Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium funiculosum* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Roberto Nobuyuki Maeda

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)
Igor Polikarpov, *PhD* (IFSC/USP)

Rio de Janeiro
Outubro de 2010

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium funiculosum* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

ROBERTO NOBUYUKI MAEDA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em ciências (*DSc.*).

Orientador: Nei Pereira Jr., *PhD.* (EQ/UFRJ)
Igor Polikarpov, *PhD.* (IFSC/USP)

Rio de janeiro, RJ – Brasil
Outubro 2010

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium funiculosum* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

ROBERTO NOBUYUKI MAEDA

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (*DSc.*).

Aprovada por:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD.*
(Orientador Presidente)

Prof. Igor Polikarpov, *PhD.*
(Orientador)

Prof. Spartaco Astolfi Filho, *DSc.*

Lídia Maria Melo Santa Anna, *DSc.*

Profª. Marta Antunes Pereira Langone, *DSc.*

Profª. Magali Christe Cammarota, *DSc.*

Prof. Donato Alexandre Gomes Aranda, *DSc.*

Rio de janeiro, RJ – Brasil
Outubro 2010

M184p Maeda, Roberto Nobuyuki

Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração / Roberto Nobuyuki Maeda, 2010.

xxiv, 197 f.: il

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Nei Pereira Jr. (*PhD.*)
Igor Polikarpov (*PhD.*)

1. Celulases. 2. *Penicillium funiculosum*. 3. Etanol de segunda geração – Teses. I. Pereira Junior, Nei & Polikarpov, Igor (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. III. Título.

CDD: 661.82.

Aos meus pais,

Reiichi Maeda e Haruko Maeda

Dedico

A riqueza do conhecimento não pode ser usurpada por ladrões,
confiscada por reis ou dividida entre irmãos.
Quanto mais se gasta mais ela cresce.

(Vijay V. Joshi)

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a Lua toda
Brilha, porque alta vive.

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Aos meus pais Reiichi Maeda e Haruko Maeda pelo incentivo;

Ao professor Nei pela orientação, ensinamentos (sempre com muita sapiência), exemplo e confiança em mim depositada para realização deste trabalho e pela amizade e incentivos desde os tempos de graduação;

Ao professor Igor pela orientação nas etapas de purificação e caracterização das enzimas e por me receber tão bem em seus laboratórios no IFSC/USP;

À Vanessa Rocha pela amizade, incentivo, auxílio, pelas palavras sempre sinceras e momentos de descontração;

À Carolina Barcelos pela amizade, diversão, incentivo e estar sempre disposta a ajudar;

À Mariana Mello por toda a ajuda, dedicação, amizade e diversão;

À Viviane Serpa por toda sua ajuda, amizade, diversão e ensinamentos nas fases de purificação e caracterização de proteínas;

À Neumara Luci pela amizade e momentos de descontração;

Ao Gabriel Betancur pela amizade e companheirismo;

À amiga Mariana Peñuela pela valiosa colaboração no início dos trabalhos experimentais e por toda a força e incentivos;

À grande amiga Ângela Cordeiro, pelo incentivo e confiança;

À Isislayne, que mesmo chegando ao final desta fase, me deu grande auxílio, com dedicação, tanto em bancada quanto na parte textual. Além dos bons momentos de descontração;

A todos os estagiários e/ou alunos de Iniciação Científica do LADEBIO que tiveram contribuição direta na realização deste trabalho: Daniele Fernandes, Mariana Mello, Daniele Silveira, Eleandro Walverde, Kelly Cristina, Ludymilla Bastos, Ághata Rodrigues, Letícia Félix, Sabrina Mesquita, Daiane Santos, Isislayne Sabino;

A todos os estagiários do LABCRISTAL/IFSC Renata Alves, Maria Luiza, Flávio, Gabriela Medeiros, por toda ajuda e momentos de diversão;

Aos funcionários do LADEBIO Jorge e Luiz;

Aos técnicos do IFSC Bianca, Suzana, Kelvin e especialmente para Maria por toda ajuda durante os trabalhos realizados no LABCRISTAL;

À professora Maria Isabel Rodrigues/Unicamp pelas valiosas dicas nos planejamentos experimentais;

Aos amigos e colegas de laboratório Elisa, Marcelle, Aline Lima, Verônica, Élcio, Patrícia, Paulo, Daiana, Elaine, Juliana, Felipe, Isadora, Eloísa, Gabriela, Fabiano;

Aos professores da Escola de Química que contribuíram com a minha formação;

À Universidade Federal do Rio de Janeiro pela oportunidade;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida e auxílio financeiro;

À PETROBRAS pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Capítulo 1 1
APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE 1

Capítulo 2 7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
2.1. Celulases 7
2.1.1. Classificação e nomenclatura das celulases 8
2.1.2. Mecanismos de hidrólise 12
2.1.3. Ação sinérgica das celulases 16
2.1.4. Substratos para enzimas celulolíticas 19
2.1.5. Produção de celulases 23
2.1.6. Microrganismos produtores de celulases 23
2.1.7. Mecanismo de regulação da síntese de celulases em fungos filamentosos 29
2.1.8. Formação de indutores por transglicosilação 29
2.1.9. Repressão catabólica na produção de celulases 32
2.1.10. Via de secreção 33
2.1.11. Proposta para produção industrial de celulases 34
2.1.12. Separação, concentração e purificação de enzimas 37
2.1.12.1. Etapas iniciais de separação e concentração do preparado enzimático 37
2.1.12.2. Engenharia de Produto Enzimático (etapas finais de acabamento e melhoramento de desempenho) 40
2.1.13. Mercado de celulases e perspectivas 41
2.2. *Penicillium funiculosum*: posição taxonômica e características 44
2.3. Materiais lignocelulósicos 45
2.3.1. Celulose 46
2.3.2. Hemiceluloses 47
2.3.3. Interação hemicelulose-celulose 49
2.3.4. Lignina 50
2.4. Biotecnologia para produção de etanol de segunda geração 51
2.4.1. Conceito de SSF 53
2.4.2. Pré-tratamento do material lignocelulósico 54
2.4.3. Hidrólise enzimática e fatores limitantes 56
2.4.4. Microrganismos produtores de etanol de segunda geração 57

2.4.5. Carga enzimática 58
2.4.6. Carga de substrato 58
2.4.7.Biomassa celular (tamanho de inóculo) 59
2.4.8. Breve sumário de produção de etanol por processo SSF de hexoses 60
2.5. Considerações gerais 63

Capítulo 3 64
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 64

Capítulo 4 66
MATERIAIS E MÉTODOS 66
4.1. Microrganismo e padronização do inóculo 66
4.2. Pré-tratamento do bagaço 67
4.3. Caracterização do bagaço de cana e celulignina 68
4.4. Avaliação do caráter constitutivo das celulases e papel indutor da celulose na produção de enzimas celulolíticas por *P. funiculosum* 70
4.5. Produção de celulases por *P. funiculosum*: planejamentos experimentais para otimização da concentração das fontes de nitrogênio 71
4.5.1. Validação da otimização da fonte de nitrogênio 74
4.6. Produção de celulases em biorreator: avaliação do tipo e tamanho de inóculo 74
4.7. Concentração dos extratos brutos enzimáticos 76
4.7.1. Concentração em evaporador rotativo 76
4.7.2. Concentração por ultrafiltração tangencial em sistema de membranas de fibras ocas 77
4.8. Avaliação da estabilidade do preparado enzimático 78
4.9. Identificação pré-eliminar das enzimas com atividade CMCásica e β-glucosidasica por meio de zimograma 78
4.9.1. Eletroforese SDS-PAGE e gel nativo 78
4.9.2. Revelação das bandas 79
4.10. Purificação e caracterização de enzimas do preparado celulásico LADEBIO/PETROBRAS 80
4.10.1. Concentração e troca de tampão do extrato enzimático - Precipitação com sulfato de amônio 80
4.10.2. Separação de proteínas do extrato total por cromatografia de toca iônica 82
4.10.3. Digestão com tripsina das bandas da eletroforese SDS-PAGE das

amostras purificadas 83
4.10.4. Identificação das proteínas isoladas por espectrometria de massa 83
4.10.5. Cromatografia de interação hidrofóbica 84
4.10.6. Determinação da massa molecular das enzimas purificadas 85
4.10.7. Eletroforese em gel nativo 85
4.10.8. Atividade enzimática das enzimas purificadas 86
4.10.9 Ensaios de fluorescência 86
4.10.10. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{MAX}, aparentes, para atividade CMCásica e β-glucosidásica do preparado celulásico 86
4.10.10.1. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação de β-glucosidásica e CMCásica 86
4.10.10.2. Cálculo dos parâmetros K_M e V_{MAX} 87
4.11. Hidrólise da celulignina utilizando extrato enzimático concentrado de *P. funiculosum* 88
4.12. Avaliação de diferentes níveis de deslignificação e efeito do BSA na hidrólise de celulignina 89
4.13. Produção de etanol de segunda geração por processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) utilizando o preparado celulásico LADEBIO/BR 89
4.13.1. Produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* JP1 em biorreator 90
4.13.2. Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático: ensaios em fermentômetro 90
4.13.3. Produção de etanol usando celulignina em processo SSF alimentado 91
4.14. Procedimentos analíticos 91
4.14.1. Quantificação da atividade em papel de filtro 91
4.14.2. Quantificação da atividade CMCásica 92
4.14.3. Quantificação da atividade β-glucosidásica 92
4.14.4. Quantificação da atividade xilanásica 93
4.14.5. Determinação do teor de proteínas 93
4.14.6. Quantificação de glicose, celobiose, xilose e etanol por CLAE 93

Capítulo 5 94
RESULTADOS E DISCUSSÃO 94
5.1. Composição do bagaço e celulignina de bagaço de cana-de-açúcar 95

5.2. Avaliação do caráter constitutivo e papel indutor da celulose na produção de celulases por *Penicillium funiculosum* 96
5.3. Planejamento sequencial para otimização da fonte de nitrogênio para produção de celulases por fermentação submersa de celulignina 101
5.4. Validação da otimização das fontes de nitrogênio 118
5.5 Produção de celulases em biorreator 120
5.5.1 Avaliação da forma de obtenção do inóculo 120
5.5.2 Efeito do tamanho de inóculo 123
5.5.3 Produção de xilanases por *P. funiculosum* em biorreator 126
5.5.4 Considerações gerais sobre a produção de celulases 127
5.6. Concentração dos extratos enzimáticos de *P. funiculosum* 129
5.7. Estabilidade do preparado celulásico 131
5.8. Identificação preliminar das enzimas no pool concentrado com atividades CMCásica e β-glucosidásica em zimograma 133
5.9. Purificação e caracterização das enzimas de *P. funiculosum* no extrato bruto concentrado 134
5.9.1. Precipitação com sulfato de amônio 134
5.9.2. Purificação de enzimas do preparado concentrado por cromatografia de troca iônica 136
5.9.3. Identificação das enzimas por LC/MS/MS 138
5.9.4. Massas moleculares das celulases de *P. funiculosum* 141
5.9.5. Atividades das enzimas purificadas 142
5.9.6. Eletroforese em gel nativo das enzima CBH I e da proteína 7 144
5.9.7. Ensaios de fluorescência 144
5.10. Parâmetros cinéticos KM e Vmax aparentes do preparado enzimático LADEBIO/BR 148
5.11. Aplicação do preparado celulásico LADEBIO/BR na hidrólise de celulignina de bagaço de cana 150
5.12. Hidrólise enzimática do bagaço com diferentes níveis de deslignificação e efeito da adição de BSA na hidrólise do bagaço pré-tratado 155
5.13. Produção de etanol de segunda geração por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) utilizando o preparado celulásico LADEBIO/BR 157
5.13.1. Atividades celulásicas 157
5.13.2. Produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* JP1 158

5.13.3. Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado de celulignina de bagaço de cana utilizando o preparado celulásico LADEBIO/BR 159
5.13.4. Produção de etanol de segunda geração por processo SSF alimentado em biorreator 160

Capítulo 6 167
CONCLUSÕES E SUGESTÕES 167

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 170

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Configuração dos enovelamentos característicos dos grupos de glicosil hidrolases. Configuração jelly roll barrel (A); β-hélice (B); (β/α)8 ou TIM barrel (C); configuração α+β (D); enovelamento somente β-hélice (E). 11
Figura 2.2. Representação esquemática de uma exoglucanase (CBH I) atuando sobre uma fibrila de celulose. 13
Figura 2.3. Esquema das etapas da hidrólise enzimática da celulose. 14
Figura 2.4. Mecanismo de ação das hidrolases do tipo retenção. 15
Figura 2.5. Mecanismo de ação das hidrolases do tipo inversão. 16
Figura 2.6. Distribuição das atividades de endoglucanase (cinza), exoglucanase (preto) e β-glucosidase (branco) no extrato enzimático bruto de *P. funiculosum* e em preparações comerciais. 24
Figura 2.7. Modelo de indução de celulases em Hipocrea jecorina. 30
Figura 2.8. Modelo de indução de celulases em Penicillium purpurogenum. 31
Figura 2.9. Seção de produção de pré-inóculo proposta por 34
Figura 2.10. Seção de produção de celulases proposta por 35
Figura 2.11. Esquema da filtração convencional e filtração tangencial. À esquerda, as curvas típicas de fluxo do permeado em função do tempo. 39
Figura 2.12. Ilustração do fungo filamentoso *Penicillium funiculosum*: 45
Figura 2.13. Ligações de hidrogênio inter e intra cadeias lineares de celulose, formando estrutura cristalina e ordenada. 47
Figura 2.14. Estrutura de xiloglucana, principal hemicelulose de dicotiledôneas. 48
Figura 2.15. Esquema da estrutura de hemicelulose típica de monocotiledôneas. 48
Figura 2.16. Esquema da estrutura da celulose, sua estrutura de repetição, a celobiose e interação com hemicelulose. Estão excluídos os domínios pécticos e protéicos. 50
Figura 2.17. Álcoois precursores da biossíntese da lignina. 51
Figura 2.18. Representação esquemática de um processo SSF. 54
Figura 2.19. Influência da carga de sólidos (A), enzimas (B) e concentração de células (C) no rendimento de etanol em processo SSF de diferentes materiais lignocelulósicos: palha de cevada pré-tratado (círculo), abeto pré-tratado (losângulo), salix pré-tratado (quadrado), salgueiro pré-tratado (triângulo) e sabugo de milho pré-tratados (×). WIS: sólidos insolúveis em água 59
Figura 4.1. Aspecto macroscópico do fungo *Penicillium funiculosum* em meio PDA (A) e aspecto microscópico em microcultivo (B). 67

Figura 4.2. Aspecto do bagaço em diferentes etapas do pré-tratamento. (A) bagaço de cana seco; (B) bagaço cominuído; (C) após pré-tratamento com ácido sulfúrico 1% (v/v); (D) após pré-tratamento com hidróxido de sódio 4 % (m/v). 68
Figura 4.3. Biorreator Biostat B utilizado para produção de celulases por P. funicusolum. 76
Figura 4.4. Sistema de filtração tangencial em membranas de fibras ocas de polissulfona. 77
Figura 4.5. Ilustração do preparado celulásico LADEBIO/BR. 78
Figura 4.6. Akta. Sistema para cromatografia líquida de rápida performance (FPLC). 82
Figura 5.1. Produção de enzimas com atividade FPásica em meios com diferentes proporções de glicose e celulose. 99
Figura 5.2. Produção de enzimas com atividade CMCásica em meios com diferentes proporções de glicose e celulose. 99
Figura 5.3. Produção de enzimas com atividade β-glucosidásica em meios com diferentes proporções de glicose e celulose. 100
Figura 5.4. Atividades celulásicas produzidas em meio contendo como fonte de carbono, unicamente celulose microcristalina ou celulignina de bagaço de cana. 100
Figura 5.5. Diagrama de Pareto para atividade FPásica. Planejamento fatorial 2^4. 102
Figura 5.6. Diagrama de Pareto para atividade CMCásica. Planejamento fatorial 2^4. 103
Figura 5.7. Diagrama de Pareto para atividade β-glucosidásica. Planejamento fatorial 2^4. 103
Figura 5.8. Diagrama de Pareto para o teor protéico. Planejamento fatorial 2^4. 104
Figura 5.9. Diagrama de Pareto para atividade FPásica. Planejamento fatorial 2^3. 107
Figura 5.10. Superfície de resposta da atividade FPásica em função da uréia e extrato de levedura. 107
Figura 5.11. Diagrama de Pareto para atividade CMCásica. Planejamento fatorial 2^3. 108
Figura 5.12. Superfície de resposta da atividade CMCásica em função da uréia e extrato de levedura. 109
Figura 5.13. Diagrama de Pareto para atividade β-glucosidásica. Planejamento fatorial 2^3. 110
Figura 5.14. Superfície de resposta da atividade β-glucosidásica em função da uréia e extrato de levedura. 110
Figura 5.15. Diagrama de Pareto para atividade FPásica. Delineamento composto central rotacional (DCCR). 113
Figura 5.16. Diagrama de Pareto para atividade CMCásica. Delineamento composto central rotacional (DCCR). 114
Figura 5.17. Diagrama de Pareto para atividade β-glucosidásica. Delineamento

composto central rotacional (DCCR). 114
Figura 5.18. Superfície de resposta da otimização da fonte de nitrogênio para atividade FPásica. 115
Figura 5.19. Superfície de resposta da otimização da fonte de nitrogênio para atividade CMCásica. 116
Figura 5.20. Superfície de resposta da otimização da fonte de nitrogênio para atividade β-glucosidásica. 116
Figura 5.21. Superfície da função *Desirability* para otimização das fontes de nitrogênio para produção de celulases por *Penicillium funiculosum*. 119
Figura 5.22. Perfil cinético da produção de celulases por *P. funiculosum* em biorreator. 122
Figura 5.23. Perfil cinético da produção de celulases em biorreator inoculado com 5 % v/v (A) e 10 % v/v (B) de pré-inóculo. 124
Figura 5.24. Perfil cinético da produção de proteínas em biorreator inoculado com 5 e 10%v/v de pré-inóculo de células de *P. funiculosum*. 125
Figura 5.25. Atividades específicas de celulases de *P. funiculosum* em biorreator inoculado com 5 % v/v (A) e 10 % v/v (B) de pré-inóculo. 125
Figura 5.26. Perfil cinético da produção de proteínas e atividades xilanásica e avicelásica. Biorreator inoculado com 10 % v/v de pré-inóculo. 127
Figura 5.27. Evolução da produção de celulases durante as etapas de otimização da fonte de nitrogênio por meio de planejamentos experimentais em frascos agitados e em biorreatores. PE: planejamento de experimentos; BR 5%: biorreator inoculado com 5%v/v de pré-inóculo; BR 10%: biorreator inoculado com 10%v/v de pré-inóculo. 128
Figura 5.28. Estabilidade do preparado celulásico de *P. funiculosum*, concentrado em rotaevaporador a vácuo e incubado a 37 e 50°C. 132
Figura 5.29. Estabilidade do preparado celulásico de *P. funiculosum*, concentrado por ultrafiltração em membrana (LADEBIO/BR) e incubado a 37 e 50°C. 132
Figura 5.30. Estabilidade do preparado celulásico de *P. funiculosum* frente ao armazenamento sob refrigeração a 7°C. 133
Figura 5.31. Separação eletroforética de proteínas do extrato bruto de *P. funiculosum*. A – Eletroforese SDS-PAGE; B – Zimograma de CMCases; C – Zimograma de β-glucosidases. 134
Figura 5.32. Porcentagem de recuperação de atividades celulásicas após precipitação com sulfato de amônio. 135
Figura 5.33. Separação eletroforética de proteínas do extrato celulásico precipitado com sulfato de amônio (20 a 80% da saturação). MM: padrão de massa molecular;

Dial: extrato enzimático dialisado (antes de precipitação). 136
Figura 5.34. Cromatografia de troca aniônica da purificação de proteínas secretadas por *P. funiculosum* em Äkta Purifier. Em vermelho, o aumento da proporção de uso da bomba B, representando o gradiente de força iônica. 137
Figura 5.35. Géis SDS-PAGE das frações obtidas na purificação de enzimas por cromatografia de troca aniônica. Os números indicam as identificações dos picos do cromatograma da Figura 5.34. MM: marcador de massa molecular; ExB: extrato enzimático bruto. 138
Figura 5.36. Gel de eletroforese em condições nativas da proteína 7 (PR7) e da CBH I. MM marcador de massa molecular. 144
Figura 5.37. Ensaio de fluorescência de β-glucosidase purificada de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min. 145
Figura 5.38. Ensaio de fluorescência da proteína 7 purificada de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min. 146
Figura 5.39. Ensaio de fluorescência de CBH I purificada de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min. 146
Figura 5.40. Ensaio de fluorescência de CBH II purificada de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min com a proteína. 147
Figura 5.41. Ensaio de fluorescência de endoglucanase purificada de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min. 147
Figura 5.42. Curvas de progresso da ação de β-glucosidase de *Penicillium funiculosum*. 149
Figura 5.43. Gráfico de Michaelis-Menten (A) e a linearização por duplo recíproco de Lineweaver-Burk (B) para enzima β-glucosidase de *P. funiculosum*. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação. 149
Figura 5.44. Gráfico de Michaelis-Menten (A) e a linearização por duplo recíproco de Lineweaver-Burk (B) para CMCase de *P. funiculosum*. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação. 150
Figura 5.45. Cinética de hidrólise enzimática de celulignina de bagaço de cana. Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70 % celulose). M25 (Multifect 25 FPU/g); M12,5 (Multifect 12,5 FPU/g); P25 (enzima de *P. funiculosum* 25 FPU/g); M12,5 P12,5 (Multifect 12,5 FPU/g + enzima de *P. funiculosum* 12,5 FPU/g). 151
Figura 5.46. Celobiose liberada durante 18 horas de hidrólise. Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70 % celulose). M25 (Multifect 25 FPU/g); M12,5 (Multifect 12,5 FPU/g); P25 (enzima de *Penicillium funiculosum* 25 FPU/g); M12,5P12,5 (Multifect 12,5 FPU/g+ enzima de *P. funiculosum* 12,5 FPU/g). 155

Figura 5.47. Cinética da hidrólise enzimática de celulignina de bagaço de cana pré-tratada com diferentes graus de deslignificação (NaOH em diferentes concentrações) e ausência e presença de BSA. Enzima utilizada: M12,5P12,5 (Multifect 12,5 FPU/g+ enzima de *P. funiculosum* 12,5 FPU/g). Concentração de sólidos, 25 g/L; carga enzimática, 18,5 FPU/g. 157
Figura 5.48. Produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* JP1 por processo em batelada alimentada. So = 20 g/L, temperatura = 37 °C, DO2 = 60%. 158
Figura 5.49. Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado de celulignina de bagaço de cana, em fermentômetro. 159
Figura 5.50. Cinética de produção de etanol por processo SSF utilizando celulases de *P. funiculosum* (Preparado Celulásico LADEBIO/BR) em batelada alimentada. As setas indicam os tempos nos quais o sistema foi alimentado com celulignina parcialmente deslignificada. (a) alimentação com 50 g; (b) alimentação com 25 g; e, (c) alimentação com 25 g de celulignina. A faixa em cinza indica a fase de pré-hidrólise enzimática (HE) de 12 h. A linha pontilhada em roxo indica o tempo de 106 h quando se atingiu a maior produção de etanol. 161

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Códigos e respectivas enzimas de acordo com *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 8
Tabela 2.2. Famílias das hidrolases com atividades celulolíticas. 9
Tabela 2.3. Grupos das famílias glicosil hidrolases. 11
Tabela 2.4. Sinergismo entre pares de exo e endoglucanases na hidrólise de fibra de algodão. 18
Tabela 2.5. Substratos contendo ligações β-1,4-glucosídicas e enzimas detectadas. 19
Tabela 2.6. Sumário de valores típicos de celulose para índice de cristalinidade (IC), fração das ligações β-glicosídicas acessível às celulases (Fa), número médio de grau de polimerização (DPN), fração de terminais redutores (FRE), e razão FRE/Fa. 22
Tabela 2.7. Meios de cultura líquidos para produção de celulases. 23
Tabela 2.8. Produção de celulases por diversos microrganismos. 25
Tabela 2.9. Nutrientes requeridos para produção de celulases na planta industrial proposta por Wooley et al. (1999). 36
Tabela 2.10. Efeito de diferentes tecnologias na estrutura de lignocelulósicos. 55
Tabela 2.11. Sumário de experimentos com SSF encontrados na literatura. 61
Tabela 4.1. Composição percentual da fonte de carbono utilizada para produção de enzimas celulolíticas por *P. funiculosum*. Grupo 1, com celulose microcristalina e Grupo 2 com celulose de celulignina. 70
Tabela 4.2. Níveis do Planejamento 1 (fatorial 2^4) para cada fonte de nitrogênio. 72
Tabela 4.3. Matriz do Planejamento 1 (fatorial 2^4) para fontes de nitrogênio. 72
Tabela 4.4. Níveis do Planejamento experimental 2 (fatorial 2^3) para cada fonte de nitrogênio. 73
Tabela 4.5. Matriz do Planejamento 2 (fatorial 2^3) para fontes de nitrogênio. 73
Tabela 4.6. Níveis do Planejamento experimental 3 (DCCR) para cada fonte de nitrogênio. 73
Tabela 4.7. Matriz do Planejamento 3 (DCCR) para fontes de nitrogênio. 74
Tabela 4.8. Quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada para precipitação de proteínas. 81
Tabela 5.1. Composição do bagaço de cana e celulignina. 96
Tabela 5.2. Composição de bagaço e celulignina reportados na literatura. 96
Tabela 5.3. Resultados do planejamento fatorial 2^4 para otimização da fonte de nitrogênio. 102

Tabela 5.4. Variáveis de resposta do segundo planejamento (Fatorial 2^3) para otimização da fonte de nitrogênio. 106
Tabela 5.5. Tabela da ANOVA para atividade FPásica. Planejamento fatorial 2^3. R^2=0,95759. 106
Tabela 5.6. Tabela da ANOVA para atividade CMCásica. Planejamento fatorial 2^3. R^2=0,95104. 108
Tabela 5.7. Tabela da ANOVA para atividade β-glucosidásica. R^2=0,99549. Planejamento fatorial 2^3. 109
Tabela 5.8. Resultados do terceiro planejamento (DCCR) para otimização da fonte de nitrogênio. 111
Tabela 5.9. Tabela da ANOVA para atividade FPásica. Delineamento composto central rotacional (DCCR). 112
Tabela 5.10. Tabela da ANOVA para atividade CMCásica. Delineamento composto central rotacional (DCCR). 112
Tabela 5.11. Tabela da ANOVA para atividade β-glucosidásica. Delineamento composto central rotacional (DCCR). 113
Tabela 5.12. Valores preditos das atividades celulásicas conforme a função *Desirability*. 119
Tabela 5.13. Produtividade volumétrica (QP) de celulases em biorreator inoculado com 5 % v/v e 10 % v/v de pré-inóculo. 126
Tabela 5.14. Atividades celulásicas produzida por grama de celulose inicial (U/g). 126
Tabela 5.15. Atividades celulásicas do extrato bruto sem células e do concentrado em rotaevaporador a vácuo. 130
Tabela 5.16. Atividades celulásicas nas diferentes etapas da concentração em membranas de fibras ocas em dois diferentes cut-off. 131
Tabela 5.17. Atividades celulásicas após precipitação com sulfato de amônio. 135
Tabela 5.18. Massa molecular das enzimas purificadas de *P. funiculosum*. 141
Tabela 5.19. Massas moleculares de celulases de diversas fontes. 142
Tabela 5.20. Atividades (U/mL) das enzimas CBH, β-glucosidase e da proteína 7 purificadas. 143
Tabela 5.21. Rendimento de hidrólise de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada por celulases de *Penicilium funiculosum* (P) e enzima comercial Multifect (M). Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70% celulose). 152
Tabela 5.22. Rendimento de hidrólise de celulose de diversas fontes. 153

Tabela 5.23. Quadro de análise de variância do experimento, ao final de 18 h de hidrólise. 153
Tabela 5.24. Teste de Tukey para hidrólise enzimática ao final de 18 h. 154
Tabela 5.25. Atividades relativas do preparado celulásico LADEBIO/BR a 37 e 50°C. 158
Tabela 5.26. Condições empregadas no SSF para produção de etanol encontradas na literatura (HE: Hidrólise Enzimática). 163

LISTA ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosina trifosfato

BPC: bioprocesso consolidado

BSA: albumina de soro bovino

cAMP: adenosina monofosfato cíclica

CAZy: Carbohydrate-Active Enzymes Data Base

CBH I: celobiohidrolase I

CBH II: celobiohidrolase II

CBM: módulo de ligação ao carboidrato

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CLBC: celulignina de bagaço de cana

