al.*, 2008), que demonstraram a sua tolerância de pH na faixa de 6,0 – 12,0.

Celulases produzidas por isolados de *Streptomyces* apresentaram estabilidade numa faixa de pH de 3,0 a 7,0 (LI *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram encontrados por George *et al.* (2001), onde as celulases produzidas por gêneros de *actinomicetos* apresentaram uma tolerância em ampla faixa de pH (4,0 - 10,0), onde a enzima permaneceu com 80% da atividade. Da mesma maneira, as celulases produzidas por duas linhagens de *Bacillus* sp. apresentaram uma ótima atividade nesta mesma faixa de pH, demonstrando boa estabilidade numa faixa de pH entre 5,0 - 10,0 (MAWADZA *et al.*, 2000).

IV.5 Influência da concentração de cloreto sobre a atividade enzimática

A tolerância à salinidade pode elevar os potenciais de aplicações das enzimas, pois esta característica é importante para a futura utilização das enzimas em qualquer processo biotecnológico que depende de alta salinidade ou pressões osmóticas por longos períodos de incubação. Estudos sobre a influência de NaCl são importantes como parte da etapa de caracterização enzimática, tanto para sua estabilidade ou para atividade (MARGESIN e SHINNER, 2001). A influência de cloreto de sódio (NaCl) sobre a atividade enzimática de celulase Novozym NS 50013 foi estudada utilizando diferentes concentrações de NaCl na faixa de 0,01 a 5 Molar em todos os substratos envolvidos no estudo. Porém, somente os dois substratos que obtiveram maiores atividades foram adicionados à figura IV.9, que apresenta-se a seguir:

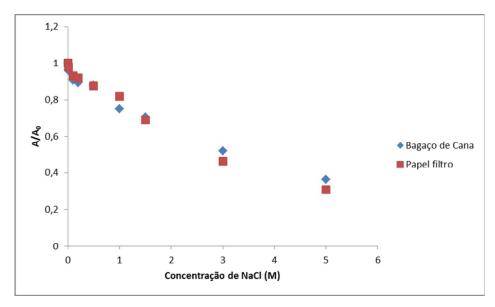


Figura IV.9: Influência de cloreto de sódio (NaCl) sobre a atividade enzimática de celulase utilizando papel filtro e bagaço de cana como substratos.

A partir dos resultados, pode-se observar que o cloreto de sódio teve um efeito inibitório sobre a atividade de celulase, sendo que com o aumento da concentração de sal, a atividade foi diminuindo, tanto para o substrato papel filtro, como para o substrato bagaço de cana. Em todas as concentrações estudadas (0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5; 3; 5), a enzima apresentou o mesmo comportamento, com valores de queda de atividade parecidos.

É importante ressaltar que nas concentrações de 0,01 até 0,2 a enzima demostrou uma boa estabilidade, diminuindo apenas cerca de 7% a sua atividade inicial. A partir desta concentração, a enzima foi bem menos estável.

Na maior concentração de cloreto de sódio (5M), a enzima perdeu cerca de 30% de atividade nos dois substratos utilizados neste estudo. Utilizando o substrato papel filtro, a atividade caiu de 0,5369 U.mL⁻¹ para 0,1654 U.mL⁻¹. Já com o substrato bagaço de cana, a atividade diminuiu de 0,1895 U.mL⁻¹ para 0,0689 U.mL⁻¹. Poucos estudos com celulases alcalinas tolerantes ao sal têm sido relatados (VOGET *et al.*, 2006).

Triverdi *et al.* (2010) trabalhando com celulases purificadas produzidas por *bacillus flexus*, observaram que a enzima reteve 70% de sua atividade até a concentração de sal de 15%, depois disso a enzima perdeu atividade consideravelmente e na maior concentração de NaCl (21%) a atividade reduziu para 18%.

Wang *et al.* (2009) em um estudo com celulases haloestáveis purificadas de cepas *Salinivibrio* sp. NTU-05 verificaram que o cloreto de sódio induziu a atividade enzimática

na concentração de 5%, diminuindo em concentrações mais altas entre 6 e 30%. A atividade de endo-β-1,4-glucanase Cel5A de *Vibrio* sp. G21 e Endoglucanase-AG de *Bacillus agaradhaerens* foi induzida na presença de NaCl (GAO *et al.*, 2010; HIRASAWA *et al.*, 2006). Johnson *et al.* (1996) descreveram uma celulase de actinomicetos *Actinopolyspora Halophila*, e a enzima exibiu atividade ótima com a adição de 15% de NaCl.