CLBPD: celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada

CMC: carboximetil celulose

CMC: carboxmetilcelulose

CMCase: carboxmetilcelulase

CTBE: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

CV: volume de coluna

D: valor *Desirability*

DCCR: delineamento composto central rotacional

DNS: ácido dinitro-salicílico

DO_2: oxigênio dissolvido

DOE: Departamento de Energia dos EUA

DP: grau de polimerização

DPN: número médio de grau de polimerização

DTT: ditiotreitol

EC: Enzyme Commission

EG: endoglucanase

EG I: endoglucanase I

EG II: endoglucanase II

ER: retículo endoplamático

ExB: extrato enzimático bruto

F: valor F de Fisher

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FBT: *flat blade turbine*

FEM: Fórum Econômico Mundial

FES: fermentação no estado sólido

FMN: flavina mononucleotídeo

FOB: Free On Board (Preço sem Frete Incluso)

FPase: enzima com atividade em papel filtro

FPLC: Fast Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de rápida performance)

FPU: unidade de enzima com atividade em papel filtro

FS: fermentação submersa

G.L.: graus de liberdade

GOD: glicose oxidase

HE: hidrólise enzimática

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

HSF: Hidrólise Separada da Fermentação

IAA: iodoacetamida

IC: índice de cristalinidade

IFSC: Instituto de Física de São Carlos

kDa: kiloDalton

K_M: constante de Michaelis

LADEBIO: Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos

LC/MS/MS: cromatografia líquida acoplada a dois espectrômetros de massa

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Sincroton

M12,5: preparado comercial Multifect, 12,5 FPU/g

M12,5 P12,5 (Multifect 12,5 FPU/g + P. funiculosum 12,5 FPU/g)

M25: preparado comercial Multifect, 25 FPU/g

MDIC: Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior

MM: massa molecular

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NC-IUBMB: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology

NREL: National Renewable Energy Laboratory

OTR: taxa de transferência de oxigênio

P25: preparado celulásico de *Penicillium funiculosum*, 25 FPU/g

PDA: potato dextrose agar

PEG: polietileno glicol

PVAs: álcoois polivinílicos

Q.M.: quadrado médio

Q_P: Produtividade volumétrica

S.Q.: soma do quadrado

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio

SSCF: simultaneous saccharification and co-fermentation (sacarificação e co-fermentação simultânea)

SSF: simultaneous saccharification and fermentation (sacarificação e fermentação simultânea)

SSF: sacarificação e fermentação simultânea

UI: unidades internacionais

UPR: *unfolded protein response*

UV: ultra violeta

V: velocidade

Vi: velocidade inicial de reação

V_{MAX}: velocidade máxima

YED: yeast extract dextrose

$Y_{P/S}$: rendimento de produto em relação ao substrato

PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium funiculosum* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Roberto Nobuyuki Maeda

Orientadores: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* e Igor Polikarpov, *PhD*

O presente estudo objetivou desenvolver um bioprocesso para produção de celulases empregando uma linhagem previamente selecionada de *Penicillium funiculosum* por fermentação submersa, utilizando bagaço de cana pré-tratado como substrato e avaliar sua utilização em processos de hidrólise enzimática simultânea à fermentação (HESF) para produção de etanol de segunda geração. O trabalho foi estruturado nas seguintes etapas: caracterização do bagaço de cana e da celulignina gerada; otimização do meio de cultura para produção de celulases, por meio de planejamentos experimentais seqüenciais; produção de celulases em biorreator instrumentado de bancada, avaliando-se o tipo e tamanho de inóculo. No que concerne à elaboração de um produto enzimático, avaliou-se diferentes métodos de concentração (rotaevaporador à vácuo e ultrafiltração tangencial em membrana); a estabilidade térmica do produto concentrado; purificação e caracterização por meio de técnicas cromatográficas (troca iônica e eletroforese em condições nativas e desnaturantes) e identificação por LC/MS/MS. Após a etapa de planejamento experimental, a condição da fonte de nitrogênio apontada como ótima para produção de celulases foi de 0,97 g/L de uréia e 0,36 g/L de extrato de levedura. Os valores máximos de atividades enzimáticas alcançados nesta etapa de otimização foram de: FPase, 260 UI/L; CMCase, 7100 UI/L e β-glucosidase, 1500 UI/L. A produção de celulases em biorreator inoculado com 10% v/v de pré-inóculo foi superior em relação ao inoculado com 5% v/v, com aumento de 88% para atividades FPásica, 84% Avicelásica, 42% CMCásica e 4% de atividade β-glucosidásica. Além do aumento de produção de enzimas, com inóculo de 10 % v/v, constatou-se que a produção de celulases ocorreu em menor tempo, que foi reduzido de 72 para 60 h. O processo de ultrafiltração tangencial em membranas de fibras ocas com corte de 5 kDa foi definido como o ideal e adotado para a obtenção do preparado celulásico LADEBIO/BR. O preparado celulásico exibiu boa estabilidade durante aproximadamente 460 h a 37 e 50°C e sua aplicação no processo SSF de bagaço de cana pré-tratado resultou em uma concentração de etanol de 100 g/L em 144h, sendo a maior encontrada em estudos nesta temática. As elevadas concentrações de etanol atingidas no presente estudo, além da boa atuação do preparado celulásico sobre celulignina de bagaço de cana sinalizam para a utilização do preparado celulásico LADEBIO/BR na produção de etanol de segunda geração em maior escala.

CELLULASE PRODUCTION BY *Penicillium funiculosum* IN SUBMERGED FERMENTATION USING PRETREATED SUGARCANE BAGASSE AND ITS APPLICATION ON SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION

Abstract of the PhD Thesis presented to the Graduate Program on Technology of Chemical and Biochemical Processes of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

Roberto Nobuyuki Maeda

Advisors: Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* and Prof. Igor Polikarpov, *PhD*

The present work aimed at the development of a bioprocess to produce cellulase from a selected strain of *Penicillium funiculosum* by submerged fermentation, using pretreated sugarcane bagasse as substrate, as well as the evaluation of the enzymatic preparation in the simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) for the production of second-generation ethanol. The work is structured into the following steps: sugar cane bagasse and its cellulignin characterization; culture medium optimization for cellulase production using sequential experimental design; cellulase production in an instrumented bench-scale bioreactor, evaluating inoculum type and size. Concerning the preparation of an enzymatic product, different methods for concentrating the free-cell spent medium were evaluated (vacuum rotaevaporation and membrane tangential ultrafiltration). The concentrated enzymatic preparation was characterized in terms of thermal stability; molecular weight, and activity. The elaborated product was purified using chromatographic techniques (ionic exchange and electrophoreses), and identified by HPLC/MS/MS. After experimental planning design, the nitrogen condition pointed out as optimum for cellulase production was: 0.97 g/L urea and 0.36 g/L yeast extract. The maximum values for enzymatic activities reached in the optimization step were as follows: FPase, 260 UI/L; CMCase, 7100 UI/L and β-glucosidase, 1500 UI/L. The cellulase production in bioreactor inoculated with 10% v/v was superior to 5%v/v, with an increase of 88% for FPase, 84% for Avicelase, 42% for CMCase and 4% for β-glucosidase. Besides the increase in the enzyme production with 10%v/v inoculum, the production of cellulase was carried out in a lesser time, which was diminished from 72h to 60h. The membrane tangential hollow fibers ultrafiltration process with 5 kDa molecular weight cut off was defined as an ideal method and adopted for obtaining the LADEBIO/BR cellulase blend. This enzymatic preparation displayed a good stability for roughly 460 hours at 37°C and 50°C, and its application in the SSF process of pretreated sugarcane resulted in an ethanol concentration of 100g/L in 144h fermentation, being the highest found in literature related to this theme. The high ethanol concentrations reached in the current study, besides the good performance of the cellulase blend on sugarcane cellulignin, point out for the use of the LADEBIO/BR enzymatic product for second-generation ethanol production in wider scale.

Capítulo 1

APRESENTAÇÃO DO TEMA DA TESE

O crescimento populacional tem ocasionado um aumento da demanda energética que é suprida principalmente por fontes não renováveis, especialmente petróleo. Outro aspecto que tem trazido preocupações à sociedade moderna relaciona-se às questões ambientais. A queima de combustíveis fósseis e o desmatamento florestal fazem com que grande quantidade de gases permaneça na atmosfera, especialmente o CO_2. A crescente emissão deste gás e de outros como metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O), hidrofluorcarbonos (HFC), perfluorcarbonos (PFC) e hexafluor sulfúrico (SF6) na atmosfera, tem causado sérios problemas ambientais, decorrentes do efeito estufa. Para minimizar este problema, em 1997, foi estabelecido um acordo para redução das emissões gasosas, denominado de protocolo de Kyoto. Com este tratado, medidas para redução desses gases foram criadas, dentre elas a utilização de biomassas como fonte de energia alternativa ao petróleo (PEREIRA JR. *et al*. 2008).

Neste contexto, têm-se intensificado Pesquisa e Desenvolvimento para a utilização, de forma mais diversificada, de matérias-primas renováveis, em substituição às fontes fósseis, em particular os abundantes resíduos agrícolas e agro-industriais, denominados de biomassas residuais. A utilização destes resíduos é de grande interesse e importância na medida em que não há demanda de aumento da extensão de áreas agricultáveis. O que se intenciona é transferi-los da posição de poluentes sólidos para matérias-primas valiosas visando à produção de combustíveis e de outras substâncias químicas. Os avanços nesta área sinalizam que, seguramente, o aproveitamento de matérias-primas renováveis, incluindo os seus resíduos, reverterá a dependência mundial por fontes fósseis.

O Brasil encontra-se em uma posição privilegiada para assumir a liderança na utilização integral de biomassas, já que é uma das maiores potências para produção de matérias-primas renováveis, pela grande disponibilidade de culturas agrícolas, com destaque para a cana-de-açúcar; pela intensa radiação solar; água em abundância; clima favorável e pioneirismo na produção de um biocombustível em larga escala, o etanol. O país ainda reúne todas as condições para ser um dos principais receptores de recursos provenientes de investimentos relacionados a créditos de carbono (PEREIRA JR. *et al*. 2008).

Estudos indicam uma demanda de etanol para 2013 no Brasil de 32 bilhões de litros (PEREIRA, 2006). No entanto, pode-se estimar que somente com a produção convencional de álcool a partir do caldo de cana (primeira geração), tal demanda não deverá ser suprida, ratificando a necessidade de produção de etanol de outras fontes. Ênfase tem sido dada ao uso de resíduos agrícolas e agroindustriais de composição lignocelulósica como matérias-primas para a produção de etanol de segunda geração.

Dentre os resíduos agroindustriais mais abundantes no Brasil, encontram-se o bagaço e a palha de cana. De acordo com MAPA (2010) estima-se uma produção de 600 milhões de toneladas de cana em 2010. Considerando-se que cada tonelada de cana gera em torno de 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (ambos em massa seca), estima-se uma geração de 84 milhões de toneladas de bagaço e 84 milhões de toneladas de palha. É um enorme potencial que não pode ser subestimado e que dita que estes resíduos necessitam ter um aproveitamento mais racional.

A conversão do componente celulósico dessas biomassas residuais a glicose, requer o uso de enzimas celulolíticas. Atualmente, está bem estabelecido que a eficiência de hidrólise de celulose deve-se a um sistema enzimático multicomponente, constituído de três principais grupos: endo-β-glucanases, exo-β-glucanasese e β-glucosidases. O mecanismo mais aceito de hidrólise enzimática da celulose envolve o efeito sinérgico entre esses três tipos de celulases (HENRISSAT, 1994; KNOWLES *et al*., 1987; LYND *et al*., 2002; TEERI, 1997; WOOD e GARICA-CAMPAYO, 1990; ZHANG e LYND, 2004). Quando atuam conjuntamente, as celulases apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais (LYND *et al*., 2002).

O conceito de "engenharia de produto"[1] pode ser aplicado em processos de produção de celulases, visando à obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas do complexo celulolítico, em particular EnG e BG. O formulado ideal pode ser obtido pelo co-cultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases (WEN *et al*. 1995) pela produção em separado das celulases e posterior mistura dos extratos, em proporções pré-otimizadas (KÁDÁR *et al*. 2004, SENDELIUS, 2005; XIAO *et al*. 2004; IMAI *et al*., 2004) ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (SRIVASTAVA *et al*., 1999).

Além destas estratégias, existem microrganismos que secretam sistemas enzimáticos com atividades balanceadas como no caso o fungo filamentoso *Penicillium funiculosum* (CASTRO, 2006; CARVALHO, 2007). Jorgensen e Olsson (2006) reportam que diversas espécies do gênero *Penicillium* têm previamente mostrado a habilidade de produzir sistemas enzimáticos completos e melhor relação entre as atividades FPásica e β-glucosidásica do que *Trichoderma reesei*, que é o microrganismo mais utilizado em escala industrial.

No caso da produção de etanol de segunda geração, os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos da UFRJ, vem aprimorando a estratégia do

[1] Engenharia do produto refere-se ao processo de projetar e de desenvolver um produto, seja na forma de uma substância química, um dispositivo, ou um sistema que resulte em um artigo para a venda, proveniente de um processo de fabricação. A Engenharia do produto envolve geralmente atividades que tratam das questões de custo, produtividade, qualidade, formulação, desempenho, confiabilidade e de características que atendam a uma demanda específica do usuário.
Fonte: Schmidt, L.C.; Zhang, G.; Herrmann, J.; Dieter, G.E. & Cunniff, P.F. (2002*). Product Engineering and Manufacturing*, 2nd Edition. College House Enterprises, LLC, TE, USA.

processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas, conhecido na literatura inglêsa como processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*), juntamente com a Petrobras. Entretanto, a sustentabilidade do processo é dependente de redução dos custos de produção do etanol, especialmente no que se refere ao hidróxido de sódio, utilizado no pré-tratamento alcalino e às enzimas para a hidrólise da celulose, conforme apontado por Schlitter (2006).

Uma alternativa para redução dos custos com as enzimas celulolíticas é a produção destas *in plant*, evitando assim a sua importação a altos preços. No presente estudo, será dado especial enfoque à produção, caracterização e uso desses biocatalisadores, produzidos por uma linhagem selecionada de *P. funiculosum*, em processo SSF para produção de etanol de segunda geração.

A presente tese de doutorado está estruturada da seguinte forma: inicia-se com o referencial teórico e o estado da arte da produção de enzimas e sua aplicação na hidrólise de celulose, bem como na produção de etanol de segunda geração. Em seguida, estão apresentados os objetivos propostos e as justificativas da importância do tema da tese. No capítulo 4 estão descritas de forma detalhada as metodologias experimentais e analíticas utilizadas para a execução do presente trabalho de pesquisa. Na seqüência, apresentam-se os resultados, que são discutidos à luz das constatações e suportados, quando procedente, com os resultados reportados na literatura. Finalmente, enunciam-se as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

O desenvolvimento desta tese de doutorado permitiu a publicação da produção científica e tecnológica relatada a seguir. A maioria foi decorrente do próprio trabalho de tese e outras foram resultantes do nosso envolvimento com trabalhos de pesquisa realizados no LADEBIO/UFRJ que estabeleciam interfaces com a produção de celulases e etanol de segunda geração.

Patentes

1. **MAEDA, R.N.**; PEREIRA JR., N.; SANTA ANNA, L.M.M.; CASTRO, A.M.; GOMES, A.C.; SILVEIRA, C.J.G. & MOYSES, D.N. Processo de produção de um preparado enzimático para hidrólise de celulose de resíduos lignicelulósicos e sua aplicação na produção de etanol. PI0805560-2 A2, data de depósito: 29.12.2008, data da publicação: 08/09/2010.

2. **MAEDA, R.N.**; PEREIRA JR., N.; SANTA ANNA, L.M.M.; CASTRO, A.M.; GOMES, A.C.; SILVEIRA, C.J.G.; MOYSES, D.N. & BANDEIRA, L.F.M. Process for production of an enzymatic preparation for hydrolysis of cellulose from lignocellulosic residues and application there off in the production of ethanol. International Application Published under the Patent Cooperation Treaty (PCT). International Publication Number: WO 2010/076552 A1. International Publication Date: 08/07/2010.

Artigos em periódicos

1. **MAEDA, R.N.**; SILVA, M.M.P.; SANTA ANNA, L.M.M. & PEREIRA JR., N. Nitrogen source optimization for cellulase production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental design methodology and the desirability function. *Appl Biochem Biotechnol*. 161:411–422, 2010.

2. COLUSSI, F.; TEXTOR, L.C.; SERPA, V.; **MAEDA, R.N.** & PEREIRA JR., N.; POLIKARPOV, I. Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the catalytic domain of the extracellular cellulase CBHI from *Trichoderma harzianum*. *Acta Crystallographica*. F66:1041-1044, 2010.

3. **MAEDA, R.N.**; SERPA, V.; ROCHA, V.A.L.; MESQUITA, R.A.A.; SANTA ANNA, L.M.M.; CASTRO, A.M.; PEREIRA JR., N. & POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*. No prelo. 2010.

4. BARCELOS, C.A.; **MAEDA, R.N**.; BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA JR. N. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. Biomass and Bioenergy. Submetido, 2010.

Trabalhos completos em eventos

1. ROCHA, V.A.L.; **MAEDA, R.N.**; SOARES L.F.; & PEREIRA JR. N. Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando celulases de *Trichoderma harzianum* visando a produção de etanol de segunda geração. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu-PR. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. CD-ROM, 2010.

2. **MAEDA, R.N.**; SILVA, M.M.P.; SERPA, V.I.; POLIKARPOV, I. & PEREIRA Jr., N. Produção de Celulases de *Penicillium funiculosum* por Fermentação Submersa. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009. v. 1. p. 1-6.

3. SERPA, V.I.; **MAEDA, R.N.**; COLUSSI, F.; ALVES, R.; VOLTATÓDIO, M.L.; PEREIRA JR., N. & POLIKARPOV, I. Produção e caracterização inicial do extrato celulolítico do fungo *Trichoderma harzianum* IOC 3844. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009. v.1. p. 1-7.

4. OLIVEIRA NETO, M.; SERPA, V.I.; **MAEDA, R.N.**; MESQUITA, R.A.; VOLTATÓDIO, M.L.; SANTOS, M.A.M.; PEREIRA JR., N. & POLIKARPOV, I. Estudos estruturais de CBH1 de *Trichoderma harzianum* utilizando SAXS. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009. v. 1. p. 1-7.

5. SILVA, N.L.C.; BASTOS, H.B.; BETANCUR, G.J.V.; **MAEDA, R.N.** & PEREIRA JR., N. Produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas residuais da indústria de celulose. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009. v. 1. p. 1-6.

6. SILVA, M.M.P.; ROCHA, V.A.L.; **MAEDA, R.N.** & PEREIRA JR., N. Avaliação da produção de celulases por *Trichoderma harzianum* em fermentação submersa. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal-RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009. v. 1. p. 1-6.

7. SILVA, N.L.C.; **MAEDA, R.N.** & PEREIRA JR., N. Otimização da hidrólise enzimática da biomassa residual da indústria de celulose. In: Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas - IX SHEB, 2009, Maringá-PR. Anais do Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas - IX SHEB, 2009. v. 1. p. 1-6.

8. BARCELOS, C.A.; **MAEDA, R.N.**; BETANCUR, G.J.V. & PEREIRA Jr., N. Otimização da hidrólise enzimática do amido de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático. In: Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas - IX SHEB, 2009, Maringá-PR. Anais do Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas - IX SHEB, 2009. v. 1. p. 1-6.

9. SILVA, M.M.P.; SILVA, I.D.M.; **MAEDA, R.N.**; SILVA, N.L.C. & PEREIRA Jr., N. Otimização da deslignificação do papelão para produção de etanol por processo SSF. In: IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2009, Maringá-PR. Anais do IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2009. v. 1. p. 1-6.

10. SILVA, M.M.P.; **MAEDA, R.N.**; SANTOS, D.S.; WALVERDE, E.M. & PEREIRA Jr., N. Screening de fatores de maior influência na produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação no estado sólido. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2008, Recife. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. CD-ROM, 2008.

Prêmio

1. Inventor 2009, PETROBRAS.

2. Mensão Honrosa - IX SHEB - Universidade Estadual de Maringá. 2009.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Celulases

Na natureza, a conversão enzimática da celulose em glicose por microrganismos é um desafio que exige a produção de um complexo sistema enzimático composto por celulases. Estas enzimas que coletivamente apresentam especificidade para as ligações glicosídicas β-1,4 são necessárias para a solubilização completa da celulose, existindo sinergismo na sua forma de atuar.

Embora, de forma geral, os níveis deste complexo enzimático, secretado pelos fungos, atendam na natureza as necessidades de decomposição da matéria lignocelulósica e disponibilização de açúcares para o seu metabolismo, o uso industrial das celulases requer a obtenção de preparações enzimáticas com altos níveis de atividade e estabilidade, sendo necessário modificarem linhagens de fungos naturalmente ocorrentes em hiper-secretores, empregando-se técnicas da genética clássica ou da biologia molecular. Trabalhos nesta direção têm sido desenvolvidos por diferentes laboratórios nacionais e internacionais.

2.1.1. Classificação e nomenclatura das celulases

As celulases pertencem ao grupo das hidrolases O-glicosídeos (EC 3.2.1), que é um grupo comum de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre carboidrato e um composto não carboidrato. Na Tabela 2.1 estão apresentados os códigos das celulases de acordo com a *Enzyme Comission* (E.C.), seus nomes oficiais, alternativos e especificidade da reação (NC-IUBMB, 2008).

Tabela 2.1. Códigos e respectivas enzimas de acordo com *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*.

Código E.C	Nome oficial	Nomes alternativos	Reação catalisada
3.2.1.4	Celulase	Beta-1,4-endoglucan hidrolase; Beta-1,4-glucanase; Carboximetil celulase; Celodextrinase; Endo-1,4-β-D-glucanase; Endo-1,4-β-D-glucanohidrolase; Endo-1,4-β-glucanase; Endoglucanase.	Endohidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose e beta-glucanas.
3.2.1.21	β-glucosidase	Amigdalase; β-D-glucoside glucohidrolase; Celobiase; Gentobiase.	Hidrólise do terminal, β-1-4-D-glicosídeo com liberação de glicose
3.2.1.74	Glucan 1,4-β-glucosidase	1,4-β-D-glucan glucohidrolase; Exo-1,4-beta-D-glucosidase; Exo-1,4-beta-glucanase; Exo-1,4-beta-glucosidase.	Hidrólise de ligações 1-4 em β-D-glicanas com remoção sucessiva de unidades de glicose.
3.2.1.91	Celulose 1,4-β-celobiosidase.	1,4-β-celobiohidrolase; 1,4-β-D-glucan celobiohidrolase; Avicelase; Exo-1,4-β-D-glucanase; Exocelobiohidrolase; Exoglucanase.	Hidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas em celulose e celotetraose, liberando celobiose

Fonte: NC-IUBMB (2008)

A nomenclatura de enzimas do *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) é baseada na especificidade do substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. Esta classificação não reflete no caráter estrutural das enzimas em geral. A classificação de glicosil hidrolases em famílias, baseado na similaridade da sequência de aminoácidos foi proposta por Henrissat (1991). Por apresentar relação direta entre a similaridade da sequência e o enovelamento, esta classificação reflete a característica estrutural

destas enzimas; auxilia a revelar a relação evolutiva entre as enzimas; e fornece informações importantes a respeito do mecanismo de ação das hidrolases (CAZy, 2008). Na Tabela 2.2, estão apresentadas as famílias das glicosil hidrolases que contêm enzimas celulolíticas. Os mecanismos de ação citados estão melhor detalhados no item mecanismos de hidrólise (2.1.2).

Tabela 2.2. Famílias das hidrolases com atividades celulolíticas.

Família	Atividades conhecidas	Mecanismo	Resíduo catalítico	
			Nucleófilo/ básico	doador de prótons
1	β-glucosidase (EC 3.2.1.21	Retenção	Glu	Glu
3	β-glucosidase (EC 3.2.1.21); glucan 1,4-β-glucosidase (EC 3.2.1.74)	Retenção	Asp	Glu
5	Celulase (EC 3.2.1.4); celulose 1,4-β-celobiosidase (EC 3.2.1.91)	Retenção	Glu	Glu
6	Endoglucanase (EC 3.2.1.4); celobiohidrolase (EC 3.2.1.91)	Inversão	Asp	Asp
7	Endoglucanase (EC 3.2.1.4); [ação na extremidade redutora] celobiohidrolase (EC 3.2.1.-)	Retenção	Glu	Glu
8	Celulase (EC 3.2.1.4)	Inversão	Asp	Glu
9	Endoglucanase (EC 3.2.1.4); celobiohidrolase (EC 3.2.1.91); β-glucosidase (EC 3.2.1.21)	Inversão	Asp	Glu
11	Endoglucanase (EC 3.2.1.4);	Retenção	Glu	Glu
44	Endoglucanase (EC 3.2.1.4);	Retenção	Glu	Glu
45	endoglucanase (EC 3.2.1.4)	Inversão	Asp	Asp
48	Endoglucanase (EC 3.2.1.4); celobiohidrolases (EC 3.2.1.-); endo-cellulases (EC 3.2.1.-)	Inversão	Desconhecido	Glu
51	Endoglucanase (EC 3.2.1.4)	Retenção	Glu	Glu
61	Endoglucanase (EC 3.2.1.4)	Desconhcido	Desconhecido	Desconhecido
74	Endoglucanase (EC 3.2.1.4)	Inversão	Asp	Asp

Asp: asparagina; Glu: glutamina. Fonte: Coutinho e Henrissat (1999).

Henrissat (1991) comparou as seqüências de aminoácidos de 301 glicosil hidrolases. Num total de 291 seqüências, codificadas pela Comissão de Enzimas (EC), 35 famílias puderam ser classificadas. Somente dez seqüências (menos de 5%) não puderam ser classificadas em nenhuma das famílias. Com as seqüências disponíveis, 18 famílias foram verificadas sendo monoespecíficas (contendo somente um número EC) e 17 foram observadas sendo poliespecíficas (contendo no mínimo dois códigos EC).

A unidade básica da classificação é a família, onde todas as enzimas de uma família apresentam alta similaridade entre suas sequências de aminoácidos. Atualmente, são conhecidas 113 famílias de enzimas glicosil hidrolases (HENRISSAT e BAIROCH, 1993; HENRISSAT e BAIROCH, 1996; BOURNE e HENRISSAT, 2001), dentre as quais 15 correspondem a famílias de celulases. Com o aumento do conhecimento da estrutura terciária das proteínas, uma unidade maior foi definida, os grupos. Um grupo contém duas ou mais famílias que têm o mesmo tipo de enovelamento do seu domínio catalítico. A similaridade da seqüência entre uma família e outra dentro de um grupo pode, contudo, ser muito limitada. Isto reflete o princípio geral de que a estrutura protéica é melhor preservada pela evolução do que a seqüência de aminoácidos. Atualmente, 14 grupos (GH-A a GH-N) são definidos para glicosil hidrolases, conforme se observa na Tabela 2.3 (MACGREGOR, 2005; CAZy, 2008).

O enovelamento do tipo *Jelly roll barrel* é uma estrutura complexa consistindo de quatro pares de folha pregueada antiparalela na forma tridimensional de barril (Figura 2.1A). A β-hélice é um tipo de arquitetura formada totalmente por configuração beta (β), caracterizada por 4 a 8 folhas pregueadas em forma de lâmina, arranjadas como uma volta em torno de um eixo central. Cada folha tipicamente tem quatro configurações β antiparalela, então, a primeira e a quarta folha são quase sempre perpendiculares uma a outra. O sítio ativo da enzima é freqüentemente encontrado na fissura formada no centro da hélice (Figura 2.1B). O enovelamento do tipo $(\beta/\alpha)_8$ ou TIM *barrel* consiste de oito extensões de folha pregueada e oito de α-hélice que alternam na cadeia polipetídica (Figura 2.1C). O enovelamento $\alpha+\beta$ é uma classe de domínio estrutural na qual a estrutura secundária é composta de α-hélice e folha pregueada (Figura 2.1D). Há também o enovelamento todo com configuração em β-hélice (Figura 2.1E).

Tabela 2.3. Grupos das famílias glicosil hidrolases.