IV.6 Efeito dos substratos sobre os parâmetros de Michaelis-Menten

Após a obtenção dos dados experimentais foram determinadas as constantes cinéticas. Para a determinação dos parâmetros utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk. Considerando a equação a seguir:

$$v = \frac{v_{\text{max}} \quad [S]}{k_m + [S]} \tag{III.6}$$

Através da linearização da Equação IV.3 tem-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m \ 1}{v_{\text{max}} \ S} + \frac{1}{v_{\text{max}}}$$
 (III.7)

As Figuras a seguir apresentam os dados linearizados de 1/[S] x 1/v, para todos os substratos avaliados:

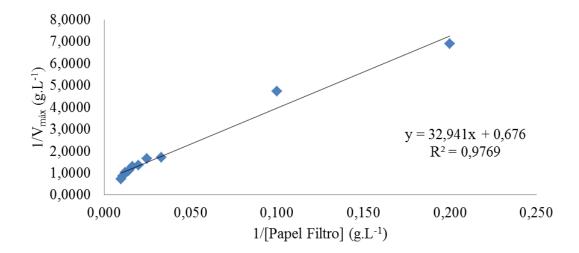


Figura IV.10: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Papel de filtro Watman.

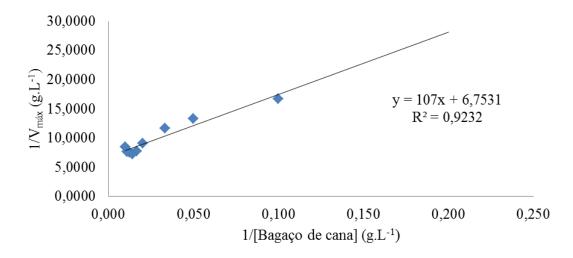


Figura IV.11: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Bagaço de cana.

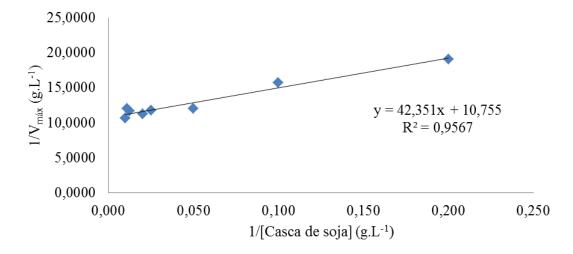


Figura IV.12: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Casca de soja.

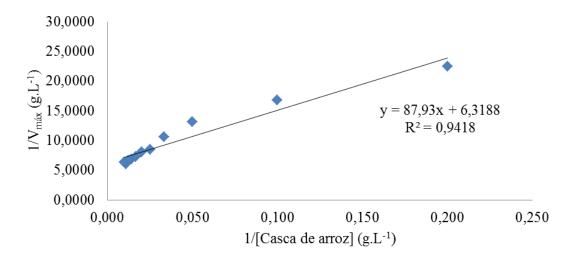


Figura IV.13: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Casca de arroz.

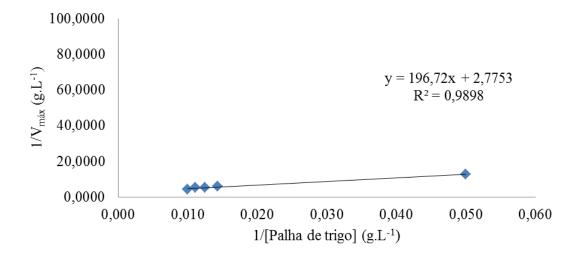


Figura IV.14: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Palha de trigo.

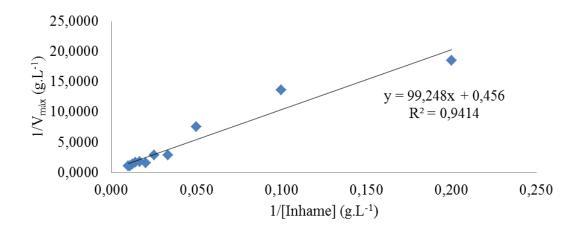


Figura IV.15: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Inhame.

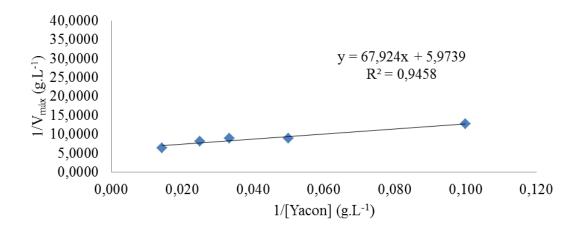


Figura IV.16: Representação gráfica linearizada para determinação dos parâmetros cinéticos k_m e v_{max} pelo método de Lineweaver-Burk para o substrato Yacon.

A figura IV.17 representa as atividades obtidas com a hidrólise dos substratos envolvidos neste estudo.

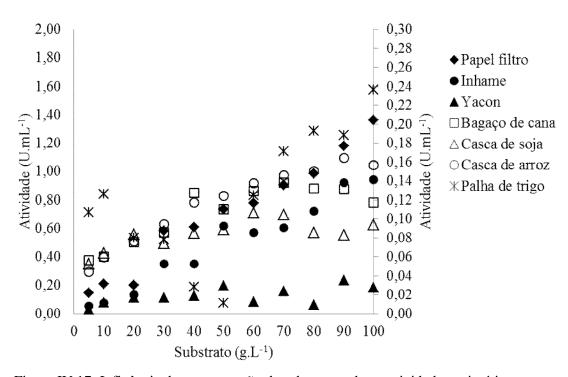


Figura IV.17: Influência da concentração de substrato sobre a atividade enzimática.