Grupos	Tipo de Enovelamento	Famílias					
		1	2	5	10	17	26
GH-A	$(\beta/\alpha)_8$	30	35	39	42	50	51
		53	59	72	79	86	113
GH-B	β-*jelly roll*	7	16				
GH-C	β-*jelly roll*	11	12				
GH-D	$(\beta/\alpha)_8$	27	31	36			
GH-E	6-enovelamento β-hélice	33	34	83			
GH-F	5- enovelamento β-hélice	43	62				
GH-G	$(\alpha/\alpha)_6$	37	63				
GH-H	$(\beta/\alpha)_8$	13	70	77			
GH-I	α+β	24	46	80			
GH-J	5- enovelamento β-hélice	32	68				
GH-K	$(\beta/\alpha)_8$	18	20	85			
GH-L	$(\alpha/\alpha)_6$	15	65				
GH-M	$(\alpha/\alpha)_6$	8	48				
GH-N	β-hélice	28	49				

Fonte: MacGregor (2005); CAZy (2008)

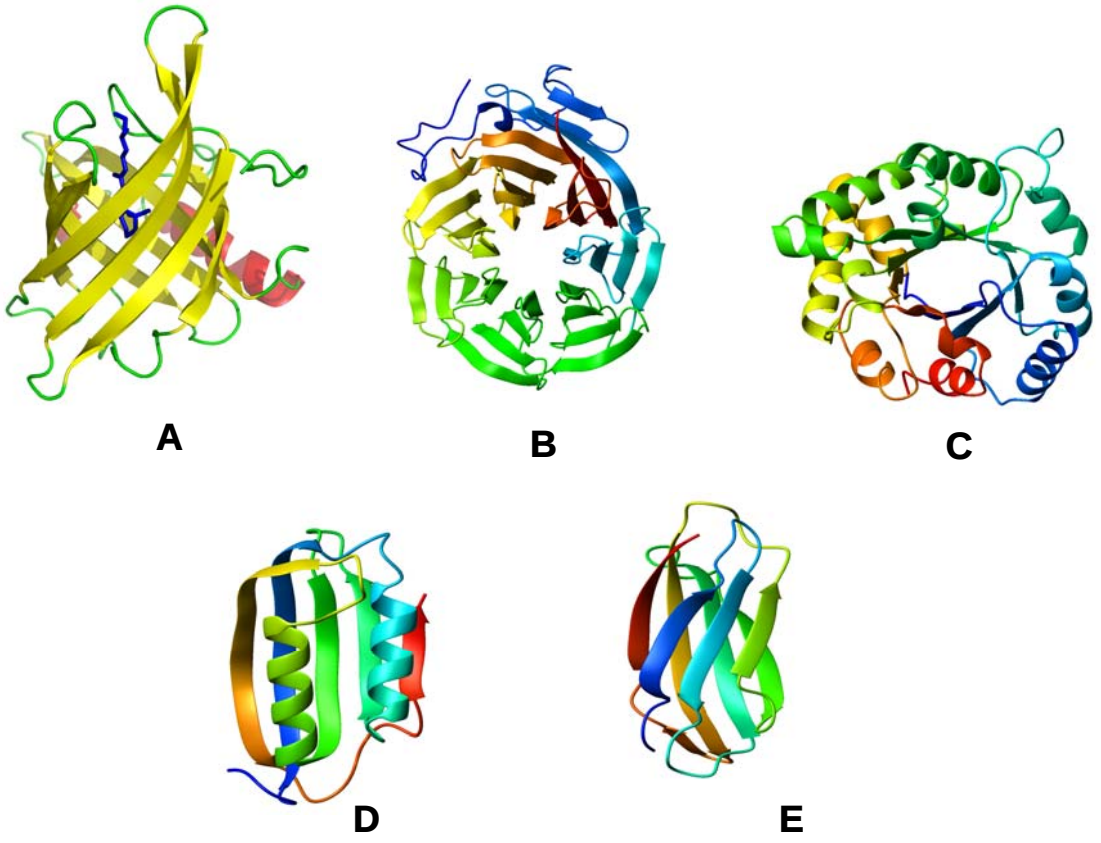


Figura 2.1. Configuração dos enovelamentos característicos dos grupos de glicosil hidrolases. Configuração jelly roll barrel (A); β-hélice (B); (β/α)8 ou TIM barrel (C); configuração α+β (D); enovelamento somente β-hélice (E). Fonte: MacGregor (2005); CAZy (2008)

2.1.2. Mecanismos de hidrólise

Atualmente, está bem estabelecido que a atividade celulolítica deve-se a um sistema enzimático multicomponente que consiste de três grupos principais: endo-β-glucanase, exo-β-glucanase e β-glucosidase. O mecanismo mais aceito de hidrólise enzimática da celulose envolve o efeito sinérgico entre as três formas de celulase (HENRISSAT, 1994; KNOWLES *et al*. 1987; LYND *et al*. 2002; TEERI 1997; WOOD e GARICA-CAMPAYO 1990; ZHANG e LYND 2004).

As endoglucanases, ou 1,4-β-D-glucana-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4) são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise. Tais enzimas hidrolisam randomicamente regiões internas de estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não-redutor (BEGUIN e AUBERT, 1993; MIYAMOTO, 1997).

O grupo das exoglucanases age nos terminais da cadeia de celulose, produzindo celobiose como principal produto. Este grupo é constituído, majoritariamente, pelas enzimas 1,4-β-D-glucana-glucanohidrolases (EC 3.2.1.74), também conhecidas como celodextrinases e 1,4-β-D-glucana-celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), mais comumente conhecidas como celobiohidrolases. Dentre os dois tipos, o mais reportado na literatura é o das celobiohidrolases (CBH).

As celobiohidrolases são distinguidas em dois tipos: as enzimas do tipo I (CBH I) as quais hidrolisam terminais redutores, e as do tipo II (CBH II) que hidrolisam terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (AWAFO *et al*., 1996). A estrutura das celobiohidrolases apresenta uma região na forma de “gancho”, cuja função é captar a fibra celulósica, facilitando seu acesso ao sítio catalítico (AWAFO *et al*., 1996). Na Figura 2.2, pode-se observar um esquema de uma celobiohidrolase (CBH I), e no detalhe a estrutura molecular da enzima. À esquerda, o módulo de ligação ao substrato em azul; as ligações glicosiladas em verde; e, o sítio catalítico em amarelo e alaranjado.

Adicionalmente, é reportado que as CBH I possuem dez subsítios ativos no domínio catalítico, cuja função é de se ligarem fisicamente à celulose e iniciar as reações químicas que hidrolisam as cadeias formando a celobiose (NREL, 2005).

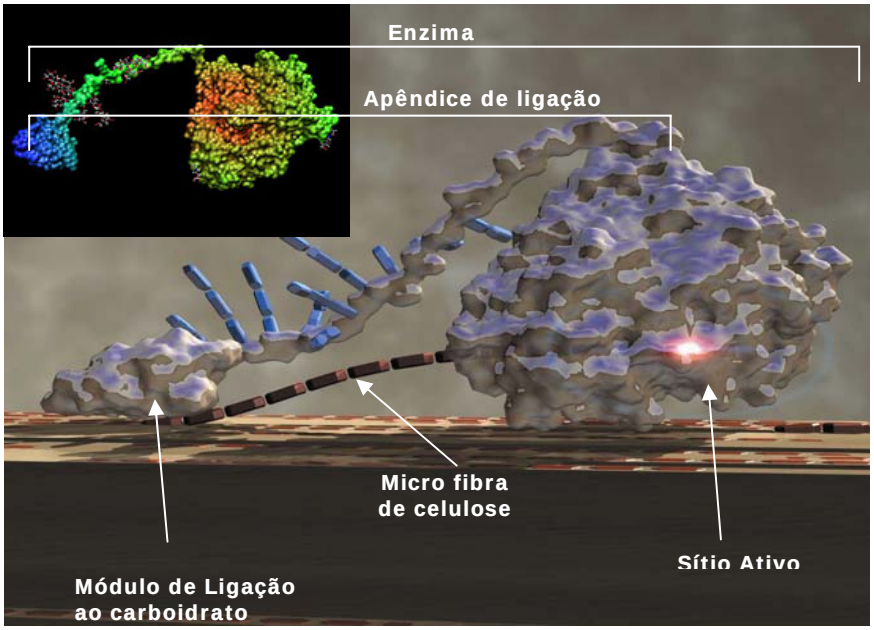


Figura 2.2. Representação esquemática de uma exoglucanase (CBH I) atuando sobre uma fibrila de celulose. Fonte: adaptado de Himmel *et al*. (2000).

O terceiro e último grande grupo das enzimas do complexo celulolítico engloba as enzimas β-glucosidases, ou β-glicosídeo glucohidrolases (EC 3.2.1.21). As β-glucosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) à glicose. Assim como as celobiohidrolases, também são reportadas sofrerem inibição pelo seu produto de hidrólise (AWAFO *et al*., 1996).

De acordo com Riou *et al*. (1998), as β-glucosidases podem ser divididas em três subgrupos baseados na especificidade pelo substrato: as celobiases, as quais hidrolisam apenas oligossacarideos; as *broad-specificity*-β-glucosidases, que exibem atividade tanto em dissacarídeos quanto oligossacarídeos (esta enzima é a β-glucosidase mais comumente encontrada); e as aril-β-glucosidases, que têm afinidade apenas por aril-β-glucosideos.

Quando atuam conjuntamente, as celulases apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras (LYND *et al*., 2002). Estes três processos hidrolíticos ocorrem simultaneamente (Figura 2.3).

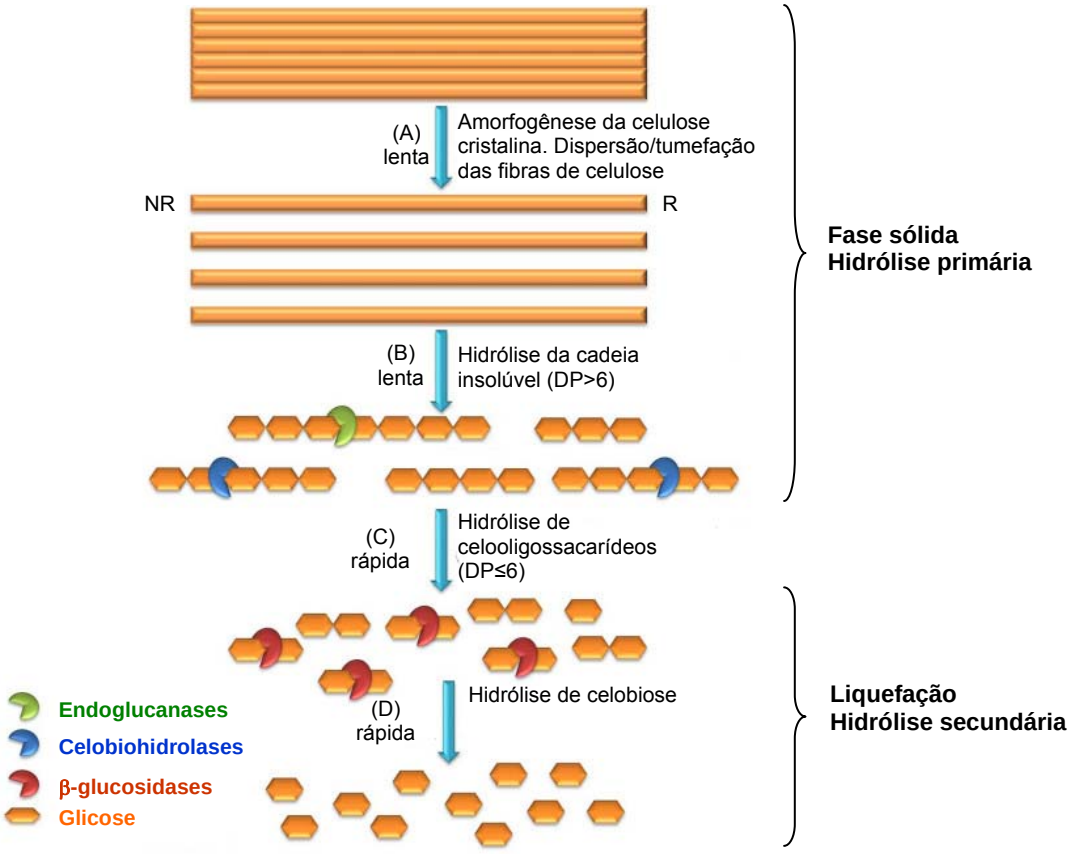


Figura 2.3. Esquema das etapas da hidrólise enzimática da celulose.
Fonte: Arantes e Saddler (2010). NR: terminal não redutor. R: terminal redutor.

A hidrólise primária ocorre na superfície dos substratos sólidos liberando açúcares solúveis com grau de polimerização de 9, que se reduz a 6 na fase de liquefação pela hidrólise por endoglucanase e exoglucanase. A taxa de despolimerização enzimática realizada pelas endoglucanases e exoglucanases é o fator limitante para todo o processo de hidrólise (ZHANG *et al*., 2006). A hidrólise secundária, que ocorre na fase pós-liquefação, envolve primeiramente a hidrólise da celobiose à glicose pelas β-glucosidases, embora algumas β-glucosidases também hidrolisem celodextrinas longas (ZHANG e LYND, 2004; ARANTES e SADDLER, 2010).

A hidrólise por enzimas glicosil hidrolases é realizada basicamente por dois mecanismos: o de retenção e o de inversão. O mecanismo de retenção consiste de uma dupla substituição que leva à retenção da configuração do carbono anomérico do açúcar envolvido na catálise. Estas enzimas frequentemente mostram habilidades

de transglicosilação. A maquinaria catalítica destas enzimas envolve duas carboxilas localizadas em lados opostos do plano do açúcar e executam duas etapas químicas separadas. Na primeira, a glicosilação, o grupo carboxila promove uma reação ácido-catalisada simultaneamente ao ataque nucleofílico do outro grupamento carboxila, formando um intermediário glicosil-enzima. Na segunda etapa, da desglicosilação, o primeiro resíduo funciona como uma base ativando o novo agente nucleofílico, hidrolisando o intermediário glicosil-enzima, liberando assim o produto (Figura 2.4) (SINNOTT, 1990; McCARTER e WITHERS, 1994).

Já no mecanismo por inversão há uma substituição nucleofílica simples, ocasionando a mudança na configuração β-glicosídica para a forma α-glicosídica. O maquinário catalítico destas enzimas também envolve dois radicais carboxilas das cadeias laterais dos aminoácidos que promovem reações ácido-catalisadas e o ataque nucleofílico por uma molécula de água a partir do lado oposto da molécula cíclica de açúcar (Figura 2.5) (SINNOTT, 1990; McCARTER e WITHERS, 1994).

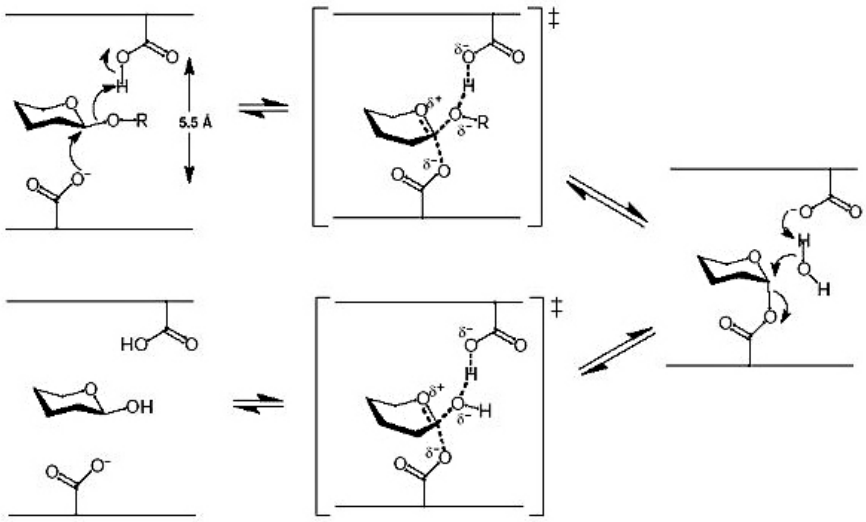


Figura 2.4. Mecanismo de ação das hidrolases do tipo retenção.
Fontes: Sinnott (1990); McCarter e Withers (1994).

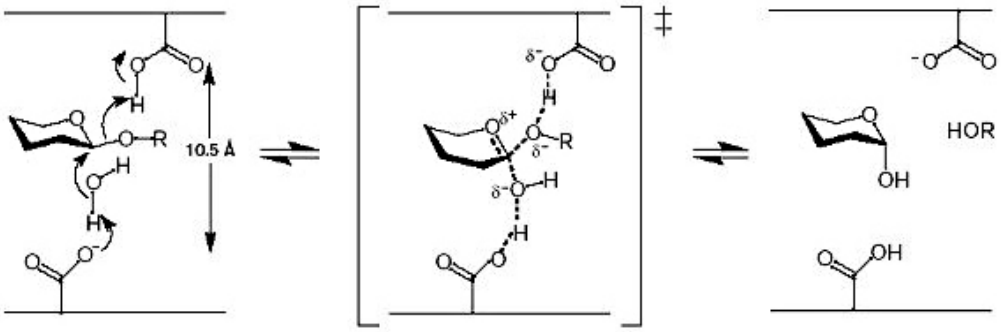


Figura 2.5. Mecanismo de ação das hidrolases do tipo inversão.
Fontes: Sinnott (1990); McCarter e Withers (1994).

A adsorção das celulases à celulose fornece mais que um contato físico entre enzima e substrato. O processo de adsorção, em muitos casos, tem um importante papel na eficiência da hidrólise enzimática. Usando complexos celulásicos, a taxa da hidrólise enzimática da celulose cristalina é frequentemente determinada por uma condição: quanto melhor a adsorção, melhor será a catálise (KLYOSOV, 1986, 1987).

O equilíbrio de adsorção é normalmente alcançado em um a três minutos (KLYOSOV *et al*., 1982). Foi observado que a capacidade de adsorção de endoglucanase em várias fontes de celulose cristalina varia significativamente, com uma variação acima de 1000 vezes. Acredita-se que na primeira etapa da degradação enzimática da microfibrila da celulose, ocorre uma estratificação ao longo do eixo, conduzindo à formação de subfibrilas ainda mais finas (CHANZY *et al*., 1983).

2.1.3. Ação sinérgica das celulases

O sinergismo em sistemas celulásicos foi descrito pela primeira vez por Mandels e Reese (1964). Até recentemente, dois tipos de sinergismo foram observados: (a) entre endoglucanase e celobiohidrolase e (b) entre celobiase e outras celulases (endo e exoglucanase) (KLYOSOV, 2010). O primeiro caso é descrito como a clivagem da cadeia polimérica da celulose por endoglucanases, criando extremidades redutoras, as quais servem como substrato para as exoglucanases. Isto explica o porquê da ação individual das duas ser significativamente menos eficiente do que a ação das duas em conjunto. O do

segundo tipo ocorre pela ação das β-glucosidases que convertem rapidamente a celobiose à glicose, eliminando a inibição por celobiose.

Embora aparentemente o sinergismo tenha sido explicado, os mecanismos moleculares que estão envolvidos continuam a ser tema de muita discussão. Em primeiro lugar, não se sabe por que a adição de celobiohidrolases reforça a ação de endoglucanases sobre substratos solúveis, particularmente a celulose cristalina. Também não se sabe por que entre todas as endoglucanases e celobiohidrolases, apenas um número limitado exibe sinergismo (KLYOSOV, 2010).

De acordo com Wood e McCrae (1986) e Gow e Wood (1988), o sinergismo entre endoglucanase de uma fonte microbiana e celobiohidrolase de outra, é raramente observada. Já Hoshino *et al*. (1997) estudaram a ação cooperativa de endo (En-1, Endo-2 e EG-1) e exoglunases (Ex-1, CBH I, CBH II e Exo-A) de diferentes fontes e observaram diferentes graus de sinergismo. Na Tabela 2.4 pode-se observar os diferentes graus de sinergismo entre exo e endoglunasases.

O sinergismo entre duas endoglucanases foi detectado por Rabinovich *et al*. (1986) e pode não ser explicado na estrutura da simples ação consecutiva de endo e exoenzimas. Esse tipo de sinergismo pode ser a chave para explicação do fenômeno do sinergismo em geral. No sinergismo endo-endo há enzimas que são adsorvidas fortemente ao substrato, enquanto outras são fracamente adsorvidas, apresentando diferença na constante de adsorção de até 10 vezes.

Quando a mistura de endoglucanases, que se adsorvem fortemente e fracamente, é empregada, o grau de conversão da celulose microcristalina melhora em 75%. Porém, a endoglucanase que se adsorve fracamente tem sua atividade perdida quando o grau de conversão atinge 30 a 40 %, mesmo quando mais enzima é adicionada à reação (KLYOSOV, 2010). Rabinovich *et al*. (1986) demonstraram que o local de ataque das endoglucanases fracamente adsorvidas é diferente do local de ataque das fortemente adsorvidas, e a adição de endoglucanase que se adsorve fracamente à celulose previamente hidrolisada com uma endoglucanase fortemente adsorvida, leva a um aumento significativo na velocidade da hidrólise, bem como no grau de conversão da celulose microcristalina. Além disso, os autores mostraram que a taxa de hidrólise pela combinação de ambos os tipos de endoglucanase é de 6 a 20 vezes maior que taxa de hidrólise utilizando somente a endoglucanase que se adsorve fortemente.

Assim, propõe-se que a eficiência da degradação da celulose cristalina é aumentada quando os sistemas enzimáticos contêm celulases tanto com alta como com baixa afinidade (adsorção) à celulose, exibindo então seu sinergismo. Os mecanismos moleculares da exo-endo e da endo-endoglucanase diferem no princípio. Aparentemente, enzimas fortemente adsorvidas, ligadas à celulose em locais onde a estrutura cristalina do substrato está desorganizada, induzem à dispersão (desfibrilação) da estrutura cristalina como resultado do efeito mecânico-químico. Estas enzimas fortemente adsorvidas podem penetrar nas regiões intercristalinas e abrir novos sítios para ação de enzimas que se adsorvem fracamente, as quais agem rapidamente somente nas regiões desordenadas (amorfas) da celulose, situada nas partes periféricas da estrutura cristalina. Isto explica o sinergismo não somente entre endoglucanases, mas também entre celobiohidrolases e suas combinações (KLYOSOV, 2010).

Tabela 2.4. Sinergismo entre pares de exo e endoglucanases na hidrólise de fibra de algodão.

Combinação de celulases	Açúcares redutores produzidos (mM)	Grau de sinergismo
Exo e Exo		
CBH II e Ex-I	1,60	2,3
CBH II e Exo-A	1,87	2,7
CBH II e CBH I	2,50	3,1
CBH I e Ex-1	1,18	1,3
CBH I e Exo-A	1,08	1,2
Exo-1 e Exo-A	0,95	1,2
Endo e Endo		
Endo-2 e En-1	0,49	1,3
Endo-2 e EG I	0,66	1,7
En-1 e EG I	0,36	1,4
Exo e endo		
CBH II e En-1	1,22	2,9
CBH II e EG-1	1,28	3,0
CBH II e Endo-2	1,71	3,1
CBH I e En-1	2,02	3,2
CBH I e EG-1	2,17	3,4
CBH I e Endo-2	2,60	3,4
Ex-1 e Endo-2	0,72	1,1
Ex-1 e En-1	0,84	1,6
Ex-1 e EG-1	0,85	1,6
Exo-A e Endo-2	0,78	1,2
Exo-A e En-1	0,73	1,4
Exo-A e EG-1	0,79	1,5

Fonte: Hoshino *et al*. (1997).

2.1.4. Substratos para enzimas celulolíticas

Os substratos para quantificação da atividade celulásica podem ser divididos em duas categorias, conforme o grau de polimerização, que os diferenciam quanto à solubilidade em água.

Substratos solúveis

Os substratos solúveis incluem celodextrinas de baixo grau de polimerização (DP), apresentando de 2 a 6 unidades de glicose, bem como celulose de alto grau de polimerização. Estes são usados para quantificar os componentes individuais de celulases. Na Tabela 2.5 podem ser observados os diferentes substratos utilizados para quantificação das diferentes atividades celulásicas (ZHANG *et al*., 2006).

Tabela 2.5. Substratos contendo ligações β-1,4-glucosídicas e enzimas detectadas.

Substratos	Enzima
Solúveis	
Cadeia curta (baixo DP)	
Celodextrinas	Endo, Exo, BG
Derivados de celodextrinas	
β-metilumbeliferil-oligossacarídeos	Endo, Exo, BG
p-nitrofenol-oligossacarídeos	Endo, Exo, BG
Derivados de celulose de cadeira longa	
Carboximetilcelulose (CMC), hidroxietilcelulose (HEC)	Endo
Dyed-CMC (*Remazol Brilliant Blue*-CMC)	Endo
Insolúveis	
Celulose cristalina	
Algodão, avicel, celulose de *Valonia*, celulose bacteriana	Total, Endo, Exo
Celulose amorfa	Total, Endo, Exo
Dyed-celulose	Endo
Celulose fluorescente	Total
Derivados cromogênicos	
Trinitrofenil-carboximetilcelulose (TNP-CMC)	Endo
Fluran-celulose	Endo, Total
Substratos celulósicos complexos	
α-celulose, biomassa lignocelulósicas pré-tratada	Total

Fonte: Zhang *et al*. (2006)

Celodextrinas são solúveis para DP ≤ 6, e pouco solúveis para DP entre 6 e 12 (MILLER, 1960; MILLER, 1963; PEREIRA *et al*., 1988; ZHANG e LYND, 2003, 2005). A solubilidade destes polímeros decresce drasticamente à medida que aumenta o grau de polimerização devido às ligações de hidrogênio e efeito entrópico do sistema.

Os substratos *p*-nitrofenil glicosídeo cromogênico e metil umbeliferil-D-glicosídeo fluorogênico, derivados de celodextrinas, são comumente usados no estudo cinético de celulases (TUOHY *et al*., 2002; WOLFGANG e WILSON, 1999), identificação de reações específicas (BHAT *et al*., 1990; CLAEYSSENS e AERTS, 1992; TOMME *et al*., 1996; VAN TILBEURGH e CLAEYSSENS, 1985; VAN TILBEURGH *et al*., 1982, 1985; ZVERLOV *et al*., 2002) e estudo termodinâmico dos sítios de ligação (BARR e HOLEWINSKI, 2002). Estes são usados também para determinar as constantes de inibição de celulases em presença de celobiose e glicose, pois os cromóforos liberados podem ser facilmente quantificados independentemente dos açúcares.

Polímeros de cadeia longa derivados de celulose podem ser solúveis devido a substituições químicas. A carboximetil celulose (CMC) é frequentemente usada na determinação da atividade de endoglucanase, chamada de CMCase, devido às endoglucanases clivarem ligações β-1,4-glicosídicas intramoleculares, randomicamente, resultando em uma drástica redução no grau de polimerização da CMC. A CMC tem dois importantes parâmetros físicos: o grau de substituição (DS) e o grau de polimerização. A solubilidade da CMC é estreitamente associada ao grau de substituição. A CMC é solúvel quando DS > 0,3 – 0,7 (KARLSSON *et al*., 2001; KLEMM *et al*., 1998a; WOOD e BHAT, 1988). CMC comercial normalmente apresenta DS < 1,5. É altamente recomendável que os ensaios de açúcares redutores, quando se utiliza CMC como substrato, sejam limitados aos primeiros 2 % de hidrólise do substrato, quando DS = 0,7 (WOOD e BHAT, 1988). Isto é importante, pois somente unidades de glicose não substituídas são acessíveis às celulases e a ação hidrolítica requer um mínimo de dois ou três resíduos não substituídos.

Substratos insolúveis

Substratos insolúveis para ensaios de atividade celulásica incluem fontes celulósicas praticamente puras (algodão, papel filtro Whatman No. 1, celulose bacteriana, celulose microcristalina e celulose amorfa) ou substratos impuros (celulose-remazol, α-celulose e lignocelulose pré-tratada). Celulose nativa se refere à celulose I e apresenta duas formas cristalinas, Iα, a qual é predominantemente bacteriana e de algas e do tipo Iβ, que é predominantemente encontrada em plantas superiores (ATALLA e VANDERHART, 1984). A celulose nativa (celulose I) pode ser convertida em outras formas cristalinas (II – IV) por vários tratamentos (KLEIN e SNODGRASS, 1993; KRASSIG, 1993; O'SULLIVAN, 1997).

Algodão, celulose bacteriana e celulose da alga *Valonia ventricosa* são exemplos de celulose de alto índice de cristalinidade (BOISSET *et al*., 1999; FIEROBE *et al*., 2002). Celulose microcristalina, papel filtro, α-celulose e substratos celulósicos pré-tratados têm modestos valores de índice de cristalinidade e podem ser considerados como uma combinação de fração cristalina e amorfa, porém não há uma separação clara entre as duas frações.