O eixo y da esquerda refere-se às atividades obtidas para papel filtro e inhame. Já o eixo y da direita refere-se às atividades obtidas para bagaço de cana, casca de soja e casca

de arroz, palha de trigo e yacon. As maiores atividades foram obtidas com o substrato papel filtro, variando de 0,14 U.mL⁻¹ com 5 g.L⁻¹ de substrato até o valor de 1,36 U.mL⁻¹ utilizando 100 g.L⁻¹ de substrato, seguido do resíduo agroindustrial inhame, onde as atividades variaram de 0,05 U.mL⁻¹ com 5 g.L⁻¹ de substrato até o valor de 0,94 U.mL⁻¹ com 100 g.L⁻¹ de substrato. Com o restante dos substratos envolvidos no estudo, a maior atividade obtida foi com o resíduo agroindustrial palha de trigo, com um valor de 0,23 U.mL⁻¹ utilizando 100 g.L⁻¹ de substrato.

A Tabela IV.8 resume os resultados obtidos da influência do substrato sobre as constantes cinéticas k_m e v_{max} para a celulase comercial novozym NS 50013 determinados pela método de Lineweaver-Burk.

Tabela IV.8: Efeito do substrato sobre os parâmetros da equação de Michaelis-Menten sobre a atividade de celulase.

Substrato	k_m (μ mol.m L^{-1})	v _{max} (U.mL ⁻¹)	α x 1000 (min ⁻¹)	\mathbb{R}^2
Papel Filtro	1115,9±585,2	3,64±1,42	2,400±0,090	0,9769
Bagaço de cana	92,4±26,5	$0,16\pm0,01$	1,732±0,377	0,9232
Casca de soja	$26,7\pm8,9$	$0,10\pm0,01$	3,745±1,124	0,9567
Casca de arroz	174,5±31,3	$0,21\pm0,01$	1,203±0,319	0,9418
Palha de trigo	211,6±44,9	$0,27\pm0,02$	1,276±0,445	0,9679
Inhame	16723,0±11492,2	29,80±19,40	1,744±0,065	0,9414
Yacon	91,9±13,8	$0,21\pm0,01$	2,285±0,725	0,9591

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos parâmetros equação de Michaelis-Menten para todos os substratos, e verificou-se que todas as previsões do modelo são significativas (dados não mostrados).

A taxa de reação máxima (v_{max}) foi obtida utilizando o substrato inhame seguido de filtro de papel, palha de trigo, casca de arroz, yacon, bagaço de cana e casca de soja. A enzima apresentou alta afinidade por casca de soja, uma vez que o seu valor para k_m de 26,7 μ mol.mL⁻¹, o mais baixo entre os substratos estudados. O Yacon e o bagaço de cana apresentaram valores de k_m de 91,9 e 92,4 μ mol.mL⁻¹, respectivamente, enquanto o papel

de filtro, a palha de trigo e a casca de arroz apresentaram valores para k_m de 1115,9; 211,6 e 174.5 μ mol.mL⁻¹, respectivamente.

A enzima apresentou menor afinidade com inhame, já que o valor para k_m foi de $16723,0~\mu mol.mL^{-1}$. No entanto, os parâmetros da equação de Michaelis-Menten obtidos para os substratos papel de filtro e inhame não são confiáveis devido ao seu alto erro padrão. Para estes substratos, verificou-se que um modelo de primeira ordem é mais apropriado para representar os dados, conforme é visto no valor de α , onde a estimativa de erro padrão é baixa para ambos os substratos.

De acordo com o critério utilizado para determinar o substrato mais adequado para realizar reação enzimática para obtenção de açúcares fermentáveis (equação III.8), pode-se observar que a casca de soja, seguido pelo papel de filtro, yacon, inhame, bagaço de cana, palha de trigo e casca de arroz são os substratos mais adequados (em ordem decrescente), uma vez que apresentaram os maiores valores de α. Além disso, os materiais com as mesmas estruturas físicas e químicas como o inhame e o yacon (rica em matérias de amido), bem como bagaço de cana e palha de trigo (rico em materiais lignocelulósicos) apresentaram valores semelhantes para o parâmetro α.

A partir dos resultados pode-se observar que a enzima avaliada neste estudo mostrou resultados satisfatórios quando utilizada para hidrolisar os substratos agroindustriais, uma vez que resultados semelhantes foram obtidos entre papel de filtro e outros substratos. Os substratos agroindustriais são estruturas mais complexas do que o papel filtro, devido à presença de lignina e hemicelulose e exigem a realização de um prétratamento da matéria-prima antes da hidrólise, ou até mesmo o uso de enzimas mais seletivas e eficientes. Para uma hidrólise eficiente da biomassa, um *pool* de enzimas que incluem celulases, xilanases, e outras enzimas se faz necessário (FARINAS *et al.*, 2010). Ambos os campos são intensamente relatados na literatura e pesquisadores de todo o mundo estão empenhados em desenvolver processos eficientes e economicamente viáveis para a hidrólise de materiais lignocelulósicos (ALVIRA et al., 2010).