A fibra de algodão é obtida de algodão natural após remoção de impurezas como cera, pectina e material pigmentado (WOOD, 1988). Papel filtro Whatman No.1 é obtido a partir de fibras longas de polpa de algodão de baixo índice de cristalinidade (IC ≈ 45 %) (DONG *et al*., 1998; HENRISSAT *et al*., 1985). Celulose microcristalina, chamada também de hidrocelulose ou Avicel, pode ser obtida de diversas marcas comerciais. De acordo com ZHANG e LYND (2004) estes são bons substratos para ensaios de atividade exoglucanásica, por terem baixo DP e relativamente baixa acessibilidade, ou seja, alta relação FRE/Fa (Relação entre a fração de terminais redutores e a fração das ligações β-glicosídicas acessíveis às celulases). Na Tabela 2.6 estão apresentadas as propriedades físicas dos substratos celulósicos, como índice de cristalinidade (IC); grau de polimerização; acessibilidade das ligações β-glicosídicas pelas celulases, a qual é estimada pela capacidade máxima de absorção de celulases (ZHANG e LYND, 2004). Hoshino *et al*. (1997) avaliaram o efeito do índice de cristalinidade da celulose na sacarificação por celulases e verificaram que a atividade celulásica aumenta consideravelmente com o decréscimo da cristalinidade do substrato.

Tabela 2.6. Sumário de valores típicos de celulose para índice de cristalinidade (IC), fração das ligações β-glicosídicas acessível às celulases (Fa), número médio de grau de polimerização (DPN), fração de terminais redutores (FRE), e razão FRE/Fa. Fonte: Zhang e Lynd (2004).

Substratos	IC	F_a	DP_N	F_{RE} (%)		F_{RE}/F_a	
				Baixa	Alta	Baixa	Alta
Solúveis							
Celodextrinas e derivados	-	100	2-6	16,67	50	0,167	0,5
CMC	-	100	100-2000	0,05	1	0,0005	0,01
Insolúveis							
Algodão	0,8-0,95	0,2	1000-3000	0,033	0,1	0,167	0,5
Papel filtro Whatman No. 1	~0,45	1,8	750-2800	0,036	0,133	0,0198	0,0741
Celulose bacteriana	0,8-0,95	6	600-2000	0,05	0,167	0,00833	0,0278
Celulose microcristalina (Avicel)	0,5-0,6	0,6	150-500	0,2	0,667	0,333	1,11
Polpa (Solka Floc)	0,4-0,7	1,8	750-1500	0,067	0,133	0,0370	0,0741
Substrato celulósico pré-tratado	0,4-0,7	0,6	400-1000	0,1	0,25	0,167	0,417

O material lignocelulósico pré-tratado tem sua estrutura recalcitrante rompida. Dessa forma, as celulases podem hidrolisar o material lignocelulósico pré-tratado a uma taxa maior e mais eficientemente. Atualmente, a tecnologia de pré-tratamento de lignocelulósicos inclui tratamento com ácido diluído; água quente; amônia seguida de explosão das fibras; e, percolação com amônia (MOSIER *et al*., 2005; WYMAN *et al*., 2005a,b). Além destes, dois outros pré-tratamentos estão sendo amplamente estudados, a explosão com vapor e o processo *organosolv* (ARATO *et al*., 2005; BURA *et al*., 2002, 2003; GALBE e ZACCHI, 2002; OHGREN *et al*., 2005; PAN *et al*., 2005a,b; PYE e LORA, 1991; SASSNER *et al*., 2005 ; SODERSTROM *et al*., 2003; WINGREN *et al*., 2003).

O resíduo sólido de lignocelulósico após remoção da lignina é denominado de holocelulose, ou seja, é toda fração de carboidrato após deslignificação. Já a α-celulose é o resíduo sólido de holocelulose após remoção da hemicelulose por extração alcalina (GREEN, 1963). Após neutralização do extrato alcalino solúvel da holocelulose, a fração insolúvel e a solúvel são β-celulose e γ-celulose, respectivamente (CORBETT, 1963a; CORBETT, 1963b).

2.1.5. Produção de celulases

As celulases podem ser produzidas em meios quimicamente definidos, utilizando como fonte de carbono celulose cristalina, carboximetilcelulose ou celobiose (MANDELS e WEBER, 1969; JUHÁSZ *et al*., 2005a, JORGENSEN e OLSSON, 2006; ONSORI *et al*., 2005, CASTRO, 2006; CARVALHO, 2007), ou em meios complexos, utilizando resíduos agrícolas e agroindustriais os quais podem servir como suporte e/ou fonte de carbono (LIMING, e XUELIANG, 2004; ADSUL *et al*. 2004; MARTINS *et al*. 2008). Além da fonte de carbono, faz-se necessária a suplementação do meio com nutrientes minerais os quais são de grande importância para o microrganismo produtor, já que participam do metabolismo como cofatores enzimáticos, muitos como moduladores conformacionais das estruturas enzimáticas. Na Tabela 2.7, podem-se observar algumas composições de meios minerais utilizados para produção de celulases, reportados na literatura.

Tabela 2.7. Meios de cultura líquidos para produção de celulases.

Unidades	Componente	Mandels e Stemberg (1976)	Mandels e Weber (1969)	Carvalho (2007)	Martins *et al*. (2008)
g/L	Uréia	-	0,3	1,2	0,03
	$(NH_4)_2SO_4$	1,4	1,4	-	0,13
	KH_2PO_4	2,0	2,0	6,0	0,2
	$CaCl_2.2H_2O$	-	0,4	-	0,03
	$MgSO_4.7H_2O$	0,2	0,3	1,2	0,03
	Peptona	-	0,75	-	1,0
	Ext. levedura	-	0,25	1,0	-
mg/L	$FeSO_4.7H_2O$	5,0	5,0	-	0,5
	$MnSO_4.4H_2O$	1,6	1,6	-	0,156
	$ZnSO_4.7H_2O$	1,4	1,4	-	0,14
	$CoCl_2.6H_2O$	2,0	2,0	-	0,14

2.1.6. Microrganismos produtores de celulases

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas (NOVO NORDISK, 1996; MENEZES, 1997). As enzimas celulolíticas são produzidas por uma grande variedade de bactérias e fungos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos (LJUNGDAHL e ERIKSON, 1985). Entretanto, relativamente poucos fungos e bactérias produzem altos níveis de celulases extracelular capazes de solubilizar a celulose cristalina extensivamente. Os microrganismos comumente utilizados para a produção de celulases são os

fungos filamentosos e as bactérias. Dentre os fungos filamentosos, são reportados: *Trichoderma reesei* (RECZEY *et al*., 1996; VELKOVSKA *et al*., 1997; URBÀNSZKI *et al*., 2000; DOMINGUES *et al*., 2001; HAYWARD *et al*., 2000; SHIN *et al*., 2000; BOLLÓK e RÈCZEY, 2000; LI *et al*., 2005; MIETTINEN-OINONEN, 2004; JUHÁSZ *et al*., 2005a, 2005b; ROSGAARD, *et al*., 2006), *Aspergillus niger* (KIM *et al*., 1997), *Humicola grisea* (DE-PAULA *et al*., 1999), *Aspergillus terreus* (MASSADEH *et al*., 2001), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibacillus*, *Chaetomium elatum*, *Penicillium funiculosum* (BOLLÒK e RÈCZEY, 2000; ROSGAARD, *et al*., 2006), *Thermoascus aurantiacus* (ROSGAARD *et al*., 2006). Na Tabela 2.8. estão apresentados alguns parâmetros e valores máximos de atividade obtidos em relação à produção de celulases, para efeito de comparação com os resultados levantados no presente trabalho de pesquisa.

Há, no entanto, interesse por microrganismos que, além de apresentarem altos índices de produção de enzimas, apresentem, também, um equilíbrio entre os grupos de enzimas do complexo celulásico, uma vez que cada grupo tem funções diferentes. Castro (2006), Carvalho (2007) e Castro e Pereira Jr. (2010) verificaram que o fungo filamentoso *Penicillium funiculosum* apresenta bom balanço das atividades endoglucanásica e β-glucosidásica como pode ser observado na Figura 2.6, razão de ter sido selecionado para a realização do presente trabalho, além de ser pouco explorado na literatura quando comparado com as linhagens do clássico *Trichoderma reesei*.

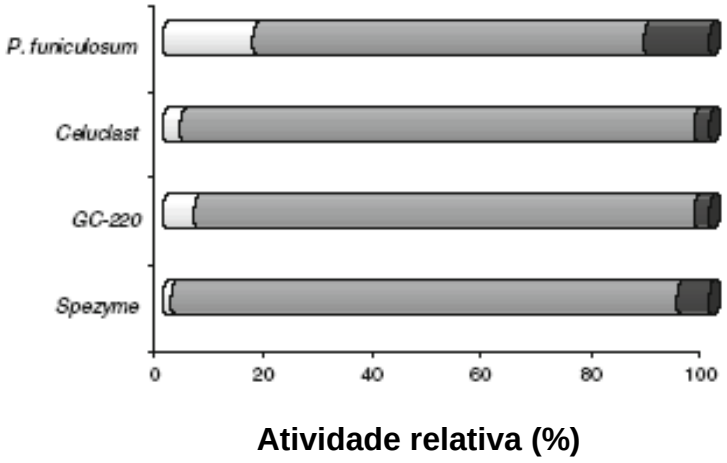


Figura 2.6. Distribuição das atividades de endoglucanase (cinza), exoglucanase (preto) e β-glucosidase (branco) no extrato enzimático bruto de *P. funiculosum* e em preparações comerciais. Fonte: Castro e Pereira Jr. (2010)

Tabela 2.8. Produção de celulases por diversos microrganismos.

Microrganismo	**Fonte celulósica**	**Condições de cultivo: forma de operação; temperatura (°C); pH**	**Máximas atividades**	**Tempo de processo**	**Referência**
P. funiculosum	Celulignina de bagaço de cana	FS; 30°C; 5,0	250 FPU/L; 1800 UI EG/L; 800 UI BG/L	120 h	Castro (2006)
P. funiculosum	Avicel[1]	FS	170 FPU/L; 5600 UI EG/L; 1300 UI BG/L	120 h	Carvalho (2007)
P. funiculosum	Avicel[2]	FS	508 FPU/L; 9.204 UI EG/L; 2.395 UI BG/L	120 h	Carvalho (2007)
T. reesei Rut C30	Salgueiro pré-tratado a vapor[1]	FS; 30; 5,5-6,0	1390 FPU/L; 1450 UI BG/L	4 dias	Bollók e Réczey (2000)
T. reesei Rut C30	Carvalho pré-tratado a vapor[2]	FS; 30; 5,0	4250 FPU/L; 45000 UI EG/L; 140UI BG/L	9 dias	Shin *et al*., 2000
T. reesei QM 9414	Avicel[2]	FS; 30; 4,8	163 FPU /L;	68 horas	Aiello *et al*. (1996)
T. reesei QM 9414	Bagaço[2]	FS; 30; 4,8	85 FPU /L;	68 horas	Aiello *et al*. (1996)
T. reesei QM 9414	Bagaço tratado com álcali[2]	FS; 30; 4,8	90 FPU /L;	44 horas	Aiello *et al*. (1996)
T. reesei Rut C30	Solka Floc[2]	FS; 28; 4,8	4250 UI PF/L	7 dias	Velkovska *et al*. (1997)
Thermoascus aurantiacus IMI 216529	Palha de Trigo[2]	FES; 49; 4,0	5,5 FPU/g; 79 UI BG/g; 1709 UI EG/g; 4 UI CBH/g	–	Kalogeris *et al*. (2003)
Cultura mista *T. reesei* Rut C30 e *Aspergillus Phoenicis* QM 329	Esterco[1]	FS; 27; 5,5	1540 FPU/L; 640 UI BG/L	10 dias; 9 dias	Wen *et al*. (2005)

[1] Experimentos conduzidos em frascos cônicos; [2] Experimentos conduzidos em biorreator.
FS: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido

Tabela 2.8. Produção de celulases por diversos microrganismos (cont).

Microrganismo	**Fonte celulósica**	**Condições de cultivo: forma de operação; temperatura (°C); pH**	**Máximas atividades**	**Tempo de processo**	**Referência**
Penicillium pinophilum IBT 4186	Solka Floc[2]	FS; 30; 5,0	280 FPU/L	221 horas	J∅rgensen *et al*. (2005)
P. persicinum IBT 13226	Solka Floc[2]	FS; 25; 5,0	800 FPU/L	236 horas	J∅rgensen et *al*. (2005)
P. brasilianum IBT 20888	Solka Floc[2]	FS; 30; 5,0	750 FPU/L	229 horas	J∅rgensen *et al*. (2005)
T. reesei ZU-02	Sabugo de milho e farelo de trigo[2]	FES; 30; 4,5	130 FPU/g	6 dias	Xia e cen, 1999
P. decumbens 1	Palha e farelo de trigo[2]	FES; 30; NR	15,2 FPU/g; 50,6 UI BG/g	4 dias; 4 dias	Mo *et al*. (2004)
A. terreus	Bagaço de cana[1]	FS; 35; 4,0	110 FPU/L; 1200 UI EG/L	7 dias; 7 dias	El-nawwi e El-Kader (1996)
Chaetomium globosum	Cacho de palmeira[2]	FS; 30; 5,5	2500 FPU/L; 60000 UI EG/L; 16000 UI BG/L	96 horas; 120 horas; 192 horas	Umikalsom *et al*. (1998)
Bacillus sp. JCM 9156	CMC[1]	FS; 37; 10,5	46 UI EG/L	30 horas	Zhang *et al*. (2004)
Cultura mista de *B. pumilus* selvagem e mutante CRI 6	CMC[1] Celobiose[1]	FS; 37; 6,0	2250 UI EG/L 1660 UI BG/L	24 horas 24 horas	Kotchoni *et al*. (2003)
T. reesei L27	Solka Floc[2]	FS; 28; 4,8	13600 FPU/L	7 dias	Hayward *et al*. (2000)
T. reesei Rut C30	Solka Floc[1]	FS; 28; 5,8	1200 FPU/L; 1350 UI BG/L	6 dias; 7 dias	Juhász *et al*. (2005)

[1] Experimentos conduzidos em frascos cônicos; [2] Experimentos conduzidos em biorreator.
FS: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido

Tabela 2.8. Produção de celulases por diversos microrganismos (cont).

Microrganismo	**Fonte celulósica**	**Condições de cultivo: forma de operação; temperatura (°C); pH**	**Máximas atividades**	**Tempo de processo**	**Referência**
T. reesei QM 9414	Fibra de milho pré-tratada[1]	FS; 28; 4,8	280 FPU/L; 9529 UI EG/L; 640 UI BG/L	8 dias	Li *et al*. (2005)
T. reesei Rut C30	Fibra de milho pré-tratada[1]	FS; 28; 4,8	350 FPU/L; 9350 UI EG/L; 730 UI BG/L	8 dias	Li *et al*. (2005)
T. reesei L27	Solka Floc[2]	FS; 28; 4,8	13600 FPU/L	7 dias	Hayward *et al*. (2000)
Cultura mista *T. reesei* QM 9414 e *A. terreus* SUK-1	Bagaço de cana[1]	FES; 30; 5,5	600 UI PF/L; 40 UI BG/L	7 dias; 6 dias	Massadeh *et al*. (2001)
Cultura mista *T. Reesei* LM-UC4 e *A. Phoenicis* QM 329	Bagaço de cana[1]	FES; 30; NR	14 UI PF/g; 80 UI EG/g; 17 UI BG/g	120 horas	Gutierrez-Correa e Tengerdy (1997)
T. reesei Rut C30	Solka Floc[2]	FS; 30; 5,0	1300 FPU/L	50 horas	Jhuász *et al*. (2004)
T. reesei ZU-02	Sabugo de milho[2]	FS; 30; 4,8	5000 UI PF/L; 240 UI BG/L	4 dias	Liming e xueliang (2004)
A. niger ATCC 6275	Torta de palmeira[1]	FES; 35; 6,1	26,8 UI/g	12 dias	Prasertsan *et al*. (1997)

[1] Experimentos conduzidos em frascos cônicos; [2] Experimentos conduzidos em biorreator. NR: Informação não reportada.
FS: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido

Dentre os microrganismos citados, os celulolíticos termofílicos são de particular interesse, devido à sua habilidade para produzir celulases termoestáveis, as quais são geralmente estáveis sob uma variedade de condições severas incluindo extremos de pH, bem como temperaturas superiores a 90°C (LAMED e BAYER, 1988; BHAT e BHAT, 1997). Por outro lado, é de grande interesse para a indústria do etanol, enzimas celulolíticas com atividade em temperaturas amenas, 30 a 37°C, uma vez que estas condições permitiriam o seu uso mais eficiente em processos de sacarificação e fermentação simultâneas de biomassa lignocelulósica.

Industrialmente, para produção de celulases é utilizado o fungo filamentoso *T. reesei*. Este fungo tem grandes vantagens para produção de celulases homólogas e heterólogas e de proteínas em geral. Seu cultivo é fácil e de baixo custo e é realizado, em fermentadores acima de 230 m^3 e apresenta baixa suscetibilidade a contaminações (PENTTILA, 1998). *T. reesei* é considerado um organismo seguro para produção de enzimas, devido a sua não patogenicidade a humanos e por não produzir micotoxinas ou antibióticos nas condições de produção enzimática (NEVALAINEN *et al*., 1994, NEVALEINEN e NEETHLING, 1998). *T. reesei* produz proteínas extracelulares e celulases naturalmente em grandes quantidades. A linhagem industrial tem sido obtida por técnicas de mutação clássica para aumentar a liberação de proteínas em geral e assim aumentar os níveis de produção de celulases, obtendo-se mutantes deficientes de produção de proteases (MIETTINEN-OINONEN, 2004). Estas linhagens de *T. reesei* mutantes têm sido reportadas como produtoras de grandes quantidades de proteínas (acima de 40 g/L) em meio de cultura em condições ótimas. As proteínas excretadas por *T. reesei* são compostas em sua maioria por celulases e a enzima CBH I representa aproximadamente 50% de todo secretoma. Dentre as celulases excretadas por *T. reesei*, a CBH I representa 60%, a CBH II, 25% e endoglucanases, 15% (GRITZALI e BROWN, 1979). A produção de enzima EG I representa de 5 a 10% das proteínas secretadas, porém, é proposto que a EG II seja a responsável por maior atividade endoglucanásica produzida por *T. reesei* (SUOMINEN *et al*., 1993).

2.1.7. Mecanismo de regulação da síntese de celulases em fungos filamentosos

As celulases são induzidas na maioria dos fungos somente em presença de celulose ou um outro indutor. As β-glucosidases, que apresentam ampla especificidade por β-D-glucosídeos, podendo também hidrolisar β-galactosídeos, β-D-xilanosídeios e α-L-arabinosídeos, são enzimas-chave na conversão de celoligossacarídeos em indutores para produção de celulases em *Hipocrea jecorina* e *Penicillium purpurogenum* (MARTINS, 2007).

A celobiose, o indutor observado na maioria dos fungos, é gerada pela hidrólise de celulose em nível basal por celulases constitutivas (GONG e TSAO, 1979). Seria esperado, então, que a celobiose induzisse a síntese de celulases pelo fato deste dissacarídeo ser a unidade repetitiva de celulose. Entretanto, dissacarídeos de glicose como a soforose (ligação β-1-2) e a gentiobiose (ligação β-1-6) foram observados como os maiores indutores da síntese de celulases em *H. jecorina* e *P. purpurogenum*, respectivamente (SUTO e TOMITA, 2001), sendo consideradas como “gatilho” para indução. A soforose tem o poder de indução de 2500 vezes maior que a celobiose em *Hipocrea jecorina* e a gentiobiose é capaz de induzir 50 vezes mais a produção de celulase em *Penicillium purpurogenum* que a celobiose. Mas como a soforose e gentiobiose são raros glicídios na natureza e nenhum deles é constituinte de celulose, o mecanismo de formação destes sacarídeos tem despertado interesse e tem sido estudado nesses fungos.

2.1.8. Formação de indutores por transglicosilação

De acordo com Suto e Tomita (2001), β-glucosidases intracelulares podem ter atividade de transglicosilação para formar soforose. Esta hipótese foi levantada após observação de que além de glicose, soforose, gentiobiose e trissacarídeos foram encontrados na mistura reacional de celobiose com extrato celular com atividade β-glucosidásica somente. Em outro trabalho, Kuhicek (1987) demonstrou que celoligossacarídeos solúveis e soforose podem induzir a produção de celulase em conídios, micélio e protoplastos, enquanto a celulose insolúvel pode induzir somente no conídio. Suto e Tomita (2001) sugerem que celulase constitutiva do conídio pode degradar celulose. Os autores reportam ainda que β-glucosidases existem como enzimas constitutivas nos conídios, micélio e protoplastos. Outra observação feita pelos autores foi que a adição de nojirimicina, uma glicoproteína inibidora de β-

glucosidases, inibiu a indução da síntese de celulases por celooligossacarídeos, mas não afetou a indução por soforose. Isto indica que β-glucosidases podem converter celooligossacarídeos como celobiose em soforose (SUTO e TOMITA, 2001).

Messner *et al*. (1991) estudaram celulases constitutivas da superfície de conídios e encontraram atividade de CBHI e CBHII os quais são responsáveis pela conversão da celulose cristalina em celooligossacarídeos.

Seiboth *et al*. (1997) concluíram que CBHII e endoglucanase II são importantes para iniciação da indução da síntese de celulases. Consequentemente, celobiohidrolase e endoglucanase constitutivas de conídios convertem a celulose cristalina a oligossacarídeos solúveis e então as β-glucosidases transglicosilam a celooligossacarídeo em soforose (SUTO e TOMITA, 2001). Estes autores propuseram um modelo hipotético para o mecanismo de indução da celulase em *H. jecorina* e *P. purpurogenum* (Figuras 2.7 e 2.8).

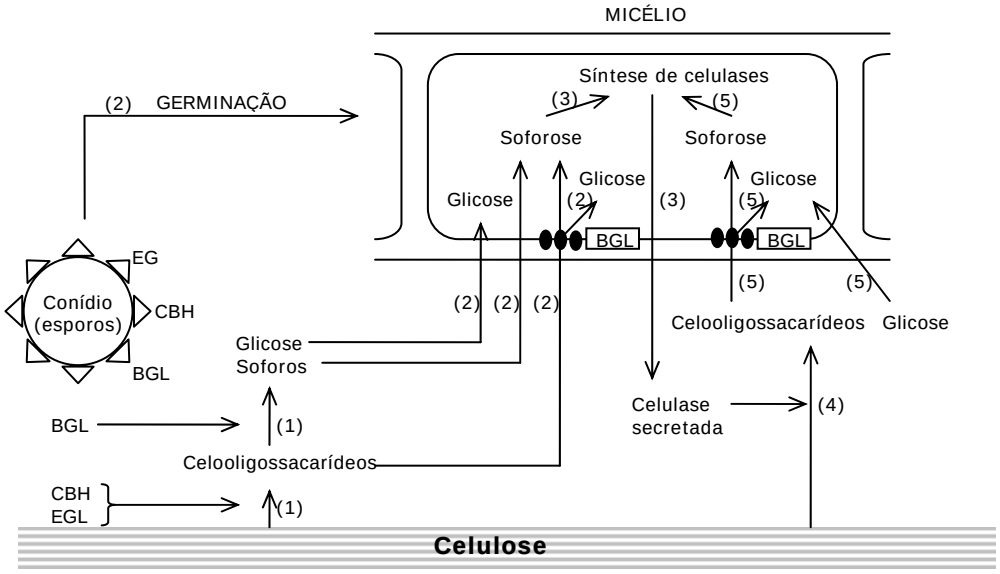


Figura 2.7. Modelo de indução de celulases em *Hipocrea jecorina*. CBH – Celobiohidrolase; BGL - β-glucosidases; CBC – celobiohidrolase; EGL – endoglucanase. Os números indicam a ordem de cada etapa. Fonte: Suto e Tomita (2001).

Neste modelo, quando o conídio entra em contato com a celulose (1), a celobiohidrolase da superfície do esporo degrada a celulose, liberando celooligossacarídeos, que são hidrolisados à glicose e transglicosilados à soforose

por ação da β-glucosidase constitutiva (2). Com a presença de glicose, os esporos germinam e a glicose como fonte de carbono e soforose como indutor, entram na célula (2). β-glucosidases ligadas à membrana plasmática convertem celooligossacarídeos à soforose e glicose (2). A soforose induz a síntese de celulases que, então, é secretada para o meio externo (3). As celulases secretadas agem sobre a celulose, liberando mais celooligossacarídeos e glicose (4). Estes sacarídeos liberados são assimilados (5) e os celooligossacarídeos são hidrolisados à glicose; sendo parte desta transglicosilada a soforose pelas β-glucosidases constitutivas (5). Este ciclo se repete até que a celulose esteja integralmente hidrolisada.

Quanto ao modelo de indução em *Penicillium purpurogenum*, Suto e Tomita (2001) propuseram que as celulases constitutivas degradam a celulose à celooligossacarídeos e glicose (1). Estes sacarídeos entram na célula e a glicose é assimilada (2) como fonte de carbono, e a β-glucosidase intracelular converte o celooligossacarídeo à gentiobiose e glicose (2). A gentiobiose formada induz a síntese de celulases (3) e esta é secretada ao meio externo (3). As celulases secretadas hidrolisam a celulose (4) ocasionando liberação de glicose e celooligossacarídeos, que entram na célula recomeçando o ciclo, como mostrado na Figura 2.8.

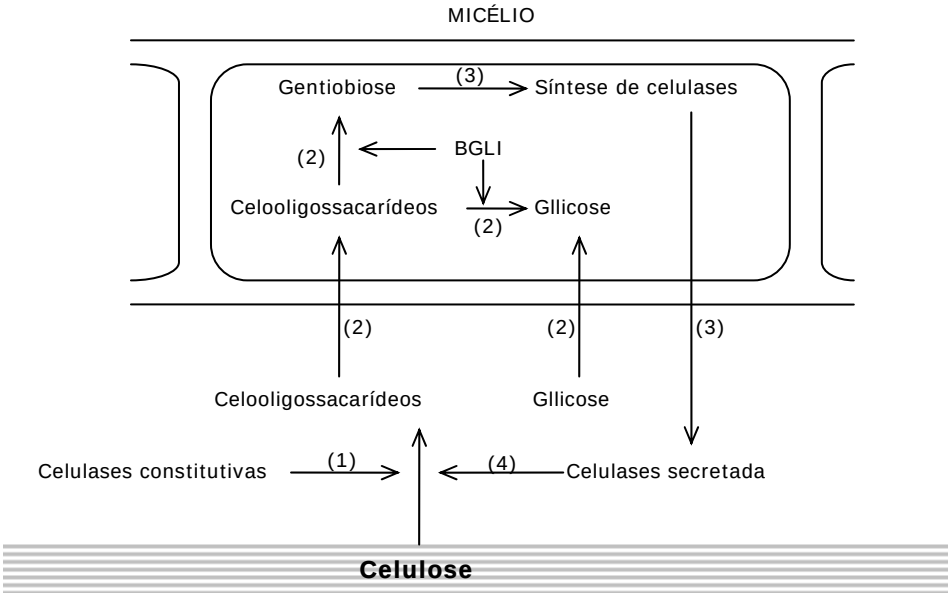


Figura 2.8. Modelo de indução de celulases em *Penicillium purpurogenum*. BGLI - β-glucosidases intracelular. Os números indicam a ordem de cada etapa. Fonte: Suto e Tomita (2001).

2.1.9. Repressão catabólica na produção de celulases

Repressão catabólica é um fenômeno observado na regulação de celulases quando uma fonte de carbono facilmente assimilável como glicose é adicionada. Os genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* e *egl5* são reprimidos por glicose em nível transcricional em *H. jecorina*. As proteínas responsáveis pela repressão catabólica são a MIG1 em leveduras e CreA em *Aspergillus*. Os repressores catabólicos identificados em fungos produtores de celulases, *H. jericona* (CRE1) e *Humicola grisea* (CreA) possuem base de sequência de nucleotídeo da proteína CreA de *Aspergillus* (SUTO e TOMITA, 2001).

Todos os repressores catabólicos destes fungos têm o domínio “dedo de zinco” perfeitamente conservado. Este domínio possui a seqüência 5’-SYGGRG-3’ localizada na região à montante dos genes (porção do gene localizada antes da região codificadora de determinada proteína). Esta sequência está envolvida na regulação da transcrição e é encontrada também nos genes *egl1* e *exo1* de *H. jericona* e *H. grisea*. Na região à montante do gene *avi1*, que codifica Avicelase I, que é uma celobiohidrolase de *P. purpurogenum*, são observados uma seqüência de 5’-CTGGAG-3’ e dois adjacentes, 5GCGGAG-3’. Em *H. jacorina*, a proteína CRE1 está envolvida também com a regulação da expressão de xilanase e outras hemicelulases (SUTO e TOMITA, 2001).

O repressor catabólico de carbono é produzido constitutivamente e pode ser essencial para o crescimento, pois mutantes não deficientes deste repressor apresentam bom crescimento. Uma questão levantada foi, se o repressor está presente na célula constitutivamente, como pode regular a transcrição de genes dependentes da existência de glicose? Vautard-Mey e Fèvre (2000) observaram que a localização subcelular da proteína CRE1 em *Sclerotinia sclerotiorum* muda dependendo da fonte de carbono. CRE1 estava presente no núcleo do micélio crescido em meio contendo glicose. Entretanto, após o micélio ser transferido para um meio contendo pectina, a CRE1 do núcleo foi quase que totalmente depletado. A CRE1 foi então detectada no citosol. Esta observação indica que tanto a CRE1 pode estar localizada no núcleo em presença de glicose, como pode se mover do núcleo para o citosol quando em ausência de glicose no meio.

2.1.10. Via de secreção

O mecanismo molecular do sistema de secreção de proteínas de fungos filamentosos tem sido amplamente estudado para tornar a secreção de proteínas mais eficientes (RADZIO e KUCK, 1997; VELDHUISEN *et al*., 1997; CONESA *et al*., 2001, SALOHEIMO *et al*. 2004). Em fungos, o enovelamento da proteína, glicosilação, formação da ligação dissulfeto, a fosforilaçao e a montagem das subunidades ocorrem no retículo endoplasmático (ER). A reação de enovelamento no retículo endoplasmático é a principal razão para um maior ou menor rendimento de proteínas secretadas. O mecanismo UPR (*unfolded protein response*) detecta a presença de estrutura protéica linear no retículo endoplasmático e induz a síntese de enzimas responsáveis pelo enovelamento, denominadas por *foldases*. ER-residente *chaperones* e as foldases auxiliam na secreção de proteínas.

O gene *pdil* que codifica a dissulfeto isomerase, uma foldase de retículo endoplasmático, foi isolado de *T. reesei* (SALOHEIMO *et al*., 1999). O promotor *pdil* tem dois elementos UPR potencial e foi demonstrado que está sob controle da via UPR. Saloheimo *et al*. (2003) observaram que, concomitante com a indução da via UPR, os genes codificados da proteína secretada são rapidamente regulados em *T. reesei*. Este tipo de regulação pode ser causado por diferentes inibidores da secreção e por expressão de outras proteínas (MIETTINEN-OINONEN, 2004).

Em eucariotos, a proteína passa do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, onde ocorrem modificações adicionais como glicosilação. A estrutura e função da proteína secretada podem ser modificadas por este processo. Em geral, fungos filamentosos realizam alta glicosilação com mananas e são também capazes de efetivar a *O*-glicosilação. A *O*-glicosilação é essencial para a secreção de EGI e EGII em *T. reesei* (KUBICEK *et al*., 1987). Kruszewska *et al*. (1999) expressaram em *T. reesei* um gene codificado em manosilfosfodolicol sintase, a qual é requerida para síntese de glicanas e é a enzima-chave na reação de *O*-manosilação. Como resultado, o fungo filamentoso foi capaz de aumentar o nível de CBHI secretada. Isto sugere que a glicosilação insuficiente pode limitar a secreção de celulases (MIETTINEN-OINONEN, 2004).

Finalmente, o “pacote de proteínas”, na vesícula de secreção, é direcionado para membrana plasmática, de onde são secretados. Esta é uma evidência de que a via de secreção também envolve transporte do retículo endoplasmático para o

complexo de Golgi e deste para a membrana plasmática em *T. reesei* (KRUSZEWSKA *et al*., 1999). Muitos estudos indicam que a secreção de proteínas em fungos filamentosos ocorre nas hifas, em regiões apicais ou subapicais (ARCHER e PEBERDY, 1997). No entanto, a *cbh1* mRNA e CBHI de *T. reesei* foram encontrados não somente nos compartimentos apicais, mas também nos compartimentos mais velhos da colônia (MIETTINEN-OINONEN, 2004).

2.1.11. Proposta para produção industrial de celulases

O Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) do Departamento de Energia dos Estados Unidos desenvolveu um projeto incluindo as tecnologias de pré-hidrólise, produção de celulases e sacarificação e co-fermentação simultâneas. Nas Figuras 2.9 e 2.10 estão mostrados os esquemas das plantas para produção de celulases propostos por Wooley *et al*. (1999). A maior área destinada para produção de celulases é ocupada por 11 biorreatores aerados de 1000 m^3 cada. Os biorreatores são operados em batelada, estando oito em operação, um sendo drenado, um sendo cheio e um a ser limpo e esterilizado.

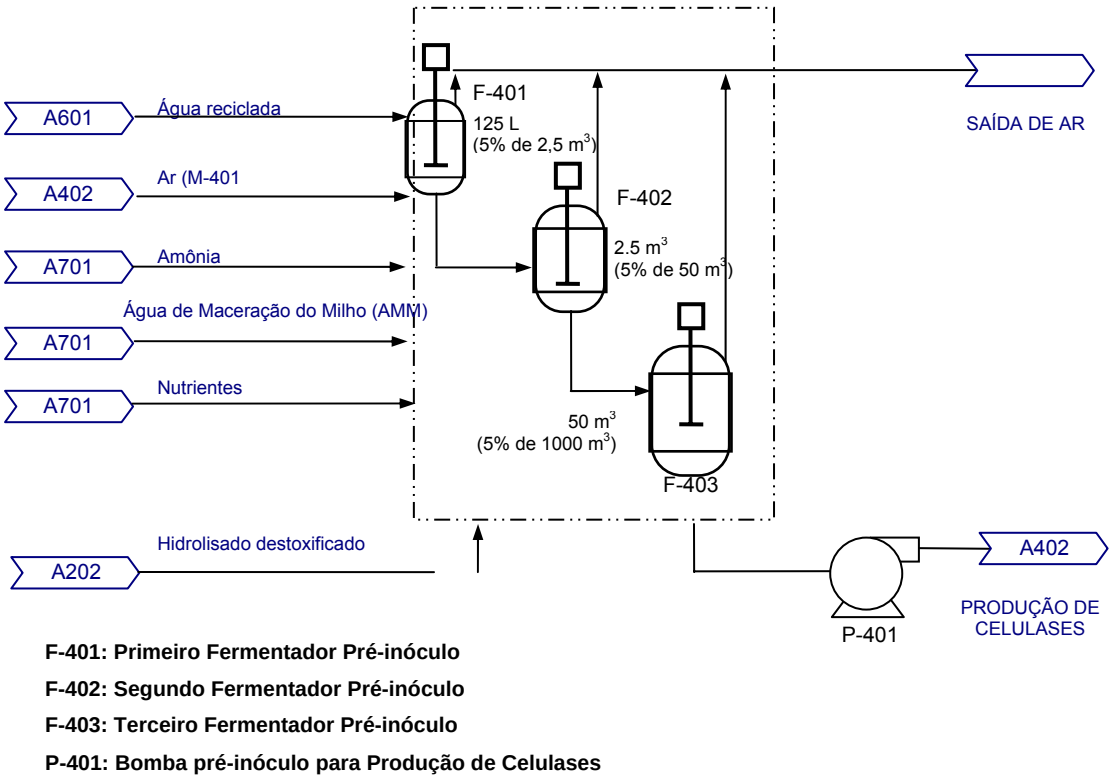
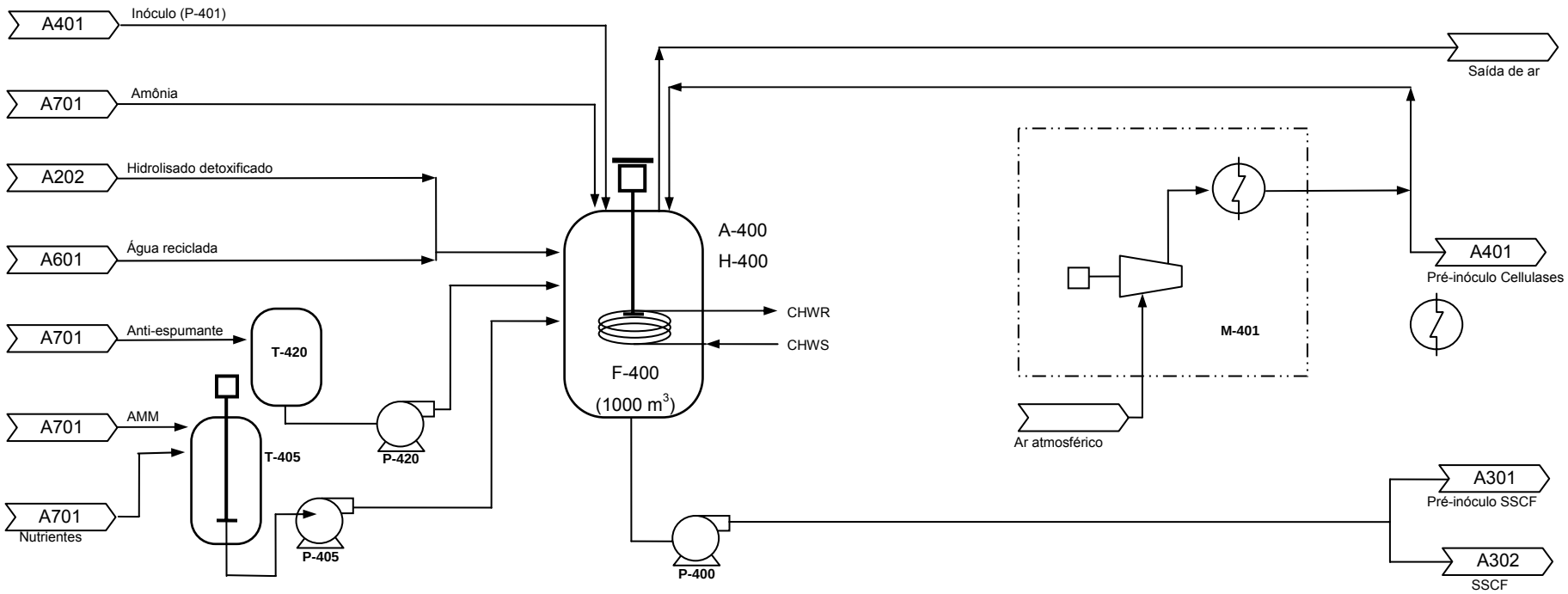


Figura 2.9. Seção de produção de pré-inóculo proposta por Wooley *et al*. (1999).



A-400: Agitador do Fermentador Produção de Celulases

F-400: Fermentador/Produção de celulases

H-400: Resfriador do Fermentador/Produção de celulases

T-420: Tanque anti-espumante

T-405: Tanque de preparo do Meio

P-420: Bomba anti-espumante

P-405: Bomba Meio de cultura

P-400: Bomba extrato enzimático

M-401: Compressor de ar para Fermentadores

Figura 2.10. Seção de produção de celulases proposta por Wooley *et al*. (1999).

A fonte de carbono para os biorreatores é o hidrolisado do pré-tratamento ácido, destoxificado. Água de maceração do milho e micronutrientes também são adicionados ao reator. Amônia é usada para o controle de pH e fornece nitrogênio adicional ao microrganismo. Nos biorreatores, é injetado ar comprimido e refrigerado. Como antiespumante, é adicionado óleo de milho. Os biorreatores são resfriados com água fria por meio de serpentinas internas. O inóculo é produzido em três vasos, cada um com tamanhos diferentes. O projeto foi desenvolvido tendo como parâmetros a quantidade de celulase requerida no processo SSCF (15 FPU/g de celulose); rendimento de 200 FPU/(g de celulose+xilose); produtividade de 75 $FPU.L^{-1}.h^{-1}$; e, concentração inicial de celulose de 4% (m/v).

Cada ciclo começa com a limpeza e esterilização de um biorreator de produção de celulases. O biorreator, limpo e esterilizado, é carregado com fonte de carbono de modo a atingir a concentração final de 4 % de celulose e a água de maceração de milho para uma concentração final de 1 %. Os nutrientes descritos por Schell *et al*. (1991), apresentados na Tabela 2.9, são adicionados, seguido da adição de óleo de milho na concentração final de 0,1% (v/v).

Tabela 2.9. Nutrientes requeridos para produção de celulases na planta industrial proposta por Wooley *et al*. (1999).

Componentes	Quantidade (g/L)
$(NH_4)_2SO_4$	1,4
KH_2PO_4	2,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,3
$CaCl_2.2H_2O$	0,4
Tween 80	0,2

Uma vez adicionados todos os componentes do meio, é adicionado o inóculo a 5 % (v/v) e a fermentação é realizada a 28 °C por 160 h, aerada a uma taxa de 0,577 vvm (volume/min de ar por volume de meio no reator). O fluxo de ar é calculado para alcançar uma taxa de transferência de oxigênio (OTR) de 80 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$. A OTR pode ser aumentada pelo aumento da relação altura/diâmetro do biorreator; aumento da pressão de operação; aumento da vazão de ar; aumento da agitação; melhoria do designer do agitador; ou, aumento da concentração de

oxigênio de entrada. A concentração de oxigênio dissolvido desejada é estimada ser 30% da saturação a uma pressão absoluta de 1 atm (0,063 mmol/L). A maioria dos trabalhos de produção de celulases em escala de laboratório é conduzida com oxigênio dissolvido entre 20 e 30 % de saturação.

2.1.12. Separação, concentração e purificação de enzimas

As operações que se seguem ao processo fermentativo (*downstream*) são de extrema importância devido ao custo substancial de separação, concentração e purificação das enzimas de interesse tecnológico. Geralmente, as preparações enzimáticas comerciais consistem essencialmente do sobrenadante da fermentação concentrado, ao qual podem ser misturados aditivos para estabilizar a atividade enzimática, bem como para auxiliar o processo catalítico, por exemplo, proteínas acessórias. Etapas de purificação desnecessárias devem ser evitadas, pois são custosas em termos de equipamentos, mão-de-obra e perda de atividade enzimática (EUROPEAN COMISSION, 2002). As etapas envolvidas na recuperação de enzimas envolvem procedimentos específicos e brandos em ralação a pH, temperatura e força iônica, adequados à manutenção da conformação nativa do biocatalisador e, por extensão, da sua atividade.

2.1.12.1. Etapas iniciais de separação e concentração do preparado enzimático

A maior parte das enzimas comercializadas industrialmente é extracelular e a primeira etapa para o isolamento é a separação das células do meio de cultura. No entanto, existem enzimas intracelulares de grande interesse tecnológico e, neste caso, a primeira etapa de separação envolve ruptura das células, que pode ser feita mecanicamente (homogeneização em alta pressão ou moagem úmida) ou por lise química, térmica ou enzimática (SHÜTTE e KULA, 1993; ABRAHÃO NETO, 2001; EUROPEAN COMISSION, 2002).

Os métodos mais conhecidos para separação de células são: centrifugação, floculação, extração e filtração (GERHARTZ, 1990). Atualmente, foram desenvolvidas centrífugas eficientes para separar as células e fragmentos celulares em processo contínuo. A centrifugação tem sido empregada em grande escala por ser sabidamente um método brando de simples aplicação e de baixo impacto no rendimento final. O seu custo, no entanto, é relativamente alto e dificilmente atinge-se a clarificação desejada da corrente de alimentação.

No caso da filtração de suspensões, o aumento da espessura da torta que se forma, resulta no aumento da resistência à passagem da fase líquida, ocasionando a diminuição do fluxo. Dificuldades podem surgir devido à compressibilidade do material biológico. Os filtros à pressão, por terem uma capacidade limitada, são geralmente usados na etapa final de filtração de soluções enzimáticas. Os filtros à vácuo são normalmente escolhidos devido à compressibilidade do material biológico (EUROPEAN COMISSION, 2002). Recentemente, a filtração em membranas em fluxo cruzado (conhecida também como filtração tangencial) vem ganhando espaço para separação (microfiltração) e concentração (ultrafiltração).

Na filtração convencional, a solução ou a suspensão é pressionada contra a membrana, que deixa passar o solvente e os solutos dissolvidos. Os materiais em suspensão ficam retidos, acumulando-se na interface da membrana/solução, um fenômeno conhecido como polarização de concentração. Na filtração tangencial, a solução de alimentação escoa tangencialmente pela superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado transversalmente à mesma. A polarização de concentração continua presente, mas seu efeito é minimizado através da alteração da hidrodinâmica de escoamento da corrente de alimentação (HABERT *et al*., 1997).Na Figura 2.11 estão representados esquematicamente os dois modos de operação e suas curvas típicas de fluxo do permeado em função do tempo.

Após separação da biomassa celular e outros resíduos sólidos, o volume a ser processado é geralmente grande, devendo ser reduzido por concentração para garantir que se possa posteriormente alcançar uma purificação economicamente viável. A concentração das enzimas pode ser feita através de evaporadores a vácuo, por precipitação ou por ultrafiltração, em condições brandas que não levem à perda da atividade. A precipitação é um procedimento simples para concentração de enzimas que pode ser efetuada por adição de sais, solventes orgânicos, soluções de polímeros ou por alteração do pH. No entanto, a precipitação é geralmente utilizada em pequena escala pois, quando o volume a ser processado é muito grande, o tempo de residência necessário é extremamente longo, especialmente no caso de solventes orgânicos, podendo resultar na inativação das enzimas (GERHARTZ, 1990).

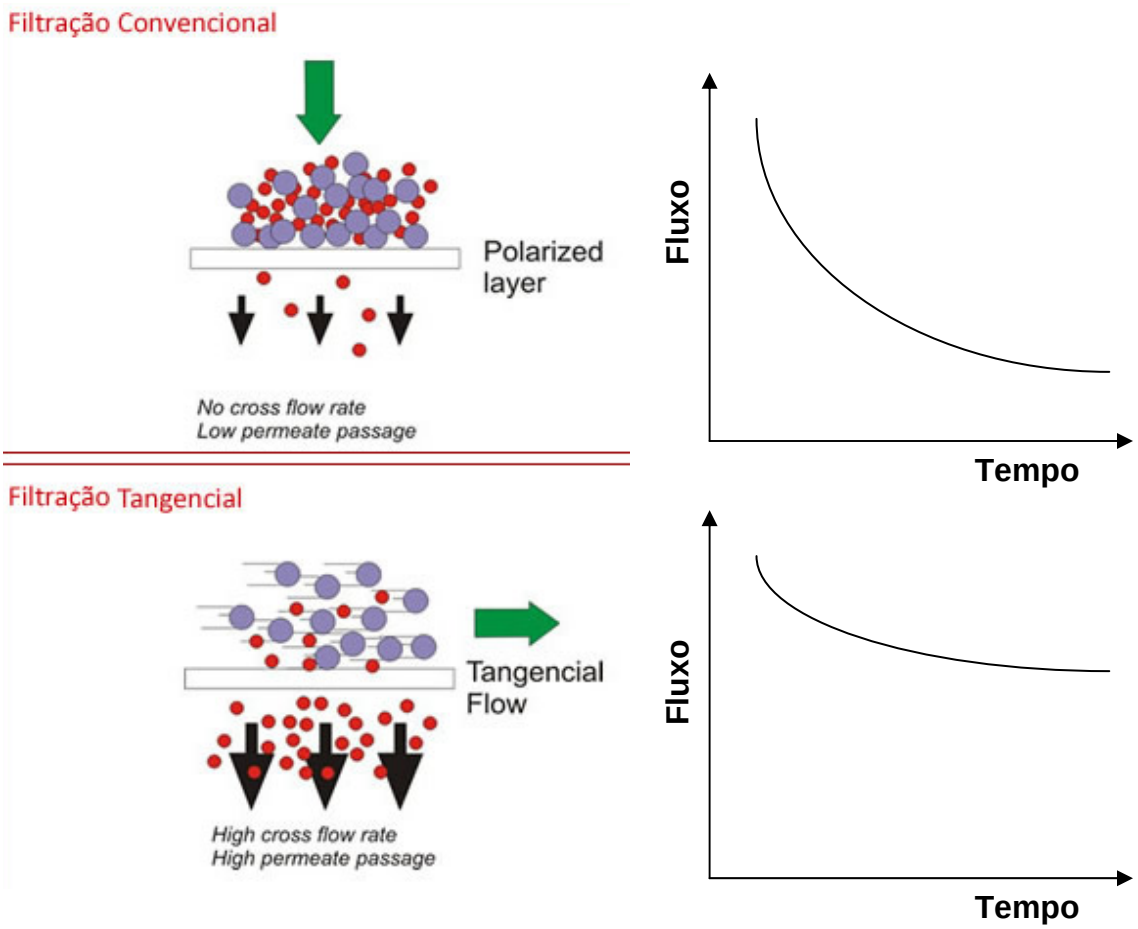


Figura 2.11. Esquema da filtração convencional e filtração tangencial. À esquerda, as curvas típicas de fluxo do permeado em função do tempo. Fonte: http://www.dbdfiltros.com.br

A ultrafiltração representa uma técnica atrativa para a concentração de enzimas e sua purificação primária (KRSTIC et al., 2007). A seletividade é definida pela relação de tamanho entre as espécies presentes e os poros da membrana. A enzima que se deseja concentrar deve ser inerte em relação ao material da membrana. O processo de ultrafiltração é um método comercialmente viável com uma alta produtividade, além de oferecer uma pureza razoável. Adicionalmente, é extremamente simples do ponto de vista operacional e de escalonamento, por possuir modulos de fácil operação (LI *et al*., 2006).

Na literatura já foram citados mais de 130 materiais utilizados para fabricação de membranas, no entanto, apenas alguns desses materiais alcançaram uso industrial. Existem três polímeros principais utilizados para fabricação de membranas para microfiltração e ultrafiltração: acetato de celulose, poliamida e polissulfona (SHERYAN, 1998).

2.1.12.2. Engenharia de Produto Enzimático (etapas finais de acabamento e melhoramento de desempenho)

As preparações enzimáticas, brutas ou purificadas, devem manter suas características de catalisador durante o armazenamento e comercialização até sua aplicação, pois as enzimas são comercializadas com base na sua atividade catalítica. A maioria das preparações enzimáticas industriais contém, além da enzima ativa, outras proteínas estabilizantes, preservativos, sais e um diluente que permite a padronização entre as produções obtidas de diversas bateladas com diferentes atividades específicas. Para manutenção da atividade enzimática é fundamental a preservação de sua conformação nativa, sendo utilizados para esta finalidade, aditivos, modificação química controlada ou imobilização enzimática.

Polióis de baixa massa molecular como glicerol, sorbitol e manitol estabilizam as enzimas e reprimem o crescimento microbiano devido à redução da atividade de água (EUROPEAN COMISSION, 2002). Além disso, várias enzimas podem ser mantidas na forma liofilizada por longos períodos de tempo na presença de estabilizadores como sais, carboidratos ou proteínas inertes, predominantemente albumina de soro bovina (BSA) (GERHARTZ, 1990). Outras substâncias que podem ser adicionadas às preparações de enzimas para sua estabilização incluem: antibióticos, ésteres de ácidos benzóicos como preservativos de preparações enzimáticas líquidas e inibidores de enzimas contaminantes.

Adicionalmente, métodos modernos de engenharia de proteínas e de evolução molecular têm permitido o aprimoramento de propriedades de uma dada enzima, tais como estabilidade, mecanismos catalíticos, tipo e especificidade de substrato, dependência de co-fator, pH e temperatura ótimos e parâmetros cinéticos.

A estabilidade das celulases em condições de operação industrial é uma característica importante na eficiência da hidrólise da celulose. Estes biocatalisadores produzidos pelo fungo *Trichoderma reesei* têm mostrado uma boa estabilidade até 50°C, entretanto, celulases estáveis acima desta temperatura aumentariam a velocidade do processo de hidrólise da celulose. Neste contexto, a produção de celulases por microrganismos termofílicos e o aumento da estabilidade térmica das celulases através da engenharia de proteínas estão sendo estudados (SHÜLEIN, 2000; SASTRY, 2002). Outros fatores, como a presença de ativadores,

estabilizantes e surfactantes também podem afetar a estabilidade e a atividade das enzimas celulolíticas.

Várias abordagens têm sido utilizadas para melhorar o desempenho de celulases e diminuir a quantidade de enzimas necessárias para eficiente hidrólise de materiais lignocelulósicos. A primeira meta para a engenharia de celulases tem sido as celobiohidrolases, que constituem 60 a 80% dos sistemas celulásicos naturais (LYND *et al*. 2002; TETER *et al*. 2004). Estes autores demonstraram que a utilização de técnicas combinadas da engenharia genética (*site-directed mutagenesis*, *site-saturation mutagenesis*, *error-prone PCR and DNA shuffling*) gerou linhagens altamente produtoras de celobiohidrolases (Cel7a), que superaram a linhagem selvagem na hidrólise de resíduo agrícola pré-tratado do processamento do milho.

Outra abordagem que tem sido realizada é a introdução de genes heterólogos que codificam para produção de celulases em sistemas já existentes, de forma a melhorar o desempenho global da linhagem recombinante. Bower (2005) introduziu vários genes que codificam para endoglucanase em *T. reesei*. Um deles, GH5A de *Acidothermus cellulolyticus*, foi fusionado com o de celobiohidrolase (CBH I) de *T. reesei*. O produto da fusão expresso em *T. reesei* foi mais efetivo na hidrólise de celulose de resíduo de processamento do milho do que o oriundo da linhagem parental (redução do tempo de hidrólise da celulose de 10 para 6 horas).

2.1.13. Mercado de celulases e perspectivas

As maiores barreiras para a produção comercial de etanol celulósico são a atual escala de fabricação das celulases e o alto preço dessas enzimas. Para resolver esse problema, o Programa de Biomassa dos EUA associou-se, no ano 2000, às duas maiores empresas produtoras de enzimas do mundo — à *Genencor*, subsidiária da multinacional dinamarquesa do setor de alimentos *Danisco*, e à *Novozymes*, que também tem sede na Dinamarca. Ambas receberam US$ 18 milhões para o desenvolvimento do preparado celulásico. O objetivo dessas parcerias era reduzir de 10 a 50 vezes o custo das enzimas, chegando à meta de US$ 0,10 ou menos por galão (cerca de US$ 0,03 por litro) de etanol — comparativamente, as enzimas que hidrolisam o amido do milho em açúcar custam entre US$ 0,03 e US$ 0,05 por galão (entre US$ 0,009 e US$ 0,015 por litro) de etanol (BUENO, 2007).

As pesquisas estenderam-se até 2004 e segundo coordenadores do programa, ambas as companhias anunciaram ter desenvolvido enzimas com custo abaixo de US$ 0,50 por galão (cerca de US$ 0,15 por litro). Na época, a *Genencor* divulgou um comunicado afirmando que o custo de suas enzimas ficara entre US$ 0,10 e US$ 0,20 por galão (entre US$ 0,03 e US$ 0,06 por litro) (BUENO, 2007).

O governo dos Estados Unidos não tem poupado esforços nem dinheiro para tentar diminuir a dependência do país em relação ao petróleo estrangeiro. Desta forma, por meio do Departamento de Energia (DOE), estabeleceu uma meta, a partir de maio de 2007, de realizar um investimento de US$ 200 milhões nos próximos cinco anos, para o desenvolvimento de biorrefinarias de pequena escala — isto é, com um décimo da capacidade de uma planta comercial — para converter biomassa em combustível líquido, principalmente etanol, e em outros produtos. Essas pequenas biorrefinarias deverão empregar tecnologias inovadoras, ter condições para ser ampliadas facilmente e contar com uma sólida estratégia de negócios. Os US$ 200 milhões anunciados para maio de 2007 somaram-se aos US$ 385 milhões que o departamento já havia anunciado em fevereiro daquele ano para um fim semelhante: financiar durante quatro anos o desenvolvimento de seis biorrefinarias de grande escala, que deverão utilizar processos mais próximos da etapa comercial. Os projetos que receberam as maiores verbas — até US$ 80 milhões — foram o da *Broin Companies*, que reúne as empresas *Dupont* e *Novozymes*; Laboratório Nacional de Energia Renovável do DOE; *Iogen Biorefinery Partners*, que inclui a empresa *Iogen* e o grupo *Royal Dutch/Shell*; e banco de investimentos *Goldman Sachs*. Dos demais projetos, dois receberam até US$ 76 milhões (*Range Fuels e Abengoa Bioenergy Biomass*), um recebeu até US$ 40 milhões (*BlueFire Ethanol, Inc*.) e o último, até US$ 33 milhões (*Alico, Inc.)* (BUENO, 2007).