Para a hidrólise de quitosana, a enzima celulase comercial bifuncional purificada, exibiu cinéticas de Michaelis-Menten com valores de k_m e v_{max} de 10 mg.ml⁻¹ e 0,164 U.ml⁻¹, respectivamente (LIU e XIA, 2006). A celulase purificada Cel-BL11 com peso molecular de 38 kDa tem um km de 11,25 mg.ml⁻¹ e v_{max} de 1250 µmol/min/mg para hidrólise de carboximetilcelulose (KO *et al.*, 2010).

Mawadza *et al.* (2000) estudaram celulases purificadas produzidas por duas cepas de *Bacillus* CH43 e HR68 e a enzima demonstrou valores de k_m de 1,5 e 1,7 mg ml⁻¹, respectivamente e v_{max} de 0,93 e 1,70 mmol glicose min⁻¹ mg proteína⁻¹, respectivamente, para hidrólise de carboximetilcelulose (CMC).

Mateos-Perez, Ortega e Busto (1996) caracterizaram celulase obtida de culturas de *Trichoderma reesei*, e utilizando carboximetilcelulose como substrato, a enzima apresentou valores de k_m e v_{max} de 1,32 mg.ml⁻¹ e 405.5 μ mol ml⁻¹ h⁻¹.

Wang *et al.* (2009) caracterizaram celulases haloestáveis purificadas de cepas *Salinivibrio* sp. NTU-05 com peso molecular de 29 kDa e obtiveram valores de km de 3,03 mg/ml e v_{max} de 142,86 mol/min/mg utilizando carboximetilcelulose como substrato. A atividade secundária e conformação de celulase foi investigada sob campos magnéticos estáticos e o k_m e v_{max} atingiram máximos inferiores a 0,30 T campo magnético (valor de k_m e v_{max} de 113,51 mg.ml⁻¹ e 0,46 mol de proteína/ml/min⁻¹, respectivamente) (RAN *et al.*, 2009).

CAPÍTULO V

- Os resultados obtidos permitem concluir que a atividade máxima da celulase é obtida em uma temperatura e faixa de pH de 40 50 °C e 5,2 5,5, respectivamente.
- Em relação à termoestabilidade, foi verificada uma redução de até 15% na atividade da enzima após 150 horas de reação em temperaturas 30 50 °C. No entanto, em temperaturas superiores a 50 °C a perda completa da atividade foi verificada em poucas horas de reação, mostrando estabilidade muito baixa acima desta temperatura.
- Os resultados obtidos sobre o efeito do pH sobre a estabilidade de celulase mostraram que praticamente não houve perda de atividade em pH 5,0 e 5,5. No entanto, para pH 4,5, houve uma redução de 40% sobre a atividade da enzima nas primeiras horas de reação, estabilizando ao longo do tempo de avaliação. Para o pH 3,5, houve uma perda total de reação de atividade dentro de minutos.
- A atividade de celulase foi inibida com a adição de cloreto de sódio na reação. A partir da concentração de 0,5 Molar houve uma maior queda nas atividades enzimáticas em relação às concentrações até 0,2 Molar, tanto para o substrato papel filtro, quanto para o substrato bagaço de cana, apresentando o mesmo comportamento em todas as concentrações estudadas.
- A partir dos resultados obtidos durante a avaliação dos substratos agroindustriais sobre as constantes cinéticas, observou-se que a celulase comercial avaliada apresenta resultados satisfatórios quando usada apenas para hidrolisar o polímero de celulose (papel filtro), enquanto que para os substratos agroindustriais a enzima apresenta baixo desempenho.
- Como os substratos agroindustriais são estruturas mais complexas do que papel de filtro, devido à presença de lignina e hemicelulose, o uso de pré-tratamento da matéria-prima antes de sua utilização ou a utilização de enzimas mais eficientes e seletivas torna-se necessário.

/	
CAPITULO	T7T
	v
CALLU	V .

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

CAP. VI – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos a partir da caracterização da enzima e utilização da celulase comercial NS 50013 e sua aplicação para hidrólise de resíduos agroindustriais, sugere-se que para trabalhos futuros seja realizado:

- Realização de pré-tratamentos dos resíduos agroindústrias utilizados;
- Utilização do *pool* de enzimas com celulases e xilanases e outras enzimas específicas para hidrólise dos materiais lignocelulósicos;
- Variação de concentrações enzimáticas para hidrólise de materiais lignocelulósicos;
- Caracterização dos substratos utilizados no estudo;
- Caracterização genética da enzima utilizada no estudo;
- Desenvolvimento de estudos com outros tipos de resíduos, como madeiras ou papéis (fontes de celulose), por exemplo.