Além de financiar empreendimentos como as biorrefinarias, o DOE está investindo em pesquisas para aprimorar os microrganismos que atuam no processo de transformação da biomassa no chamado etanol celulósico. Em março de 2007, o departamento comunicou que a Universidade Purdue e as empresas Cargil, Celunol, DuPont e Mascoma receberão até US$ 23 milhões nos próximos cinco anos para desenvolver microrganismos altamente eficientes e capazes de sobreviver nas mais variadas condições ambientais (BUENO, 2007).

O governo dos EUA, em 2007, estabeleceu uma meta de chegar a 2017 produzindo 35 bilhões de galões (cerca de 132,5 bilhões de litros) de combustíveis alternativos, sendo a maior parte deles de etanol. É aí que entra a importância de projetos como os da Universidade Purdue e das quatro empresas: os organismos eficientes que elas vão desenvolver ajudarão a diminuir o custo do processo de conversão de biomassa em etanol — um fator fundamental para torná-lo comercialmente viável.

O Brasil atualmente depende de preparados celulásicos importados. De acordo com MDIC (2010), que é um portal do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior, de janeiro de 2007 a junho de 2010, o Brasil importou 431,80 toneladas de preparado enzimático à base de celulases, equivalendo a US$ 2.657.658 (FOB) e exportou neste mesmo período 169,5 toneladas, equivalendo a US$ 1.907.564 (FOB).

O processo de produção do etanol a partir da biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar está em fase de testes em uma unidade experimental no Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da Petrobras, no Rio de Janeiro, o qual iniciou operação em dezembro de 2007. Esta planta, primeira da América Latina, opera com tecnologia desenvolvida em colaboração com os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da UFRJ e pode ser operado não só com palha e bagaço de cana, mas também para qualquer outro resíduo agrícola ou agroindustrial de composição lignocelulósica. A planta piloto da Petrobras foi projetada de forma que o processo todo seja integrado, desde o pré-tratamento do bagaço até a fermentação e destilação do etanol, incluindo a produção de celulases.

O incentivo à produção de bioetanol de segunda geração tem atraído investimentos e parceria com indústrias multinacionais produtoras de enzimas. De acordo com Kirihata (2010) a companhia dinamarquesa *Novozymes* assinou contrato com a brasileira *Dedini*, que fabrica equipamentos para o setor de açúcar e etanol. Para o mercado brasileiro, em março de 2010, a empresa *Novozymes* apresentou duas enzimas, com o fim de reduzir os custos do processo de produção do biocombustível a partir dos resíduos da cana-de-açúcar, como o bagaço. Até o final deste ano (2010), o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) espera finalizar a planta piloto para desenvolvimento de processos, em Campinas, no Estado de São Paulo. A empresa *Novozymes* apresentou interesse

em utilizar a planta piloto do CTBE para testes de suas enzimas e, conforme o instituto, as duas partes estudam o estabelecimento de uma possível parceria institucional (KIRIHATA, 2010).

De acordo com um relatório do Fórum Econômico Mundial (FEM) divulgado em junho de 2010, a conversão de biomassa em combustíveis, energia e produtos químicos tem o potencial de contribuir com mais de US$ 230 bilhões para a economia mundial até 2020.

2.2. *Penicillium funiculosum*: posição taxonômica e características

O fungo filamentoso em estudo, pertence à seguinte classificação taxonômica:

Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Classe: Eurotiomycetes
Subclasse: Eurotiomycetidae
Ordem: Eurotiales
Família: Trichocomaceae
Gênero: *Penicillium*
Espécie: *P. funiculosum*
Nome Científico: *Penicillium funiculosum* Thom
Sinonímias: *Penicillium aurantiacum* J.H. Mill.
Penicillium rubicundum J.H. Mill.
Penicillium varians G. Sm.

Cultivado em gelatina ou em ágar batata, apresenta coloração verde escuro, rápida propagação, superfície velutina com hifas procumbentes (que se arrastam na superfície), tufos e cordas de hifas sustentam conidióforos laterais. O reverso torna-se vermelho, púrpuro ou púrpuro escuro, quase negro, com o meio todo pigmentado; conidióforos curtos, 20 a 100 μm, na maioria das vezes ramos perpendiculares a partir de hifas rasteiras e algumas vezes se erguem separadamente no substrato; frutificação conidial com 125 a 160 μm de comprimento, com 1 ou 2 que carregam ramos verticilados e densos verticilos de células conidíferas paralelas de 10-14 μm por 2-3 μm; conídios primeiramente cilíndricos, passando então a fusiforme ou elíptico, de 3-4 por 2-3 μm, verdes, em cadeias que se dispersam com facilidade (Figura 2.12) (THOM, 1910).

Seu crescimento em ágar batata forma colônias típicas com pigmentação vermelha no meio sólido. A fonte de carbono influencia significativamente as

características da colônia: em caldo de cana 3 %, apresenta bom crescimento, mas não apresenta coloração vermelha no meio; em lactose 3 %, galactose 3 % ou ácido lático 3 %, observa-se pouco crescimento; em glicerina 3 %, apenas germina, porém cresce quando adicionado de açúcar. Em amido de batata 3 %, coloniza bem, porém não apresenta coloração vermelha (THOM, 1910).

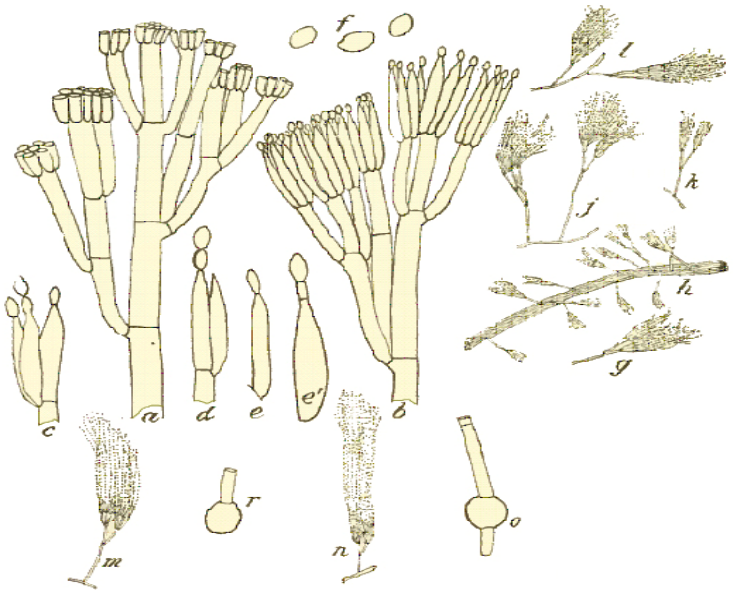


Figura 2.12. Ilustração do fungo filamentoso *Penicillium funiculosum*: a, b, c, d, e, f, frutificação conídial com conidióforos e conídios (x 900, exceto c, x 1000); g, h, i, j, k, l, m, n, esquema da frutificação, isolado e germinados sobre a hifa e corda de hifas (x 140); o, r, germinação de conídio (x900). Fonte: Thom (1910)

2.3. Materiais lignocelulósicos

O Brasil acumulou vasta experiência no desenvolvimento de uma potente agroindústria, a agroindústria do etanol, reconhecida como a mais eficiente do mundo em termos de tecnologia de processo e de gestão (PEREIRA, 2006; PEREIRA JR. *et al*., 2008). Em todo o mundo, são efetuadas pesquisas visando inovações tecnológicas para o aproveitamento da bioenergia, sendo a produção de etanol um dos exemplos de sucesso. Algumas características devem ser observadas para consolidar os combustíveis de biomassa, sendo uma delas a garantia de fornecimento sem risco de interrupções.

Uma boa fonte de matéria-prima para bioconversão a etanol está concentrada nos materiais lignocelulósicos, normalmente na forma de resíduos (PEREIRA JR. *et al*., 2008). Aproximadamente, em 2006, 350 milhões de toneladas de resíduos agrícolas e agroindustriais foram produzidos anualmente no Brasil, sendo cerca de

140 milhões oriundos da cultura da cana-de-açúcar. Destes, a maior parte é queimada para geração de energia para as usinas de açúcar. Entretanto, a viabilidade de novas tecnologias para o aproveitamento destes resíduos, pode gerar além de energia, biocombustíveis e outros químicos de maior valor agregado (PEREIRA JR. *et al*., 2008).

Os resíduos agrícolas e agroindustriais são essencialmente compostos por materiais lignocelulósicos. Este termo é referido como parte da planta que forma a parede celular, composto por estrutura fibrosa, constituída de polissacarídeos como celulose (40 a 60%) e hemicelulose (20 a 40 %) envolvidos por uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas denominada de lignina (15 a 25%) (SUN e CHENG, 2002). De modo geral, podemos dizer que este material tem em sua composição, valiosas moléculas polissacarídicas, formadas por monômeros de glicídios, que podem servir de blocos de construção de diversas substâncias de alto valor agregado.

2.3.1. Celulose

A celulose é o produto primário da fotossíntese em ambiente terrestre, e a mais abundante fonte renovável produzida na biosfera (aproximadamente 100 bilhões de ton/ano em matéria seca) (HOLTZAPPLE, 1993; JARVIS, 2003).

Celulose nativa é um homopolissacarídeo que consiste de resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β-1-4- para formar uma cadeia polimérica linear (Figura 2.13). Na natureza, a cadeia de celulose tem um grau de polimerização de aproximadamente 10000 unidades de glicose em madeira e 15000 em algodão (SJOSTROM, 1981).

A estrutura cristalina da celulose se adere a outras cadeias por ligações de hidrogênio e força de *Van der Waals*, para formar uma estrutura altamente insolúvel. Há também uma região amorfa ou paracristalina pouco ordenada.

A celulose é produzida na forma de microfibrilas em cadeias lineares unidas por ligações de hidrogênio. Cada microfibrila de celulose consiste de aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular (FRY, 1988; EMONS e MULDER, 2000; BRAGATTO, 2007).

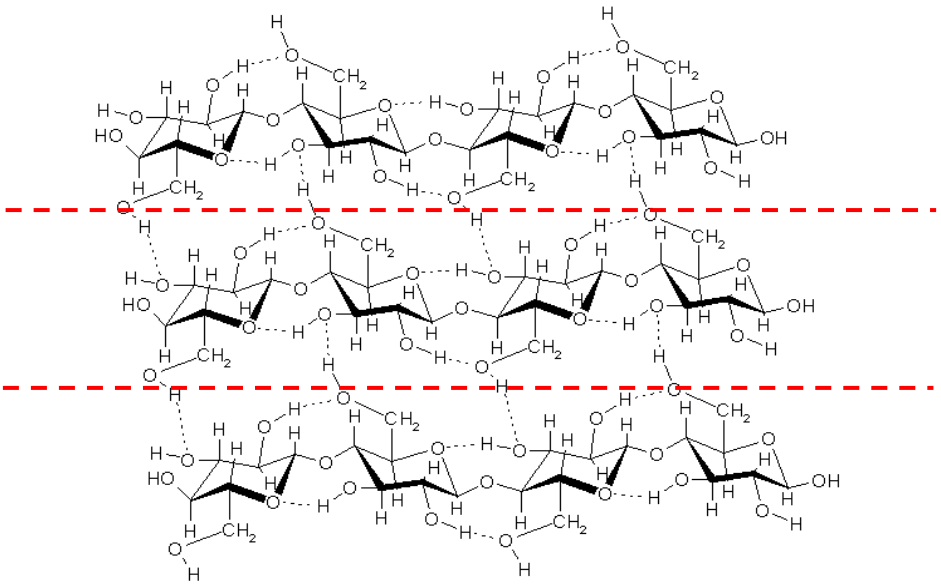


Figura 2.13. Ligações de hidrogênio inter e intra cadeias lineares de celulose, formando estrutura cristalina e ordenada. Fonte: http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/wood/

2.3.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos da parede celular intimamente associadas à celulose. Diferentemente da celulose, que é formada unicamente por monômeros de glicose, as hemiceluloses são polímeros compostos por diferentes monossacarídeos, o que confere a este polissacarídeo um alto nível de complexicidade. Xiloglucanos e galactomananas são as principais hemiceluloses encontradas na parede celular primária (LIMA, 2002). As duas diferem na sua cadeia principal. Xiloglucanos são heteropolímeros compostos por uma cadeia principal formada por unidades de glicose em ligações β-1-4, ramificada com ligações α-(1-6) por unidades de D-xilopiranosídeo ou com o dissacarídeo β-D-galactopiranosideo-(1-2)-D-xilopiranosídeo ou ainda com o trissacarídeo α-L-fucopiranosídeo (1-2) β-D-galatopiranosideo (1-2) α-D-xilopiranosídeo (HAYASHI, 1989). São encontrados principalmente em dicotiledôneas. Já as galactomananas, possuem uma cadeia principal linear formada por manose em ligações β-1-4, ramificada com unidades de galactose. Enquanto as glucuronoarabinoxilanas possuem na sua cadeia principal, xilose, ramificada por ligações α-(1-6) por unidades de ácido glucurônico e α-(1-) com unidades de arabinose. Estas duas últimas hemiceluloses são características da família Poaceae como a cana-de-açúcar. Nas Figuras 2.14 e 2.15 estão esquematizadas as moléculas de hemicelulose xiloglucanas e galactomananas evidenciando a diferença na sua cadeia principal e suas ramificações de acordo com Lima (2002) e Buckeridge (2008).

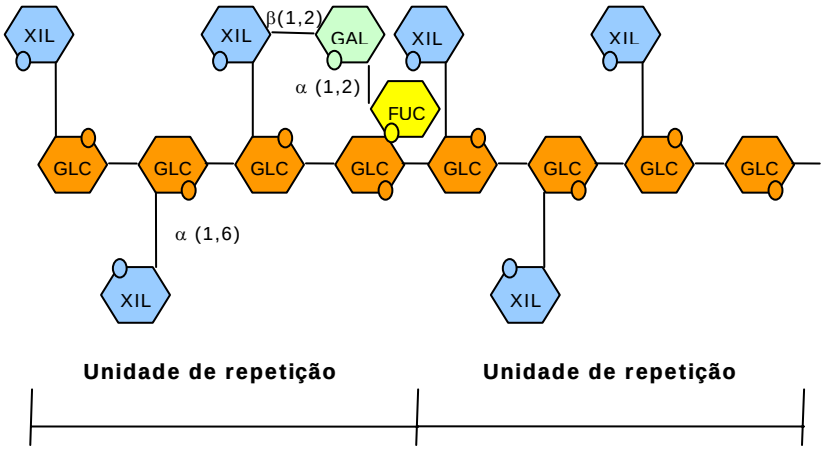


Figura 2.14. Estrutura de xiloglucana, principal hemicelulose de dicotiledôneas. Nota-se uma unidade de repetição com quatro moléculas de glicose, três de xilose e galactose e fucose em proporções variadas. Fonte: Buckeridge (2008).

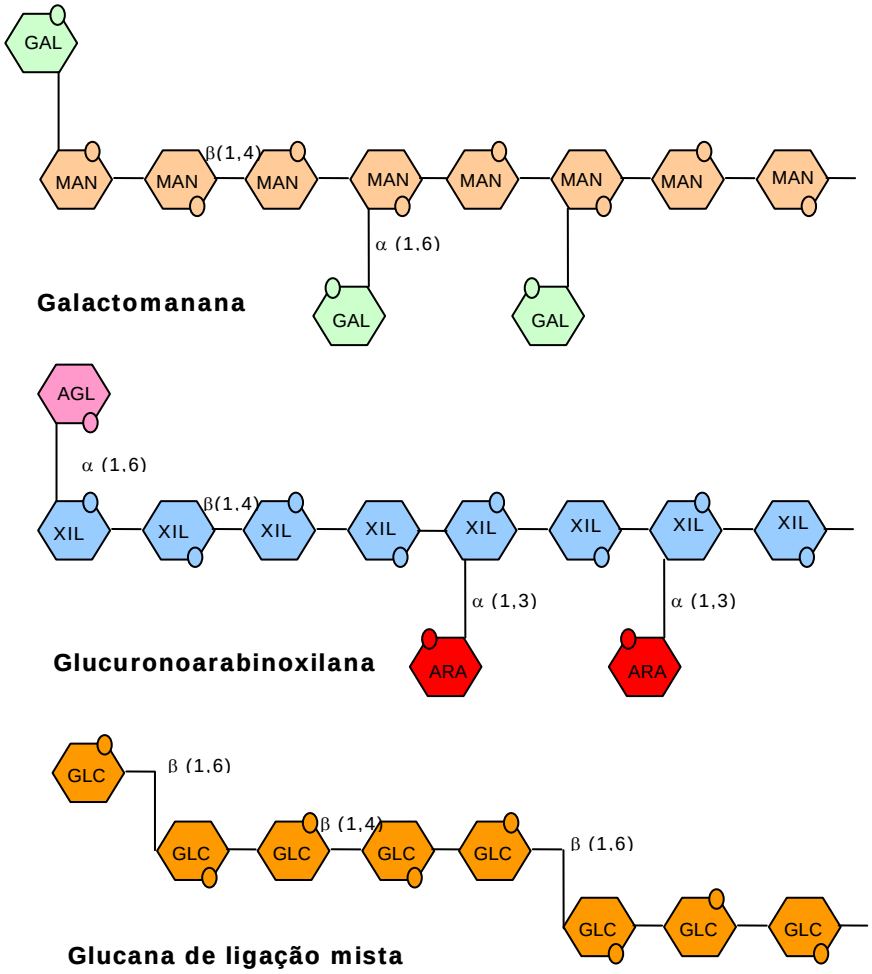


Figura 2.15. Esquema da estrutura de hemicelulose típica de monocotiledôneas. Fonte: Buckeridge (2008).

2.3.3. Interação hemicelulose-celulose

Em vegetais, a parede celular é constituída por agrupamentos macromoleculares heterogêneos, dentre os quais estão polissacarídeos, que representam 80 a 90 % da parede. Os outros componentes incluem proteínas estruturais e catalíticas e compostos fenólicos como a lignina (CARPITA e GILBEAUT, 1993).

As paredes celulares primárias são compostas de um esqueleto de microfibrilas de celulose, denominada de matriz de polímeros, que inclui hemiceluloses, pectinas e proteínas (McCANN e ROBERTS, 1991). As microfibrilas de celulose ficam cobertas por hemiceluloses, que podem estar forte ou fracamente ligadas à celulose através de ligações de hidrogênio. Nos modelos mais recentes de parede celular propõe-se que estes polímeros formem três domínios independentes: celulose-hemicelulose, pectinas e proteínas (McCANN e ROBERTS, 1991; CARPITA e GILBEAUT, 1993). A principal hemicelulose em dicotiledôneas é o xiloglucano e em Poaceae são os glucuronoarabinoxilano e os glucanos de ligação mista.

As hemiceluloses interagem especificamente com a celulose (HAYASHI *et al*. 1987; VINCKEN *et al*. 1995). Tal especificidade ocorre devido à similaridade entre a cadeia principal de ambos os polissacarídeos, sendo que as ramificações com xilose não parecem causar alterações conformacionais suficientes que evitem a interação (LEVY *et al*., 1997). Os autores sugeriram que os resíduos de fucose sejam responsáveis por tornar a molécula mais linear. Além disso, resíduos fucosilados contribuem para o aumento da afinidade e da constante de absorção dos xiloglucanos pela celulose. Este complexo formado é responsável pela resistência à pressão de turgor (pressão externa) e pelo crescimento anisotrópico (REIS *et al*., 1994; BASKIN *et al*., 1999). O comprimento da cadeia da hemicelulose possibilita que uma mesma molécula estabeleça ligações com mais de uma microfibrila de celulose, formando ligações cruzadas entre elas (Figura 2.16), o que aumenta ainda mais a resistência da parede às forças externas (HAYASHI e MACLACHLAN, 1984).

Whitney *et al*. (1995) produziram celulose por cultura de *Acetobacter acetti xylinum* em meio com e sem xiloglucano e verificaram que a organização das fibrilas de celulose foi obtida apenas em película em meio contendo xiloglucano. Isto corrobora com a hipótese de que hemiceluloses auxiliam no alinhamento e na organização das microfibrilas de celulose.

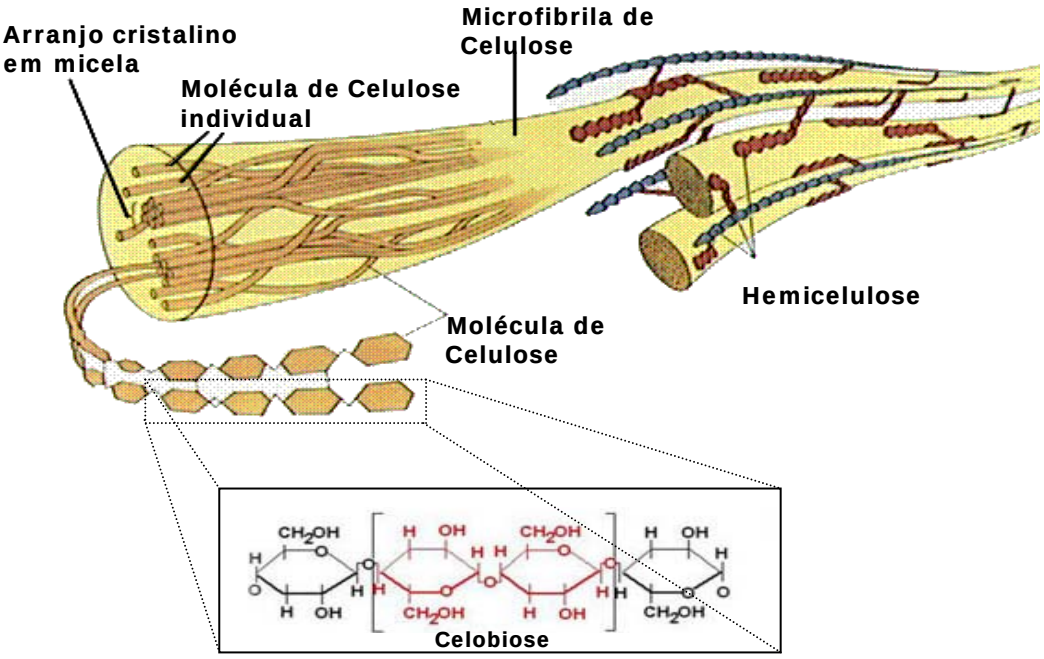


Figura 2.16. Esquema da estrutura da celulose, sua estrutura de repetição, a celobiose e interação com hemicelulose. Estão excluídos os domínios pécticos e protéicos.
Fonte adaptada de: http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/cellulose.gif

2.3.4. Lignina

A lignina, depois dos polissacarídeos, é a macromolécula mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É composta basicamente de unidades fenilpropano formando uma macromolécula tridimencional e amorfa, representando de 20 a 30 % da massa total do material lignocelulósico. O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular ou repetitiva e é sintetizada a partir da reação de três álcoois cinamílicos precursores, álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 2.17), que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas (FENGEL e WEGENER, 1989).

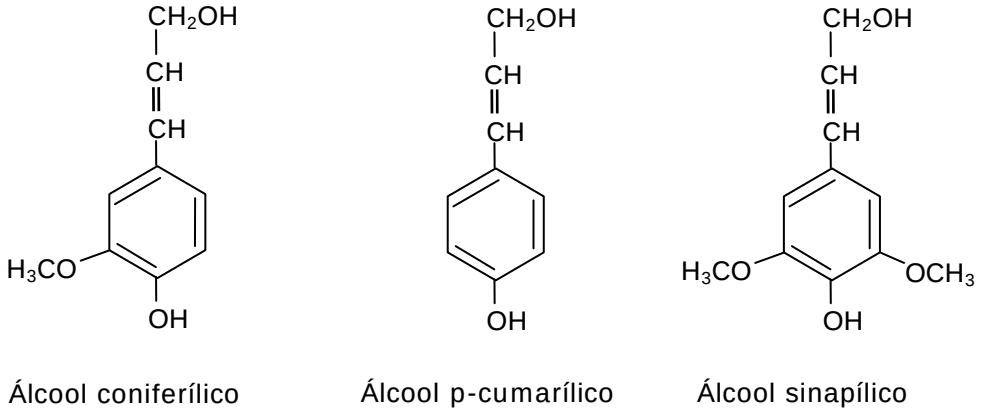


Figura 2.17. Álcoois precursores da biossíntese da lignina.
Fonte: Fengel e Wegener (1989).

A estrutura da lignina varia com a espécie. Certamente, sua estrutura randômica tem como objetivo, além da resistência mecânica, neutralizar ataques enzimáticos. A lignina, de fato, é extremamente difícil de dissociar, reflexo disso é o pouco conhecimento que se tinha a respeito da estrutura química da lignina até a década de 80 (FENGEL e WEGENER, 1989).

Tanto grupos fenólicos, como substituições alquil, podem se ligar a outros monômeros, resultando em uma macromolécula com fortes ligações cruzadas dispostas randomicamente. Além disso, a estrutura química virtualmente garante que produtos intermediários da degradação sejam compostos fenólicos altamente tóxicos, que dão ao vegetal proteção contra ataques por microrganismo.

2.4. Biotecnologia para produção de etanol de segunda geração

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). Outras tecnologias estão avançando no sentido de se reduzirem etapas e tornar o processo mais econômico. Estas são denominadas de SSCF (sacarificação simultânea à cofermentação) e a concepção mais integrada de operação, o BPC (bioprocesso consolidado).

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 operação, reduz-se os conhecidos fenômenos de inibição das enzimas que

compõem o pool celulásico, 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 (OLOFSSON *et al*., 2008; PEREIRA JR. *et al*., 2008; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

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 (30-37ºC). 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 ao sólido residual da hidrólise (OLOFSSON *et al*., 2008; PEREIRA JR. *et al*. (2008); CASTRO e PEREIRA JR. 2010).

Considerando-se globalmente a conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol, a seção de conversão da planta pode ainda ser constituída por uma etapa para fermentação de pentoses, majoritariamente xilose, provenientes da fração hemicelulósica das matérias-primas. À realização da fermentação de pentoses e hexoses (glicose) em apenas um vaso reacional dá-se o nome de co-fermentação. A condução da co-fermentação concomitantemente à hidrólise das frações celulósica e/ou hemicelulósica compreende o processo SSCF (sacarificação simultânea à co-fermentação). Por fim, na forma mais integrada de condução das etapas de conversão, nomeada Bioprocesso Consolidado (BPC), a produção enzimática, hidrólise da celulose e hemicelulose e a fermentação da glicose e xilose, acontecem em um mesmo equipamento (PEREIRA JR. *et al*., 2008; CASTRO e PEREIRA JR. 2010).

Os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos da UFRJ tem domínio sobre a tecnologia e produção de etanol por processo SSF, embora outras concepções sejam atualmente sendo estudadas. No entanto, para a aplicação do preparado enzimático obtido no presente estudo, adotou-se a estratégia SSF, a qual

será melhor detalhada nos itens seguintes, apontando os pontos importantes desta tecnologia de produção de etanol de segunda geração.

2.4.1. Conceito de SSF

A idéia de realizar a hidrólise e fermentação simultânea foi proposta por Gaus *et al*. (1976) em uma patente. Os autores afirmavam que o rendimento de glicose em hidrólise enzimática separado era baixo, possivelmente devido à inibição pelos produtos glicose e celobiose. Os autores, no entanto, mostraram que se podia obter altos rendimentos de etanol quando se fazia uso do processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), e atribuíram esse bom rendimento à remoção de glicose e celobiose no processo fermentativo associado.

A remoção dos produtos de inibição da hidrólise enzimática é ainda provavelmente a mais importante razão para o uso do processo SSF. Porém, existem muitas outras vantagens potenciais. Gauss *et al*. (1976) mencionam a vantagem, do processo SSF, de que a glicose não precisa ser separada da fração lignina, na sequência de etapa de hidrólise enzimática em separado, evitando assim, uma perda potencial de açúcar. Além disso, a combinação de hidrólise e fermentação diminui o número de biorreatores necessários e, assim, custos de investimento. Essa redução do capital de investimento foi estimada em 20 %.

Inevitavelmente, há também as desvantagens do processo SSF em comparação à hidrólise e fermentação em separado (SHF). A temperatura ótima para hidrólise enzimática é geralmente maior do que a da fermentação. Em um processo SHF, a temperatura de hidrólise enzimática pode ser otimizada, independentemente da temperatura de fermentação, enquanto que no processo SSF a temperatura é limitada pela tolerância da levedura, agente de fermentação. Além disso, a levedura não pode ser reutilizada em um processo SSF, devido aos problemas de se separar a levedura do sólido residual após fermentação. As enzimas são igualmente de difícil reutilização em ambos os processos, já que se ligam aos substratos, embora possa ocorrer dessorção parcial, após uso de susfactantes (OLOFSSON *et al*. 2008). Entretanto, a enzima adsorvida na fração lignina é perdida, pois se trata de uma ligação improdutiva irreversível (ERIKSSON et al., 2002).

A disponibilidade de matérias-primas lignocelulósicas varia dependendo da localização geográfica e são bastante heterogêneas em termos de estrutura e composição química. Essa heterogeneidade tem um forte impacto sobre o designer do processo, ou seja, a manipulação mecânica do material e as condições de pré-tratamento.

A Figura 2.18 mostra uma representação esquemática de um processo SSF, segundo Olofsson *et al*. (2008). Neste esquema, a matéria-prima passa por um pré-tratamento e a celulignina resultante é utilizada para produção de celulases (que será utilizada posteriormente no processo SSF) e no processo SSF para produção de etanol.

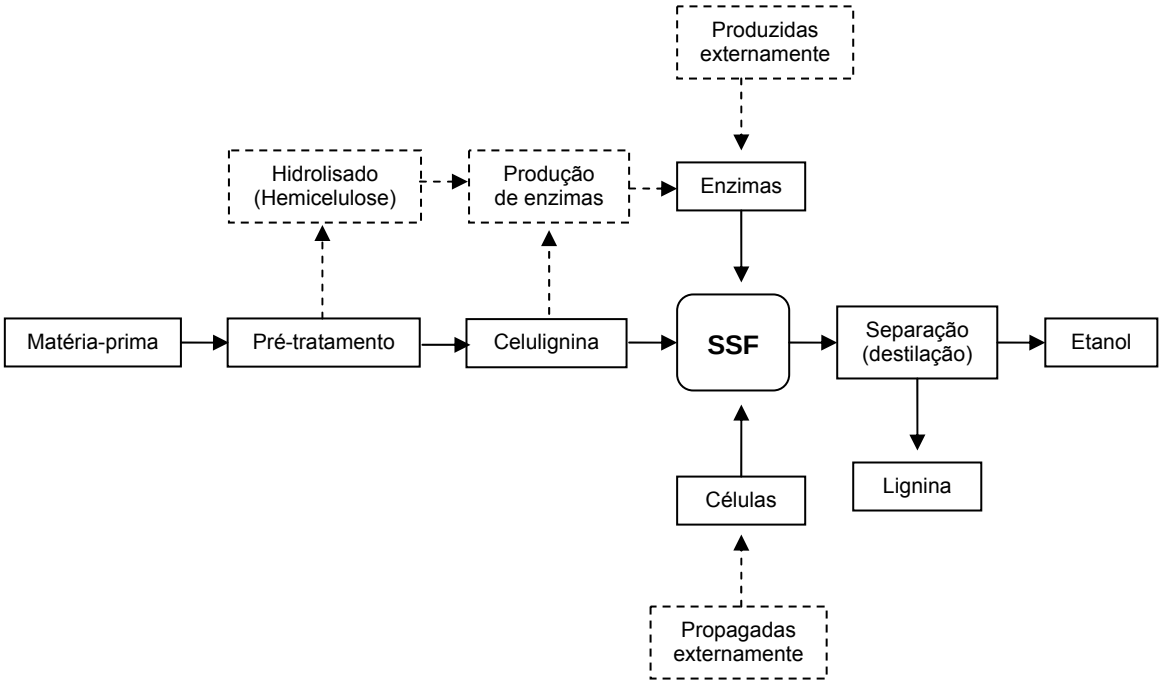


Figura 2.18. Representação esquemática de um processo SSF.
Fonte: Olofsson et al. (2008).

2.4.2. Pré-tratamento do material lignocelulósico

O propósito do pré-tratamento é principalmente alterar a estrutura do material lignocelulósico, aumentando a acessibilidade de glucanas e xilanas ao ataque enzimático e assim, aumentar a taxa de hidrólise da celulose nos processos SSF. Esta etapa deve ser realizada com formação mínima de compostos inibidores das leveduras durante a fermentação (ALMEIDA *et al*., 2007). A área superficial acessível é considerada como um dos fatores mais importantes na eficiência da

degradação enzimática da celulose (GHARPURAY *et al*., 1983; GRETHLEIN, 1985). O pré-tratamento aumenta a área disponível de várias formas (DONALDSON *et al*., 1988; DONALDSON, 1988; BROWNELL e SADDLER, 1984):

1. Formação de fragmentos e "trincas", aumentando a área superficial;
2. A fração hemicelulose é hidrolisada, diminuindo a barreira física à celulose;
3. A lignina também sofre mudanças estruturais e o material lignocelulósico é deslignificado em diferentes níveis dependendo da tecnologia de pré-tratamento empregada;
4. Alterações na cristalinidade e do grau de polimerização.

O pré-tratamento do material lignocelulósico é recomendado também quando se pretende a produção de enzimas (OLOFSSON *et al*., 2008). Com este tratamento, o substrato se torna mais acessível ao microrganismo, promovendo seu desenvolvimento e secreção das enzimas ao meio extracelular.

Vários métodos de pré-tratamento podem ser aplicados, a saber: biológico, físico, químico e físico-químico. A Tabela 2.10 mostra os efeitos de diferentes tecnologias de pré-tratamentos na estrutura de material lignocelulósico.

Tabela 2.10. Efeito de diferentes tecnologias na estrutura de lignocelulósicos.

	Moagem	Explosão a vapor	Água líquida a 140-160°C	Ácido	Alcalino	Explosão com amônia	Explosão com CO_2
Aumento da área da superfície acessível	A	A	A	A	A	A	A
Diminuição da cristalinidade	A	-	n.d.	-	-	A	-
Solubilização da hemicelulose	-	A	A	A	B	M	A
Remoção da lignina	-	M	B	M	M	A	-
Geração de compostos tóxicos	-	A	B	A	B	B	-
Alteração da estrutura da lignina	-	A	M	A	A	A	-

A: alto efeito, M: efeito moderado, B: baixo efeito, n.d.: não determinado. Fonte: Olofsson *et al.*, 2008.

2.4.3. Hidrólise enzimática e fatores limitantes

Um pré-tratamento bem sucedido remove parcialmente a hemicelulose e lignina, deixando a celulose mais acessível à hidrólise. Uma vez que os microrganismos mais comumente usados para produção de etanol utilizarão exclusivamente monômeros de açúcar, a celulose precisa ser hidrolisada concomitantemente à fermentação (OLOFSSON *et al*. 2008). Como já visto, a fase de hidrólise enzimática é realizada por celulases, cujos diferentes grupos (exoglucanase, endoglucanase e β-glucosidase) agem sinergicamente. Esta etapa do processo SSF pode ser influenciada pelo produto da fermentação. O etanol pode inibir a hidrólise enzimática, porém, em menor extensão, quando comparado à inibição pelos produtos da ação enzimática, glicose ou celobiose (HOLTZAPPLE *et al*., 1990).

Além da inibição pelo produto final, pode ocorrer perda de atividade das enzimas que compõem o pool celulásico, com o tempo de exposição à elevada temperatura na fase de pré-hidrolise enzimática, que antecede o processo SSF; adsorção improdutiva da enzima à lignina remanescente; ou, diminuição da disponibilidade de cadeias celulósicas acessíveis, devido à própria cinética enzimática, na qual a velocidade de reação é dependente da concentração de substrato (ZHANG e LYND, 2004; HOLTZAPPLE *et al*., 1990).

Em uma SSF industrial, as concentrações de enzimas e células podem ser apropriadamente balanceadas de modo a minimizar os custos com produção de levedura e enzimas. A sinergia entre as enzimas também deve ser otimizada, avaliando-se a composição da mistura enzimática (HOLTZAPPLE *et al*., 1990).

Os principais fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose em matérias-primas lignocelulósicas podem ser divididos em dois grupos: fatores relacionados à enzima e fatores relacionados ao substrato, sendo que os dois grupos estão interrelacionados durante o processo de hidrólise (ALVIRA *et al*., 2010).

A redução da severidade do pré-tratamento é muitas vezes necessária para reduzir os custos econômicos. Entretanto, baixo fator de severidade resulta em menor liberação de açúcares e, consequentemente, altas quantidades e diferentes tipos de enzimas podem ser necessários para alcançar altos rendimentos de

açúcares. Neste contexto, o desenvolvimento de preparados celulásicos contendo hemicelulases e outras enzimas acessórias são necessárias para completa degradação dos componentes lignocelulósicos (ALVIRA *et al*., 2010). Estudos recentes mostram a importância de complexos enzimáticos balanceados contendo combinações ótimas para modificar efetivamente a complexa estrutura de materiais lignocelulósicos (GARCÍA-APARICIO *et al*., 2007; MERINO e CHERRY, 2007). De acordo com Olofsson *et al*. (2008), dentre os fatores relacionados ao substrato que limitam a hidrólise, podemos destacar:

- Índice de cristalinidade da celulose (CrI)
- Grau de polimerização (PD)
- Área superficial
- Lignina (concentração e distribuição)
- Hemicelulose (concentração)
- Tamanho de partícula
- Porosidade
- Espessura da parede celular

2.4.4. Microrganismos produtores de etanol de segunda geração

O requerimento geral do organismo para ser usado na produção de etanol é que este deve apresentar um alto rendimento de produto, alta produtividade e ser capaz de resistir a altas concentrações de etanol, a fim de manter os custos baixos de destilação (VON SIVERS e ZACCHI, 1996). Além destes requisitos, a tolerância a inibidores, a tolerância a altas temperaturas e baixos valores de pH também são importantes. O microrganismo mais utilizado é a levedura *S. cerevisiae*, que produz etanol a um elevado rendimento (superior a 0,45 $g.g^{-1}$) e uma taxa específica elevada (até 1,3 $g.g^{-1}$ de massa celular.h^{-1}), além de apresentar boa tolerância ao etanol (acima de 100 g/L). Além disso, esta levedura tem se mostrado robusta para outros inibidores, sendo, portanto, adequada para a fermentação de materiais lignocelulósicos (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1993).

Outro microrganismo freqüentemente utilizado em estudos com SSF é a bactéria *Zymomonas mobilis*. O interessante neste organismo é que o mesmo utiliza a via de *Entner-Doudoroff*, a qual resulta em uma baixa produção de ATP por glicose catabolizada, quando comparada com a clássica via glicolítica (*Embden-Meyerhof-Parnas*) (SWINGS, 1977). Isto se reflete no baixo rendimento de células e alto

rendimento de etanol quando comparado com *S. cerevisiae*. No entanto, linhagens de *Z. mobilis* selvagens não têm a capacidade de fermentar pentoses e um grande inconveniente é que não é um microrganismo muito robusto. Em geral as bactérias parecem ser menos tolerantes a inibidores derivados de material lignocelulósico e uma etapa de destoxificação pode ser necessária antes da fermentação (HAHN-HÄGERDAL *et al*., 2007).

2.4.5. Carga enzimática

A carga enzimática certamente é de grande importância para a economia do processo, mas o efeito econômico da carga enzimática em processos SSF é difícil de prever devido às grandes incertezas dos custos das enzimas e da falta de dados experimentais suficientes sobre o efeito da carga enzimática. Cálculos técnico-econômicos indicam que uma redução de 50% da carga enzimática é vantajosa se a redução do rendimento for menor que 6 a 7% e o tempo de fermentação não aumentar acima de 30% (SASSNER *et al*., 2007).

A hidrólise enzimática da fração sólida tem grande controle sobre a taxa de produção de etanol (LINDE *et al*., 2007). As preparações celulásicas disponíveis hoje, muitas vezes necessitam de suplementação com β-glucosidase extra para evitar a inibição do produto final por celobiose (VASQUEZ, 2007; OLOFSSON *et al*., 2008).

2.4.6. Carga de substrato

A fim de alcançar altas concentrações de etanol, uma elevada carga de substrato é crucial para a economia do processo SSF. O modo em batelada é a forma clássica dos processos SSF. Porém, neste modo de operação, quando o conteúdo de sólidos em SSF é aumentado, a produção de etanol tende a diminuir. Na prática, é difícil alcançar bons rendimentos de etanol em processos SSF contendo acima de 10% de sólidos (OLOFSSON *et al*. 2008). Na Figura 2.19 estão apresentados os efeitos da carga de sólidos, enzima e células no rendimento de etanol em processo SSF conduzido em batelada simples, reportado por Olofsson *et al*. (2008).

Ao invés de adicionar todo o sólido no início do processo, pode ser realizada alimentação gradual. Existem algumas vantagens quando se faz uso do processo SSF em batelada alimentada. Com a adição gradual de sólidos, os níveis de

inibidores podem ser mantidos baixos, ocasionando menor inibição da fermentação. A taxa de alimentação adequada pode permitir a contínua conversão de inibidores. A agitação é um problema a ser considerado em processos com altos níveis de sólidos, o que resulta em problemas de transferência de massa e calor. Isto se torna menos pronunciado com batelada alimentada devido à hidrólise gradual das fibras adicionadas (BALLESTEROS *et al*., 2005; RUDOLF *et al*., 2005).

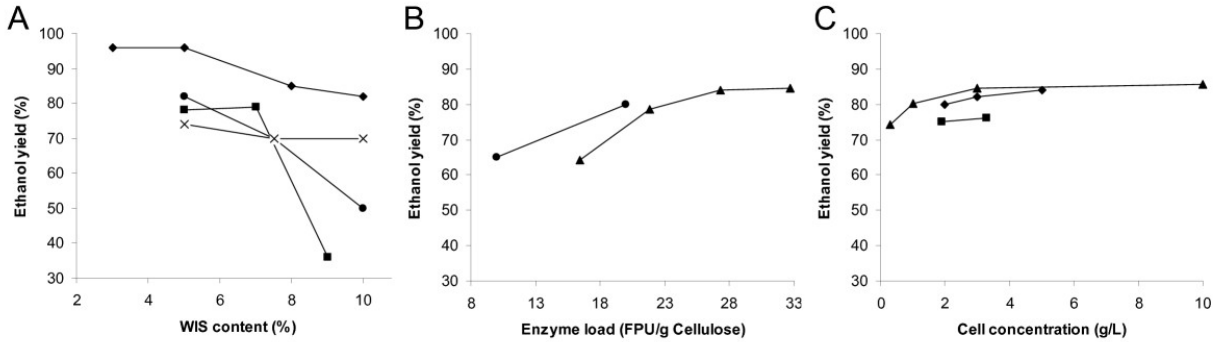


Figura 2.19. Influência da carga de sólidos (**A**), enzimas (**B**) e concentração de células (**C**) no rendimento de etanol em processo SSF de diferentes materiais lignocelulósicos: palha de cevada pré-tratado (círculo), abeto pré-tratado (losângulo), salix pré-tratado (quadrado), salgueiro pré-tratado (triângulo) e sabugo de milho pré-tratados (×). WIS: sólidos insolúveis em água

2.4.7.Biomassa celular (tamanho de inóculo)

Em processo SSF em larga escala, após inoculação com a levedura, ou outro agente fermentativo, propagados externamente (Figura 2.18), há aspectos que necessitam de particular atenção para se garantir o bom êxito dos processos envolvidos (enzimático e fermentativo). Assim, uma maior concentração de células no processo SSF irá resultar em maior produtividade volumétrica em etanol e maior rendimento do processo; no entanto, esta maior taxa de produção de etanol poderá estar limitada caso a taxa de hidrólise enzimática não atenda à taxa de consumo de glicose pela levedura. Desta forma, é imperioso definir estratégias para que a taxa de produção de etanol não esteja limitada pela taxa de hidrólise. Esta é, provavelmente, a razão de se verificar na literatura sobre este tema valores reduzidos de produtividade volumétrica em etanol, já que a maioria dos trabalhos reporta baixas concentrações de células, devido às reduzidas cargas enzimáticas utilizadas (RUDOLF *et al*., 2005; SASSNER *et al*., 2006; SASSNER *et al*., 2007).

Sendo assim, não se verifica uma forte correlação entre a concentração de células e a produção de etanol, sendo as concentrações de células utilizadas da ordem de 1 a 2 g/L para condições típicas de SSF (10 % de sólidos e 30 FPU/g) (OLOFSSON *et al*. 2008).

2.4.8. Breve sumário de produção de etanol por processo SSF de hexoses

Na Tabela 2.11 estão apresentadas as condições dos processos SSF realizados por diversos autores. Estão apresentados os tipos de matéria-prima, o pré-tratamento aplicado, concentração de sólidos, temperatura, linhagem do agente fermentativo, concentração de etanol, rendimento e modo de operação. Verifica-se que inúmeras são as estratégias adotadas para produção de etanol de segunda geração, variando-se os as formas de preparo da matéria-prima (pré-tratamentos), espécies e linhagens de microrganismos fermentadores e modo de operação do processo.

De acordo em Vasquez (2007), a concentração de sólidos em um processo SSF para produção de etanol, é o fator limitante. Sendo assim, um aumento da concentração de sólidos faz-se necessário para um aumento da produção deste biocombustível. Entretanto, verifica-se uma característica recorrente entre os diversos trabalhos citados na Tabela 2.11, que é a baixa concentração de sólidos no processo, mesmo em processos conduzidos em batelada alimentada. Dessa forma, a concentração de etanol fica relativamente baixa ao final do processo. Outro fato importante a se observar são os prolongados tempos de processo, ocasionando baixas produtividades volumétricas em etanol. Este é um aspecto importante a ser trabalhado uma vez que baixas produtividades aumentam os custos de produção devido ao tempo de operação de biorreatores.

Tabela 2.11. Sumário de experimentos com SSF encontrados na literatura.

Matéria-prima	Pré-tratamento	Concentração de sólidos	Temp (°C)	Microrganismo	Tempo (h)	Etanol final (g L^{-1})	Modo de operação	Referências
Palha de cevada	Vapor	7.5%	35	*S. cerevisiae*	120	22,4	Biorreator em Batelada	Linde *et al*. (2007)
Salix (Salgueiro)	Vapor	9%	37	*S. cerevisiae*	78	32	Biorreator em Batelada	Sassner et al. (2006)
Salix (Salgueiro)	Vapor	11%	37	*S. cerevisiae*	120	33	Batelada alimentada	Sassner et al. (2006)
Conífera	Vapor	10%	37	S. *cerevisiae*	72	44,5	Biorreator em Batelada	Rudolf *et al*. (2005)
Conífera	Vapor	6–10%	37	S. *cerevisiae*	72	44,5	Batelada alimentada	Rudolf *et al*. (2005)
Poplar	Vapor	10% m/v	42	*Kluyveromyces fragilis* CECT 10875	160	19,0	Frascos agitados	Ballesteros *et al*. (2004)
Eucalipto	Vapor	10% m/v	42	*K. fragilis* CECT 10875	160	17,0	Frascos agitados	Ballesteros *et al*. (2004)
Palha de trigo	Vapor	10% m/v	42	*K. fragilis* CECT 10875	160	18,1	Frascos agitados	Ballesteros *et al*. (2004)
Bagaco de sweet sorgo	Vapor	10% m/v	42	*K. fragilis* CECT 10875	160	16,2	Frascos agitados	Ballesteros *et al*. (2004)
Papelão	Nenhum	6 %	40	*K. fragilis*	72	14,1	Frascos agitados	Kádár *et al*. (2004)
Papelão	Nenhum	6 %	40	*S. cerevisiae*	72	14,2	Frascos agitados	Kádár *et al*. (2004)
Solka floc	Nenhum	6 %	40	*S. cerevisiae*	72	16,6	Frascos agitados	Kádár *et al*. (2004)
Solka floc	Nenhum	6 %	40	*K. fragilis*	72	17,8	Frascos agitados	Kádár *et al*. (2004)
Populus	Ácido sulfúrico diluído	7.5% m/v celulose	37	*S. cerevisiae*	192	36,6	Biorreator em Batelada	Spindler *et al*. (1991)

Tabela 2.11. Sumário de experimentos com SSF encontrados na literatura (Cont.).

Matéria-prima	Pré-tratamento	Concentração de sólidos	Temp (°C)	Microrganismo	Tempo (h)	Etanol final (g L^{-1})	Modo de operação	Referências
Folha de *Antigonum leptopus*	Alcalino + H_2O_2	10% m/v	43	*K. fragilis*	96	27	Frascos agitados	Hari Krisna *et al*. (2001)
Folha de *Antigonum leptopus*	Alcalino + H_2O_2	10% m/v	40	*S. cerevisiae*	96	21	Frascos agitados	Hari Krisna *et al*. (2001)
Palha de cana	Alcalino + H_2O_2	10% m/v	43	*K. fragilis*	96	28	Frascos agitados	Hari Krisna *et al*. (2001)
Palha de cana	Alcalino + H_2O_2	10% m/v	40	*S. cerevisiae*	96	22	Frascos agitados	Hari Krisna *et al*. (2001)
Willow (Salix caprea QO82)	Vapor	10% matéria seca	37	*S. cerevisiae*	72	28,7	Biorreator em Batelada	Eklund e Zacchi (1995)
Willow (Salix caprea QO82)	Vapor	10% matéria seca	37	*Z. mobilis*	72	27,9	Biorreator em Batelada	Eklund e Zacchi (1995)
Switchgrass	Ácido sulfúrico diluído	7.5% m/v celulose	37	Cultura mista de *S. cerevisiae e B. clausenii*	120	37,0	Frascos agitados	Wyman *et al*. (1992)
Sabugo de milho	Ácido sulfúrico diluído	7.5% m/v celulose	37	*S. cerevisiae*	120	39,1	Frascos agitados	Wyman *et al*. (1992)
Palha de milho	Ácido sulfúrico diluído	7.5% m/v celulose	37	*S. cerevisiae*	120	39,1	Frascos agitados	Wyman *et al*. (1992)
Palha de trigo	Ácido sulfúrico diluído	7.5% m/v celulose	37	*S. cerevisiae*	120	38,3	Frascos agitados	Wyman *et al*. (1992)

2.5. Considerações gerais

A utilização efetiva dos materiais lignocelulósicos em processos biotecnológicos esbarra em dois obstáculos principais: a associação celulose-hemicelulose-lignina, que é uma barreira natural à degradação enzimática e microbiana desses materiais e a estrutura cristalina da celulose, resistente à hidrólise. Adicionalmente, a hidrólise ácida da celulose apresenta o inconveniente de requerer elevadas temperaturas e pressão, levando à destruição de parte dos carboidratos e à obtenção de produtos de degradação tóxicos aos microrganismos (JACOBSEN e WYMAN, 2000). A sacarificação enzimática, por sua vez, requer o emprego de pré-tratamentos físicos (moagem, aquecimento, irradiação) ou químicos (ácido sulfúrico, ácido fosfórico, álcalis), para atingir rendimentos viáveis.

Os avanços nessa área sinalizam que, seguramente, o aproveitamento de matérias-primas renováveis, incluindo os seus resíduos, poderá reverter a dependência energética do petróleo. As tecnologias de produção de etanol de matérias-primas açucaradas e amiláceas estão comercialmente estabelecidas. O próximo passo é o aproveitamento da celulose e da hemicelulose, que, juntas, representam, aproximadamente, 60 a 70% em massa seca dos materiais lignocelulósicos. Existe, entretanto, a necessidade da etapa de pré-tratamento e do equacionamento do uso das correntes de açúcares com seis e cinco carbonos resultantes das operações de pré-tratamento e hidrólise dos polissacarídeos e do uso da lignina. No que tange ao aproveitamento de celulose, existem universos industriais distintos. O processo com mais chances de sucesso, em curto prazo, no Brasil, deverá respeitar as características do parque industrial já instalado, associando as novas tecnologias àquelas tradicionais. Verifica-se tendência à integração das etapas de hidrólise e fermentação para produção de etanol. O Brasil encontra-se em uma posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral da biomassa e seguir sua vocação natural para desenvolvimentos nessa temática.

Capítulo 3

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A crescente demanda por energia no mundo e os inconvenientes da queima de combustíveis fósseis, além das frequentes variações no preço do petróleo impulsionaram nos últimos anos a busca por fontes renováveis de energia, a chamada energia limpa. O etanol é um biocombustível que se encaixa neste conceito, no entanto, para atender a crescente demanda, faz-se necessária a busca por matérias-primas alternativas às fontes sacaríneas e amiláceas. Sendo assim, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, como bagaço de cana, vem ganhando espaço nas pesquisas em todo o mundo para produção de etanol de segunda geração. O Brasil tem avançado no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol de segunda geração, no entanto, a sustentabilidade deste processo é dependente da imperiosa redução de custos de produção, incluindo os custos com insumos. Um dos gargalos tecnológicos identificados para se viabilizar a tecnologia de produção do etanol de segunda geração relaciona-se ao custo com as celulases e uma das propostas para se alcançar este fim é a produção desses biocatalisadores de forma dedicada (*dedicated production*). Sendo assim, esta pesquisa teve os seguintes objetivos:

Objetivo Geral

Desenvolver um bioprocesso para produção de celulases por *Penicillium funiculosum* por fermentação submersa, utilizando bagaço de cana pré-tratado como substrato e avaliar a utilização do preparado celulásico em processo de sacarificação e fermentação simultâneas para produção de etanol de segunda geração.

Objetivos Específicos

- Caracterizar o bagaço e a celulignina obtida após pré-tratamento ácido e alcalino do bagaço de cana-de-açúcar em termos de seus constituintes principais;
- Otimizar o meio de cultivo (fontes de nitrogênio) para produção de celulases a partir da celulignina de bagaço de cana, em frascos agitados;
- Produzir celulases em biorreator de bancada: avaliação do tipo e tamanho de pré-inóculo;
- Avaliar a hidrólise de celulignina de bagaço de cana com diferentes níveis de deslignificação e o efeito de substâncias adsorventes no rendimento de hidrólise;
- Avaliar métodos (rotaevaporador à vácuo e membranas) para concentrar o extrato bruto enzimático;
- Avaliar a estabilidade da enzima nas temperaturas aplicadas no processo de sacarificação e fermentação simultâneas (37 e 50°C);
- Caracterizar as celulases produzidas quanto aos parâmetros cinéticos (k_m e $V_{máx}$), e estimar as massas moleculares;
- Purificar por cromatografia de troca aniônica e caracterizar as celulases obtidas;
- Identificar as celulases por LC/MS/MS;
- Avaliar a utilização do extrato bruto enzimático concentrado na hidrólise de celulignina de bagaço de cana.
- Aplicar o preparado celulásico em processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) para produção de etanol de segunda geração.

Capítulo 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e padronização do inóculo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *Penicillium funiculosum* ATCC 11797. Este foi mantido em meio ágar batata dextrose (PDA) comercial da marca Criterion e os esporos conservados em glicerol 20% a 4 °C em microtubos.

A cada experimento foi realizada ativação do microrganismo em meio PDA a fim de garantir a padronização do inóculo em todos os experimentos e reduzir os riscos de modificação genética ocasionada por repiques sucessivos. Na Figura 4.1, observa-se os aspectos macroscópicos do fungo crescido em ágar batata dextrose e aspectos microscópicos do fungo em microcultivo, observado em microscópio óptico (Leica, modelo DM2000) a um aumento de 1000x. Para o preparo do inóculo, esporos com no máximo 10 dias foram inoculados (10^6 esporos/mL) em meio de Mandels e Weber (1969) em todos os ensaios de otimização do meio.

O meio (200 mL) foi adicionado em frasco Erlenmeyer de 500 mL, esterilizado a 110 °C por 20 min e, após resfriamento, inoculado com esporos, incubado a 30 °C

e agitado a 200 rpm por 48h. Após este período, o meio contendo micélio foi utilizado como inóculo a uma proporção de 5% (v/v) do meio de produção de celulases.