,	
CAPITULO	T/TT
CALITULO	V 11

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALANI, F.; ANDERSON, W. A.; MOO-YONG, M., The taxonomy of *streptomyces sp.* with novel thermoalkalotolerant cellulases. Biotechnology Letters., v. 301, p. 123-126, 2008.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J., **Pretreatment tehcnologies for na efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review.** Bioresource Technology, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N., Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. Biotechnology for Biofuels, v. 4, p. 3, 2011.
- ARROYO, M.; MONTERO-SANCHES J.M.; SINISTERRA J.V., Thermal stabilization of immobilized lipase B from Candida antarctica on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. Enzyme Microbial Technology, v. 24, p. 3–12, 1999.
- BAHT, M. K., Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology advances, New York v. 18, p. 355-383, 2000.
- BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F., **Biochemical Engineering Fundamentals.** Mc Graw Hill Itnl Editions, Ed. 2, p. 928, 1986.
- BALLESTEROS, M., Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. Energía, v. 161, p. 29-34, 2001.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. **The biological degradation of cellulose.** FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, Netherlands, v. 13, p. 25-58, 1994.
- BUSTO, N. D.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M., Location, kinetics and stability induced in *trichoderma reese* cutures. Bioresource and Technology, v. 57, p. 187-192, 1996.
- CGEE, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia** para o desenvolvimento sustentável. 2011, Disponível em http://www.cgee.org.br/publicacoes/biblioteca_pub.html>, acesso em novembro de 2011.
- CHEN, J.; WANG, Q.; HUA, Z.; DU, G., Research and application of biotechnology in textile industries in China. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 40 (7), p. 1651-1655, 2006.
- CHEN, M.; QIN, Y.; LIU, Z.; LIU, K.; WANG, F.; QU, Y., Isolation and characterization of a 7-glucosidase from Penicillium decumbens and improving

- **hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation.** Enzyme and Microbial Technology, v. 46, p. 444 449, 2010.
- CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L., **Directed evolution of industrial enzymes: aa update.** Current opinion in Biotechnology, London, v. 14, p. 438-443, 2003.
- DAOUD, F. B.O.; KADDOUR, S.; SADOUN, T., **Adsorption of cellulase Aspergillus niger on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 75, p. 93–99, 2010.
- DAROIT, D. J.; SILVEIRA, S. T.; HERTZ, P. F.; BRANDELLI, A., Production of extracelular β -glucosidase by Monascus purpureus on different growth substrates. Process Biochemistry, Oxford v. 42 (5), p. 904-908, 2007.
- DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. Bioresource Technology, v. 98, p. 1695-1699, 2007.
- DIAS, M. O. S., Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço. Dissertação de Mestrado: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- DIENES, D.; EGYH;AZI, A.; RÉCZEY, K., **Treatment of recycled fiber with** *Trichoderma* **cellulases.** Industrial Crops and Products, v. 20, p. 11–21, 2003.
- EPOBIO, Wageningen International Conference Centre. 1st EPOBIO Workshop: Products from Plants the Biorefinery Future. 2007. Disponível em: http://epobio.net/workshop0605/0605ws_finalreport_v3.pdf>. Acesso em 15 jun. 2011.
- ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C., Sucrose hydrolysis by the thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficum*. Enzyme Microbial Technology, p. 28, v. 596-601, 2001.
- FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; JUNIOR, A. B.; TARDIOLI P. W.; NETO, V. B.; COURI, S., Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pHand temperature. New Biotechnology, v. 27, p. 6, 2010.
- FUKUSHIMA, S. R.; HATFIELD, R. D., **Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 4, p. 505 511, 2003
- GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y., Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal

- *Aspergillus terreus* **M11 under solid-state cultivation of corn stover.** Bioresource Technology, v. 99, p. 7623–7629, 2008.
- GAO, L.; WANG, F.; GAO, F.; WANG, L.; ZHAO, J.; QU, Y., Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* **JU-A10** for bioethanol production. Bioresource Technology, v. 102, p. 8339–8342, 2011 ou 2010.
- GARDA, A. L., Two genes ecoding na endoglucanase a cellulase-biding protein are clustered and corregulated by a TTA codon in *Streptomyces halsted* JM8. Biochemicaln of Journal, Hoboken, United States, v. 324, p. 403-11, 1997.
- GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B., **Studies on carboxymethilcellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete.** Bioresource Technology, Amsterdam, Netherlands, v. 77, p. 171-5, 2001.
- GOMES, E.; GUEZ, M A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R., Enzimas térmoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. Química Nova, v. 30, n.1, p. 136-145, 2007.
- GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. Crop Sci. v. 45, p. 820–831, 2005.
- GROGOREVSKI-LIMA, A. L.,; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. DA S.; COELHO, R. R., *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by products and its potencial use in the detergent an textile industries. Enzyme Microbial Technology, v. 37, p. 272-277, 2005.
- HAN, Y.; CHEN, H. Z., Synergism between hydrophobic proteins of corn stover and cellulase in lignocellulose hydrolysis. Biochemical Engineering Journal, v. 48, p. 218–224, 2009.
- HAN, Y.; CHEN, H., Characterization of b-glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource Technology, v. 99, p. 6081–6087, 2007.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A., **Industrial application of microbial lipases.** Enzyme and microbial technology, New York, v. 39, p, 235-251, 2006.
- HEIDORNE, F. O.; PÉROLA, O.; MAGALHÃES, A.; FERRAZ, A. L.; MILAGRES, A. M.F., Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 436–442, 2006.

- HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIMA, M.; GRANT, W. D.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.; HORIKOSHI, K., **Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic** *Bacillus agaradhaerens*. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 89 (2), p. 211–219, 2006.
- HSU, C.L.; CHANG, K.S.; LAI, Z.M.; CAHNG, T.C.; CHANG,Y.H.; JANG H.D., **Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase-producing Streptomyces for bioethanol production.** Biomass and Bioenergy, v. 35, p. 1878-1884, 2011.
- JAN, H.D.; CHEN, K. S., **Production and characterization of thermostable cellulases.** Microbial Biotechnology, v. 19, p. 263-268, 2003.
- JAYANI, R. S.; SHIVALIKA, S.; GUPTA, R., Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochemistry, Oxford v. 40, p. 2931-2944, 2005.
- JEYA, M.; NGUYEN, N.P.T.; MOON H.J.; KIM, S.H.; LEE, J.K., Marimuthu Jeya a,c, Ngoc-Phuong-Thao Nguyen a, Hee-Jung Moon b, Sang-Hwan Kim a, Jung-Kul Lee. Bioresource Technology, v. 101, p. 8742–8749, 2010.
- JOHNSON, K. G.; LANTHIER, P. H.; GOCHNAUER, M. B., Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. Archives of Microbiology, v. 143, p. 370–378, 1996.
- JORDAN, J.; KUMAR CHALLA, S.S.R.; THEEGALAA, C., **Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 68, p. 139–146, 2011 ou 2010.
- KASHYAP D. R.; VOHRA P. K.; CHOPRA S.; TEWARI, R., **Applications of pectinases in the commercial sector: a review.** Bioresource Technology, Oxford, v. 98, p. 74-81, 2007.
- KHOSHNEVISAN, K.; BORDBAR, A.K.; ZARE, D.; DAVOODI, D.; NORUZI, M.; BARKHI, M.; TABATABAEI, M., Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. Chemical Engineering Journal, v. 171, p. 669–673, 2011.
- KIELING, D. D., **Enzimas: Aspectos gerais.** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianopolis, 2002.
- KIM,, J. Y.; HUR, S. H.; HONG, J. H., **Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic** *Bacillus* **sp. HSH-810.** Biotechnology Letters, v. 27, p. 313-316, 2005.

- KLYOSOV, A. A. **Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation.** Journal of Biochemistry, Tokio, Japan, v. 29, n. 47, p. 77 85, 1990.
- KO, T. C.; LIN, P.; CHANG, K.; TU, J.; WANG, Y.; YANG, C., Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*. Bioresource Technology, v. 101, p. 7882-7888, 2010.
- KRISHNA S. H.; PRABHAKAR, Y.; RAO, R. J., Saccharification studies of lignocellulosic biomass from Antigonium leptopus Linn. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 59, p. 39-42, 1998.
- LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G. NILVEBRANT, N.O., **The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood.** Enzyme and Microbial Technology, v. 24, p. 151-159, 1999.
- LEE, Y.; KIM, B.; LEE, B.; JO, K.; LEE, N.; CHUNG, C.; LEE, Y; LEE, J., Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. Bioresource Technology, v. 99, p. 378-386, 2008.
- LEMOS, J. L. S., Seleção de microrganismo para produção de xilanases em bagaço de cana-de-açúcar. In: Série Tecnologia Ambiental CETEM/MCT. Rio de Janeiro, 2006.
- LEONOWICZ, A.; CHO, J. LUTEREK, A.; WILKOLAZKA, A.; WOJTASWASILEWSKA, S.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J., Fungal laccase: Properties and activity on lignin. Jornal Basic Microbiology, v. 41, p. 185-227, 2001.
- LI, C.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K., Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. Bioresource Technology, v. 98, p. 1366–1372, 2006.
- LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q., Thermostable cellulase production of Aspergillus fumigatus **Z5** under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 65, p. 717-725, 2011.
- LIU, J.; XIA, W., Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase. Biochemical Engineering Journal, v. 30, p. 82–87, 2006.
- LU, J.; REYE, J.; BANERJEE, S., Temperature dependence of cellulase hydrolysis of paper fiber. Biomass and Bioenergy, v. 34, p. 1973-1977, 2010.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. H. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. Biotechnology and Bioengineering, v. 77, p. 467-475, 2002.

LYND, L. R.; WEIMER, L. J.; VAN ZIL, W. H.; PRETORIUS, I. S., Microbial Cellulose utilization: Fundamentals and Biothecnology. Mocrobiology end Molecular Biological Reviews, v. 66 (3), p. 506-577, 2002.

MANDELS, M.; STERNBERG, D., **Recent advances in cellulase technology**. Jornal Fermentation Technology, v. 54, p. 267-286, 1976.

MANSFIELD, S. D.; MEDER, R. Cellulose hydrolysis the role of monocomponent cellulases in crystaline cellulose degradation. Cellulose, Dordrecht, Netherlands, v. 10, p. 159-69, 2000 ou 2003.

MARGESIN, R.; SCHINNER, S., **Potential of halotolerant and halophilic microorganismsfor biotechnology.** Extremophiles, v. 5, p. 73–83, 2001.

MAWADZA, C.; HATTI-KAUL, R.; ZVAUYA, R.; MATTIASSON, B., **Purification and characterization of cellulases produced by two** *Bacillus* **strains.** Journal of Biotechnology, v. 83, p. 177–187, 2000.

MATEOS-PEREZ, M; ORTEGA, N.; BUSTO, M. D., Location, kinetics and stability of cellulases induced in *trichoderma reesei* cultures. Bioresource Technology, Grat Britain, v. 57, p. 187-192, 1996.

MAZUTTI, M. A.; CENI, G.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., **Production of inulinase** by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 30, p. 297-304, 2007.

MENON, V.; PRAKASH, G.; RAO, M., Value added products from hemicelluloses: Biotechnological perspective. Global Journal of Biochemistry, v. 1, Issue 1, 2010.

MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chemical, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C., Chemical analysis of Pinus oocarpa wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. Revista Árvore, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK A.; VAINSTEIN, M. H, Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative

study with commercial detergent formulations. Bioresource Technology, Oxford, v. 97, p. 1217-1224, 2006.

MUNGUÍA, A.; RAMÍREZ, R., **Aplicaciones en alimentos y medicina.** Técnologia Enzimática, México: Dirección General de Publicaciones, 1987.

MUSSATO S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M., Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. Ciência Hoje, São Paulo, v. 41 (242), p. 28-33, 2007.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G.; A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnology and Biofuels, edição 1, pag. 7, 2008.

RAN, J.; JIA, S.; LIU, Y.; WU. S., Characterization of cellulase under various intensities of static magnetic fields. Catalysis Communications, v. 11, p. 91–95, 2009.

PALJEVAC, M.; PRIMOZIC, M.; HABULIN, M.; NOVAK, Z.; KNEZ, Z., **Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on silica gels at low and high pressures.** Jornal of Supercritical Fluids, v. 43, p. 74–80, 2007.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B.; SANNIA, G.; Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus Pleurotus ostreatus. Appl and Environmental Microbiology, v. 3, p. 920-924, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassavabagasse.** Bioresouce Technology, Amsterdam, v. 74, p. 81-87, 2000.

PANDEY, A., Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology, v. 46, p. 541–549, 2010.

PELACH, M. A.; PASTOR, F. J.; PUIG, J.; VILASECA, F.; MUTJE, P., **Enzymic deinking of old newspapers with cellulase.** Process Biochemistry, London, v. 38, p. 1063-1067, 2003.

PERCIVAL ZANGH, P. Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R., Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnology Advances, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.

PEREIRA Jr., N., Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria, ed. 1, p. 67, 2007.

- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery.** In Series on Biotechnology, UFRJ, Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.
- PICART, P. D.; PASTOR, F. I. J., *Stachybotrys atra* **BP-A** produces alkali resistant and thermostable cellulases. *Antonie van Leeuwenhoek*. Enzyme and Microbial Technology v. 94, p. 307–316, 2008.
- RABELO, S. C., Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-deaçúcar. Dissertação de Mestrado: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- RAHMAN, Z.; SHIDA, Y.; FURUKAWA, T.; SUZUKI, Y.; OKADA, H.; OGASAWARA, W.; MORIKAWA, Y., **Evaluation and characterization of Trichoderma reesei cellulase and xylanase promoters.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 82, p. 899–908, 2009.
- RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V., **The structure and mechanisms of action of cellulolytics enzymes.** Biochemistry, Moscow, v. 65, n. 8, p. 850-71, 2002a.
- RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V., **Microbial cellulases** (**Review**). Applied Biochemistry and Microbiology, Moscow, v. 38, n. 4, p. 304-21, 2002b.
- RAN, J.; JIA, S.; LIU, Y.; WU, S., Characterization of cellulase under various intensities of static magnetic fields. Catal Commun, v. 11, p. 91-95, 2009.
- RASTOGI, G.; BHALLA, A.; ADHIKARI, A.; BISCHOFF, K. M.; HUGUES S. R.; CHISTOPHER, L. P.; SANI, R. K., Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. Bioresource Technology, v. 101, p. 8798–8806, 2010.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; ELCHHORN, S. E. **Biologia vegetal**, ed. 6, Guanabara Koogan. p. 928, 2001.
- SAIBI, W.; GARGOURI, A., **Purification and biochemical characterization of an atypical** 7 **-glucosidase from Stachybotrys microspora.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 72, p. 107–115, 2011.
- SANTOS, A. M. P.; OLIVEIRA M. G. G.; MAUGERI, F., Modeling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. Bioresource Technology, v. 98, p. 3142-3148, 2007.

SANTOS, A. M. P., **Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de** *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus.* Campinas. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SAVILLE, A. B.; KHAVKINE, M.; SEETHARAM, G.; MARANDI, B.; ZUO, Y.L., Characterization and Performance of Immobilized Amylase and Cellulase. Applied Biochemistry and Biotechnology, p. 113–116, 2004.

SCHUCHARDT, U; RIBEIRO, M.L. A Indústria Petroquímica no Próximo Século: Como Substituir o Petróleo como Matéria-prima? Química Nova, v. 24, p. 247-251, 2001.

SCHÜLEIN, M., **Protein engineering of cellulases.** Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, Netherlands, v. 1543, p. 23-52, 2000.

SCHWARZ, W. H., **The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria.** Applied Microbiology and Biotechnology, Heidelberg, Germany, v. 56, p. 34 - 49, 2001.

SHANMUGHAPRIYA, S.; SEGHAL KIRAN, G.; SELVIN, J.; THOMAS, T. A.; RANI, C., **Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated** *Marinobacter* **sp. MSI032**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 162, p. 625–640, 2010.

SHULER, M. L.; KARGI, F., **Bioprocess Engineering – Basic Concepts.** Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New Jersey, 1992.

SIMONAKA, A.; KOGA J.; BABA, Y.; NISHIMURA, T.; MURASHIMA, K., KUBOTA, H.; KONO, T. Specific characteristics of family 45 endoglucanases from Mucorales inthe use of textiles and laundry. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 70, p. 1013–1016, 2006.

SINGH, R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K.; BISHNOI N. R., Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of Aspergillus heteromorphus using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, v. 48, p. 28–35, 2009.

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

SONG, J.M.; WEI, D.Z., Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. Biomass and Bioenergy, v. 34, p. 1930-1934, 2010.

- SOUZA, R. L.A.; **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando resíduo de maracujá como substrato.** Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Campina Grande UFCG. Campina Grande PB, 2008.
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A., Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production. Renew Energy, v. 34, p. 421-428, 2009.
- SUN, Y.; CHENG, J., **Hydrolyusis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresource Technology, Oxford, v. 83, p. 1-11, 2002 ou 2005.
- SZIJÁRTÓ, N.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; ALAPURANEN, M.; VEHMAANPERA, J.; RÉCZEY, K.; VIIKARI, L., **Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of Melanocarpus albomyces.** Journal of Biotechnology, v. 136, p. 140–147, 2008.
- TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O., **Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol.** Semina: Ciências Agrárias, v. 25 (4), p. 315-330, 2004.
- TREICHEL, H., Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meio industriais pré-tratados. Campinas. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., Technical viability of the production, partial characterization of inulinase using pretreated agroindustrial residues. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 32, p. 425-433, 2009.
- TRIVERDI, N.; GRUPTA, V.; KUMAR, M., KUMARI, P.; JHA, B., **An alkalihalotolerant cellulase from Bacillus flexus isolated from green seaweed Ulva lactuca.** Carbohydrate Polymers, doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.069, 2010.
- UEDA, M.; GOTO, T.;NAKAZAWA, M.; MIYATAKE, K.; SAKAGUCHI, M.; INOUYE, K., **A novel cold-adapted cellulase complex from Eisenia foetida: Characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulase, β-glucosidase, β-1,3 glucanase, and β-xylosidase**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, v. 157, p. 26–32, 2010 ou 2009.
- VALLANDER, L., ERIKSSON, K.E., **Enzymic saccharification of pretreated wheat straw.** Biotechnology and Bioengineering, v. 27, Issue 5, p. 650 659, 1985.

VANDAMME, E. J.; DERYCKE, D. G., Microbial inulinases: Fermentation process, properties, and applications. Advances in Applied Microbiology, v. 29, p. 139-176, 1983.

VOGET, S.; STEELE, H.; STREIT, W. R., Chracterization of a metagenome-derived 468 halotolerant cellulase. Journal of Biotechnology, 126, 26-36, 2006.

WANG, T.; LIU, X.; YU, Q.; ZHANG, X.; QU, Y.; GAO, P., Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. Biomolecular Engineering, v. 22, p. 89–94, 2005.

WANG, C.Y.; HSIEHA, Y.R.; NGA, C.C.; CHANB, H.; LINC, H.T.; TZENGA, W.S.; SHYU, Y.T., **Purification and characterization of a novel halostable cellulase from** *Salinivibrio sp.* **strain NTU-05.** Enzyme and Microbial Technology, v. 44, p. 373–379, 2009.

WANG, W.; YAN, L.; CUI, Z.; GAO, Y.; WANGA, Y.; JING, R., Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. Bioresource Technology, v. 102, p. 9321–9324, 2011.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. Process Biochemistry, v. 42, p. 1614, 2007.

WILSON D. B., **Cellulases and biofuels.** Current Opinion in Biotechnology, v. 20, p. 295–299, 2009.

WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H., Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. LWT- Food Science and Technology, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

ZIEGLER, I. M.; HOLMGREN, A.; FORSLING, W.; LINDBERG, M.; RANHEIMER, M., Mechanism of the adsorption process of pinosylvin and some polyhydroxybenzenes onto the structure of lignin. Vibrational Spectroscopy, v. 36, p. 65-72, 2004.