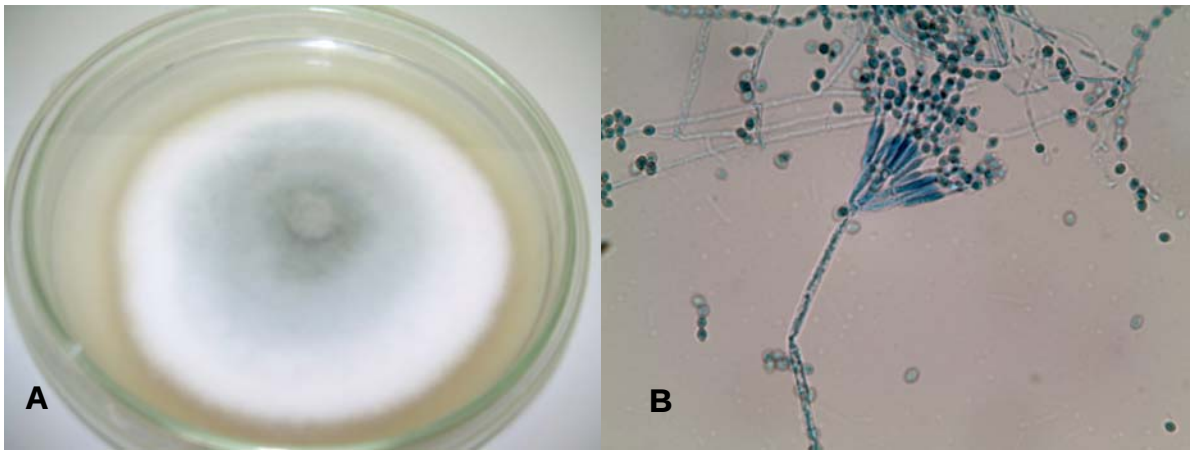


Figura 4.1. Aspecto macroscópico do fungo *Penicillium funiculosum* em meio PDA (A) e aspecto microscópico em microcultivo (B).

4.2. Pré-tratamento do bagaço

Visando aumentar a acessibilidade do microrganismo ao substrato, removendo-se parcialmente as frações hemicelulose e lignina, o bagaço passou por um tratamento ácido com solução de ácido sulfúrico 1 % v/v a 121 °C/45 min de acordo com método otimizado por Betancur (2005) e, posteriormente, por um tratamento alcalino com solução de hidróxido de sódio 4 % m/v a 121 °C/30 min, conforme método estabelecido por Vásquez *et al*. (2006). Na Figura 4.2, observa-se o aspecto do bagaço nas diferentes etapas do pré-tratamento. O material resultante foi denominado de *celulignina* parcialmente deslignificada (Figura 4.2 D), a qual foi utilizada para todos os experimentos.

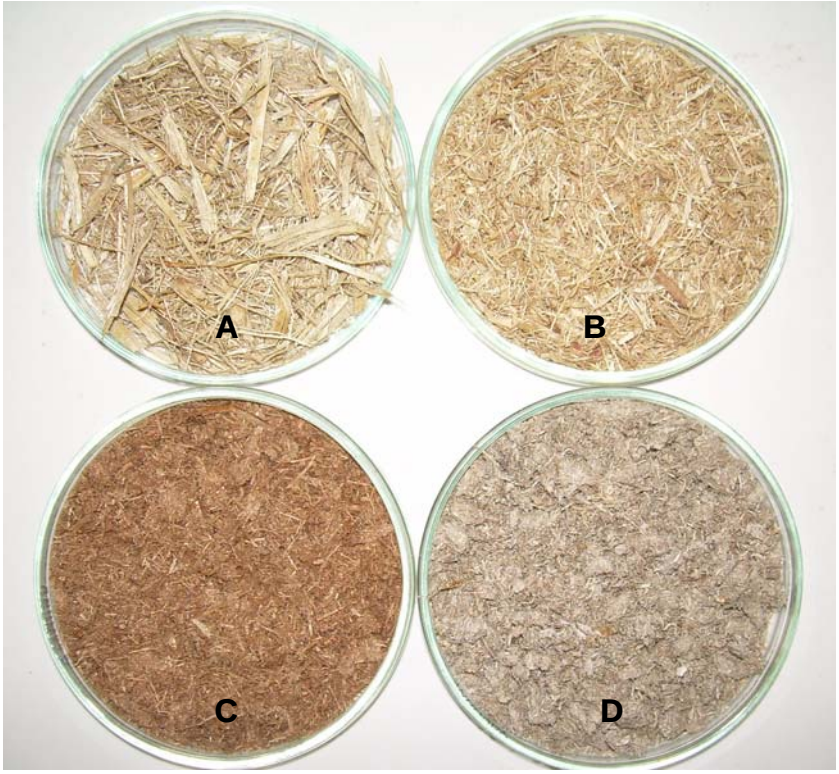


Figura 4.2. Aspecto do bagaço em diferentes etapas do pré-tratamento. (A) bagaço de cana seco; (B) bagaço cominuído; (C) após pré-tratamento com ácido sulfúrico 1% (v/v); (D) após pré-tratamento com hidróxido de sódio 4 % (m/v).

4.3. Caracterização do bagaço de cana e celulignina

O bagaço de cana-de-açúcar foi proveniente da empresa Dedini SA. O bagaço de cana e a celulignina foram caracterizados por gravimetria e cromatografia líquida (HPLC), conforme os procedimentos descritos a seguir.

O bagaço de cana foi cominuído em moinho (MF10 Basic, marca IKA®) e as partículas padronizadas com uso de peneira de abertura 0,5 mm. Posteriormente foi realizada a hidrólise química, utilizando ácido sulfúrico 72 % (m/m) em tubos de ensaio por 1 h a 30 °C. Após este período, o ácido foi diluído para 4 % com água deionizada e então, o bagaço com solução ácida foi autoclavado por uma hora a 121 °C. O hidrolisado foi filtrado em cadinhos de vidro tipo Gooch nº 3 (previamente calcinado a 550 °C e pesado) e o resíduo foi lavado com água destilada para remover todo o hidrolisado. Os cadinhos com resíduo seco (lignina klasson) foram pesados e calcinados em mufla a 550 °C por 5 h, resfriados e pesados. O hidrolisado foi neutralizado para pH 5,5 a 6,0 e filtrado.

A partir do filtrado, foram determinados os teores de açúcares redutores totais pelo método de DNS, segundo Miller (1959) e glicose por HPLC, em coluna HPX87. As concentrações de celulose, hemicelulose, lignina e cinza foram determinadas conforme as equações abaixo (SLUITER *et al*. 2005; VERVERIS *et al*. 2007).

$$Celulose\ (\%\ m/m) = \frac{0{,}90}{0{,}96} \cdot C1 \cdot \frac{v}{m} \cdot \alpha \cdot 100$$ Equação 1

Onde,

$0{,}90$ = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de glicose;

$0{,}96$ = Rendimento de sacarificação da celulose a glicose

$C1$ = Concentração de glicose (g/L)

v = Volume total da solução de açúcar (L)

m = massa da amostra seca (g)

$\propto$ = diluição da amostra (se houver)

$$Hemicelulose\ (\%\ m/m) = \frac{0{,}88}{0{,}93} \cdot (C2 - C1) \cdot \frac{v}{m} \cdot \alpha \cdot 100$$ Equação 2

Onde,

$0{,}88$ = Coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de glicose

$0{,}93$ = Rendimento de sacarificação da xilana a xilose

$C1$ = Concentração de glicose (g/L)

$C2$ = Concentração de açúcares redutores (g/L)

v = Volume total da solução de açúcar (L)

m = massa da amostra seca (g)

$\propto$ = diluição da amostra (se houver)

$$Lignina\ \ (\%\ \ m/m) = \frac{W1 - W2}{m} \cdot 100$$ Equação 3

Onde,

$W1$ = Resíduo seco da filtragem (g)

$W2$ = Resíduo após calcinação (g)

m = massa da amostra seca (g)

$$Cinza\ \ (\%\ \ m/m) = \frac{W2}{m} \cdot 100$$ Equação 4

Onde,

$W2$ = Resíduo após calcinação (g)

m = massa da amostra seca (g)

4.4. Avaliação do caráter constitutivo das celulases e papel indutor da celulose na produção de enzimas celulolíticas por *P. funiculosum*

Os microrganismos são capazes de produzir enzimas constitutivamente, ou seja, sem necessidade de um agente indutor, tendo como fonte de carbono a glicose. Para avaliação do caráter constitutivo das celulases; efeito indutor da celulose; e, efeito repressor da glicose, o fungo filamentoso *P. funiculosum* foi crescido em meio de Mandels e Weber (1969) e como fonte de carbono (10 g/L) foram utilizadas glicose, celulose microcristalina e celulignina, em diferentes proporções de acordo com a Tabela 4.1. A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyers de 500 mL, a 30 °C, 200 rpm durante 72 h. Após este período quantificou-se as atividades das celulases.

Tabela 4.1. Composição percentual da fonte de carbono utilizada para produção de enzimas celulolíticas por P. funiculosum. Grupo 1, com celulose microcristalina e Grupo 2 com celulose de celulignina.

	Fonte de carbono	**Proporção (%)**				
Grupo 1	Celulose microcristalina	0	25	50	75	100
	Glicose	100	75	50	25	0
Grupo 2	Celulose de celulignina	0	25	50	75	100
	Glicose	100	75	50	25	0

4.5. Produção de celulases por *P. funiculosum*: planejamentos experimentais para otimização da concentração das fontes de nitrogênio

Para produção das enzimas foi utilizado o meio mineral de Mandels e Weber (1969). O experimento foi conduzido em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL de meio sob agitação de 200 rpm à temperatura de 30 ºC. Como fonte de carbono, foi utilizada celulignina parcialmente deslignificada na concentração de 15 g/L.

A maioria dos trabalhos da literatura utiliza como fonte de nitrogênio a uréia, o sulfato de amônio, peptona e extrato de levedura (MANDELS e WEBER, 1969; CASTRO, 2006; CARVALHO, 2007). No entanto, é importante verificar se as concentrações são adequadas, se são realmente imprescindíveis ou se não estão em concentrações inibitórias para o desenvolvimento do microrganismo e/ou para produção de enzimas do complexo celulásico.

Para otimização da concentração das fontes de nitrogênio foi escolhido o método de planejamentos de experimentos seqüenciais. O Planejamento 1 foi estruturado fatorial completo com quatro fontes de nitrogênio em dois níveis e três repetições do ponto central, totalizando 19 experimentos, onde o ponto central foi definido nas condições encontradas na literatura (Tabela 4.2). A matriz do planejamento pode ser visualizada na Tabela 4.3 e as variáveis de resposta foram as atividades FPásica, CMCásica e β-glucosidásica.

Os resultados do Planejamento 1 permitiram eliminar uma das fontes de nitrogênio, a peptona, e a faixa das demais fontes foram deslocadas para a segunda sequência de experimentos (Planejamento 2), conforme se observa na Tabela 4.4 e na matriz do planejamento na Tabela 4.5.

O ultimo planejamento da sequência (Planejamento 3), o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), está mostrado nas Tabelas 4.6 e 4.7. Para esta sequência, o sulfato de amônio foi retirado do planejamento, mas não eliminado do meio, mantendo-se constante para todos os experimentos na concentração de 4 g/L. Os dados foram analisados no Programa Statistica 6.0.

Tabela 4.2. Níveis do Planejamento 1 (fatorial 2^4) para cada fonte de nitrogênio.

VARIÁVEIS	**Níveis**		
	Min (-1)	**PC (0)**	**Máx (+1)**
Uréia (g/L)	0,15	0,3	0,45
Sulf. Amônio (g/L)	0,7	1,4	2,1
Peptona (g/L)	0,4	0,75	1,1
Ext. Levedura (g/L)	0,125	0,25	0,375

Tabela 4.3. Matriz do Planejamento 1 (fatorial 2^4) para fontes de nitrogênio.

Experimento	**Fonte de Nitrogênio (g/L)**			
	Uréia	**Sulf. Amônio**	**Peptona**	**Ext Lev.**
1	0,150	0,700	0,400	0,125
2	0,450	0,700	0,400	0,125
3	0,150	2,100	0,400	0,125
4	0,450	2,100	0,400	0,125
5	0,150	0,700	1,100	0,125
6	0,450	0,700	1,100	0,125
7	0,150	2,100	1,100	0,125
8	0,450	2,100	1,100	0,125
9	0,150	0,700	0,400	0,375
10	0,450	0,700	0,400	0,375
11	0,150	2,100	0,400	0,375
12	0,450	2,100	0,400	0,375
13	0,150	0,700	1,100	0,375
14	0,450	0,700	1,100	0,375
15	0,150	2,100	1,100	0,375
16	0,450	2,100	1,100	0,375
17 (C)	0,300	1,400	0,750	0,250
18 (C)	0,300	1,400	0,750	0,250
19 (C)	0,300	1,400	0,750	0,250

Tabela 4.4. Níveis do Planejamento experimental 2 (fatorial 2^3) para cada fonte de nitrogênio.

VARIÁVEIS	Níveis		
	Min (-1)	**PC (0)**	**Máx (+1)**
Uréia (g/L)	0,3	0,55	0,8
Sulf. Amônio (g/L)	1,2	2,60	4,0
Ext. Levedura (g/L)	0,075	0,163	0,250

Tabela 4.5. Matriz do Planejamento 2 (fatorial 2^3) para fontes de nitrogênio.

Experimento	Fonte de Nitrogênio (g/L)		
	Uréia	**Sulf. Amônio**	**Extrato de Levedura**
1	0,3	1,2	0,075
2	0,8	1,2	0,075
3	0,3	4	0,075
4	0,8	4	0,075
5	0,3	1,2	0,25
6	0,8	1,2	0,25
7	0,3	4	0,25
8	0,8	4	0,25
9 (C)	0,55	2,6	0,1625
10 (C)	0,55	2,6	0,1625
11 (C)	0,55	2,6	0,1625

Tabela 4.6. Níveis do Planejamento experimental 3 (DCCR) para cada fonte de nitrogênio.

VARIÁVEIS	Níveis				
	-α	**Min (-1)**	**PC (0)**	**Máx (+1)**	**+α**
Uréia (g/L)	0,234	0,40	0,80	1,20	1,366
Ext. Levedura (g/L)	0,038	0,10	0,25	0,40	0,462

Tabela 4.7. Matriz do Planejamento 3 (DCCR) para fontes de nitrogênio.

Experimento	Fonte de Nitrogênio (g/L)	
	Uréia	Extrato de Levedura
1	0,400	0,100
2	1,200	0,100
3	0,400	0,400
4	1,200	0,400
5	0,234	0,250
6	1,366	0,250
7	0,800	0,038
8	0,800	0,462
9 (C)	0,800	0,250
10 (C)	0,800	0,250
11 (C)	0,800	0,250

4.5.1. Validação da otimização da fonte de nitrogênio

Para validar a condição ótima predita foi utilizada a função *Desirability* utilizando o programa Statistica 6.0. Esta função estatística busca a combinação dos fatores, de forma que todas as variáveis de resposta sejam maximizadas simultaneamente. O valor *Desirability* (D) tem uma amplitude que varia de 0 a 1, onde D=1 corresponde a plena obtenção dos objetivos e D=0 corresponde à impossibilidade de satisfação dos objetivos (MONTGOMERY, 2001). Os fatores otimizados por esta função foram uréia e extrato de levedura.

Para este experimento, realizou-se fermentação submersa nas condições ótimas de uréia e extrato de levedura, apontadas pelo modelo, em quatro repetições e as análises foram realizadas em triplicata. A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio, a 30 °C, 200 rpm durante 72 h.

4.6. Produção de celulases em biorreator: avaliação do tipo e tamanho de inóculo

A produção de celulases em biorreator foi avaliada utilizando-se pré-inóculos obtidos (em frascos agitados) de três diferentes formas quanto à composição das fontes de carbono:

- Pré-inóculo G: crescimento micelial em glicose (10 g/L) como única fonte de carbono, por 48 h;
- Pré-inóculo G+C: crescimento micelial em glicose (10 g/L) por 48 h seguido de inóculo (5 %) em meio contendo celulignina 15 g/L (10 g/L de celulose), para aclimatação por 72 h antes do inóculo em reator;
- Pré-inóculo GC: crescimento micelial em meio contendo 5 g/L de glicose e 15 g/L de celulignina, crescido por 72 h.

Nos três casos, os frascos foram inoculados com 10^6 conídios/mL. Os reatores foram inoculados com o meio contendo micélio (pré-inóculos) na proporção de 5 % (v/v), sendo denominados de Biorreator G, Biorreator G+C e Biorreator GC, respectivamente, e a cada 12 h foram coletadas amostras para quantificação das atividades FPásica, CMCásica e β-glucosidásica.

A produção de celulases foi realizada em biorreator Biostat B (B. Braun Biotech. Int.) com volume nominal de 10 L e volume útil de 7 L (Figura 4.3). Como fonte de carbono e indutor para produção de celulases foi utilizada celulignina parcialmente deslignificada (20 g/L). O meio mineral foi o de Mandels e Weber (1969) e as fontes nitrogenadas foram as otimizadas no presente estudo. O biorreator era equipado com sistema de agitação mecânica com três impelidores FBT (*flat blade turbine*) com seis pás retas, sem chicanas no vaso reacional; eletrodo de temperatura; eletrodo de pH (eletrodo de prata/cloreto de platina, METLER TOLEDO); eletrodo para controle de DO_2 (eletrodo polarográfico prata/platina, INGOLD). O biorreator foi configurado nas seguintes condições: temperatura de 30 °C, pH 5,0, agitação de 150 a 400 rpm, aeração de 0,5 a 1 vvm, de forma a manter DO_2 de 20 a 40 % da saturação.

Após escolha da melhor forma de preparo do pré-inóculo, foi avaliado também o tamanho de inóculo, sendo estudados 5 e 10% do volume total de meio de produção. Os biorreatores foram operados durante 84 h e a cada 12 horas foram quantificadas as atividades celulásicas e xilanásicas e teor protéico.

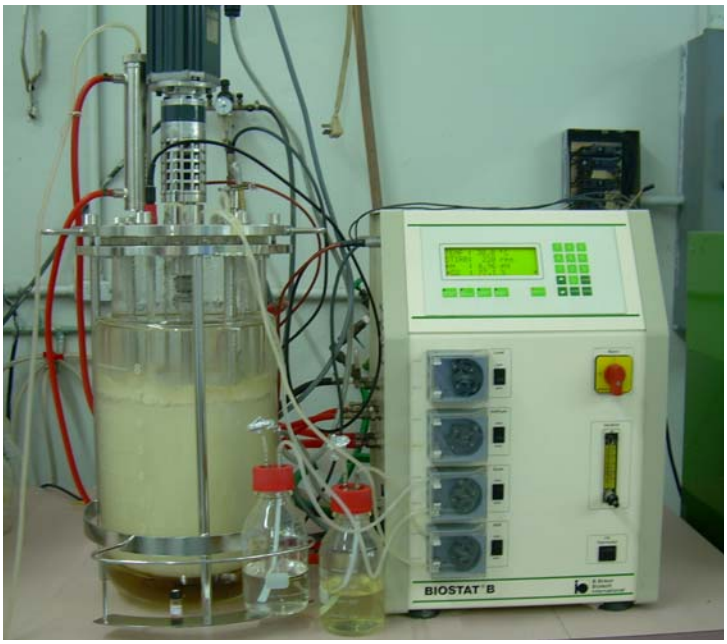


Figura 4.3. Biorreator Biostat B utilizado para produção de celulases por *P. funicusolum*.

4.7. Concentração dos extratos brutos enzimáticos

Após fermentação em biorreator, o meio fermentado foi filtrado em lã de vidro para separar o micélio e resíduos de celulignina do meio liquido (extrato bruto enzimático). O extrato enzimático foi então concentrado por dois métodos, em rotaevaporador à vácuo e por ultrafiltração tangencial em membranas de fibras ocas.

4.7.1. Concentração em evaporador rotativo

O extrato bruto enzimático foi concentrado em evaporador rotativo a 45 °C sob vácuo (-760 mmHg). O processo foi realizado em duas etapas, onde na primeira o extrato foi concentrado a um fator de 25 e na segunda etapa os extratos concentrados 25 vezes foram reunidos e concentrados a um fator de 2,8 totalizando um fator de concentração volumétrico final de 70 (25 x 2,8). Os tempos de concentração das etapas 1 e 2 foram de 4 h e 2 h, respectivamente.

O tempo total para concentrar 5 L de extrato bruto foi de aproximadamente 5 dias em balão de evaporação de 1000 mL com volume útil de 250 mL. A concentração em rotaevaporador à vácuo foi realizada com e sem adição de estabilizadores (glicerol e polietilenoglicol 8000). Tendo em vista que nos ensaios preliminares foram verificadas perdas de até 94 % das atividades enzimáticas,

durante a concentração foram adicionados como estabilizantes o polietilenoglicol 8000 (PEG8000) 0,2% m/v e glicerol 0,75 %.

O preparado enzimático obtido foi avaliado quanto à estabilidade a 37 e 50 °C e quanto à estabilidade durante o armazenamento.

4.7.2. Concentração por ultrafiltração tangencial em sistema de membranas de fibras ocas

O extrato bruto celulásico foi concentrado em um sistema de filtração tangencial em membrana de fibras ocas de polissulfona, *Hollow Fiber* modelo QuixStand, marca GE Healthcare (Figura 4.4). A primeira etapa consistiu em microfiltração em membranas de 0,2 µm para remoção de células e material particulado. Na etapa seguinte o extrato enzimático foi concentrado em cartucho com membrana de corte (*cut-off*) de 10 e 5 kDa a uma pressão de no máximo 15 psi na entrada do cartucho, em temperatura ambiente. Foram coletadas amostras do tanque de alimentação (extrato bruto), do permeado da ultrafiltração e do concentrado final para quantificação das respectivas atividades celulásicas. O extrato bruto concentrado em cartucho de *cut-off* 5 kDa foi denominado de Preparado Celulásico LADEBIO/BR (Figura 4.5). O preparado enzimático obtido foi avaliado quanto à atividade e estabilidade a 37 e 50 °C.

Figura 4.4. Sistema de filtração tangencial em membranas de fibras ocas de polissulfona.

Figura 4.5. Ilustração do preparado celulásico LADEBIO/BR.

4.8. Avaliação da estabilidade do preparado enzimático

Os extratos enzimáticos concentrados em ambos os métodos foram incubados a 50 e 37 °C simultaneamente. Em intervalos regulares foram retiradas amostras e avaliadas as atividades celulásicas durante 456 h. As temperaturas de 37 e 50 °C foram selecionadas por serem as utilizadas nos processos de sacarificação e fermentação simultâneas.

4.9. Identificação preliminar das enzimas com atividade CMCásica e β-glucosidásica por meio de zimograma

Com o objetivo de se fazer uma identificação prévia das enzimas com atividades CMCásica e β-glucosidásica do preparado enzimático concentrado, realizou-se uma eletroforese SDS-PAGE e zimograma para as referidas enzimas.

4.9.1. Eletroforese SDS-PAGE e gel nativo

A eletroforese SDS-PAGE em condições nativas foi realizada em gel de poliacrilamida 12 % usando sistema de cuba vertical (Mini-PROTEAN Tetra system,

marca Bio-Rad). A corrida eletroforética foi conduzida a 10 °C aplicando-se uma corrente de 20 mA/gel. Como marcadores de massa molecular foram utilizados, soro albumina bovina (67 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica bovina (30 kDa); inibidor de tripsina de soja (22,46 kDa); Citocromo C (13,37 kDa).

Para o zimograma de celulases com atividade em carboximetilcelulose (CMC), foi adicionada CMC (0,2 % m/v) à composição do gel de poliacrilamida; e para β-glucosidases, o preparo do gel seguiu os mesmos procedimentos para o gel SDS/PAGE desnaturante.

4.9.2. Revelação das bandas

Após eletroforese, o gel SDS-PAGE foi imerso em solução corante (metanol 45%, ácido acético 10 % e *coomasie* brilhante R-250 0,1 %) por 3 horas e em seguida descorado com solução fixadora descorante (ácido acético 10%).

Para revelação de celulases com atividade em CMC, após eletroforese, o gel foi imerso em solução Triton x-100 1% e mantido sob agitação constante durante 20 min, para remoção do SDS. Em seguida, a solução foi substituída por tampão citrato de sódio pH 5,0 50 mM e mantida sob agitação constante durante 20 minutos. O procedimento de lavagem com tampão foi repetido duas vezes. Após lavagens, o gel foi imerso novamente no tampão citrato e incubado a 50 °C por 20 min. Na sequência, o gel foi imerso em solução vermelho de congo (0,1 % m/v), onde ficou por 30 min. Posteriormente, o gel foi lavado sucessivas vezes com solução de NaCl 1 M, até o aparecimento das bandas.

Em relação às β-glucosidases, após eletroforese, o gel foi imerso em solução Triton x-100 1% e mantido sob agitação constante durante 20 min, para remoção do SDS. Em seguida, a solução foi substituída por tampão citrato de sódio pH 5,0 50 mM e mantida sob agitação constante durante 20 minutos. O procedimento de lavagem com tampão foi repetido duas vezes. A revelação de β-glucosidase foi realizada com Esculim (6,7-dihydroxycoumarin 6-glucoside) 0,1% e cloreto férrico 0,03% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 (KWON et al., 1994). As enzimas β-glucosidases agem separando a glicose da esculetina, a qual reage com cloreto férrico formando um precipitado escuro, revelando especificamente a banda de β-glucosidases.

4.10. Purificação e caracterização de enzimas do Preparado Celulásico LADEBIO/BR

A etapa de purificação de enzimas é de grande importância para caracterizar as moléculas presentes no extrato bruto enzimático. Estas informações servirão para o conhecimento das moléculas secretadas pelo microrganismo em estudo e com isso poderão servir de base para elaboração de um preparado enzimático mais eficiente.

Neste estudo foi desenvolvido um protocolo de purificação de enzimas de *P. funiculosum*. A etapa de purificação e caracterização foi realizada no Laboratório de Cristalografia do Grupo de Biotecnologia Molecular, no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP).

4.10.1. Concentração e troca de tampão do extrato enzimático - Precipitação com sulfato de amônio

O preparado enzimático foi precipitado com sulfato de amônio para redução do volume do extrato total de proteínas e troca do tampão. A saturação de sulfato de amônio necessária para precipitação de todas as proteínas presentes na mistura protéica foi determinada após teste de precipitação com sulfato de amônio 20 a 80% de saturação. A amostra inicial continha 5 mL a uma concentração 2,6 mg/mL e cada passo de precipitação foi realizado com adição lenta do sal sob agitação constante a 18˚C. As quantidades de sulfato de amônio foram adicionadas com base na Tabela 4.8 (SCOPES, 1993). Após 30 minutos de precipitação as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 30 minutos e ao sobrenadante foi dado tratamento idêntico para a próxima faixa de saturação até se alcançar os 80%. Os precipitados de cada etapa foram ressuspendidos em 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0. Ensaios de atividade de CMCase, FPase e β-glucosidase foram realizados para cada fração para caracterização dos grupos de proteínas separados. Adicionalmente, as diferentes frações obtidas foram visualizadas em gel SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio) de 15% de poliacrilamida, corado com *Comassie Brilliant Blue R-250* e descorado com ácido acético 10% (v/v). Como marcadores de massa molecular foram utilizados, soro albumina bovina (67 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica bovina (30 kDa); inibidor de tripsina de soja (22,46 kDa) e Citocromo C (13,37 kDa).

Após escolha da concentração mínima de sulfato de amônio necessária para precipitação das proteínas de *P. funiculosum*, realizou-se o procedimento de precipitação como uma etapa prévia à purificação por cromatografia de troca iônica.

Após precipitação das proteínas com sulfato de amônio e ressolubilização do precipitado em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 7,5, a amostra foi dessalinizada em coluna de gel filtração *HiPrep Desalting* 26/10 com o mesmo tampão. A corrida se deu com fluxo de 3 mL/min respeitando o limite de pressão de 0,15 MPa e com 2 volumes de coluna (140 mL) de tampão.

Todos os passos de cromatografia foram realizados em sistema de cromatografia líquida de rápida performance (FPLC) Äkta Purifier (Amersham-Biosciences) acoplada de um coletor de frações modelo Akta 900.

Tabela 4.8. Quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada para precipitação de proteínas.

% Saturação inicial	Porcentagem de saturação a ser obtida								
	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	Quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada (g) por litro de solução a 4°C								
0	113	175	242	314	390	472	561	657	761
5	83	146	212	282	359	439	526	621	723
10	37	117	182	251	325	405	491	584	685
20	0	59	121	188	260	337	421	511	609
30		0	61	125	195	270	351	438	533
40			0	63	130	202	281	365	457
50				0	65	135	210	292	381
60					0	67	140	219	305
70						0	70	146	228
80							0	73	152
90								0	76

Fonte: Scopes (1993)

4.10.2. Separação de proteínas do extrato total por cromatografia de troca iônica

Foram purificadas as proteínas majoritárias do extrato extracelular de *Penicillium funiculosum* por meio de cromatografia de troca iônica com coluna de troca aniônica Q-sepharose HP 16/10 utilizando Äkta Purifier (Amersham-Biosciences) acoplada de um coletor de frações modelo Akta 900 (Figura 4.6). Os tampões utilizados foram tris 50 mM pH7,5 contendo glicerol 5% para tampão de equilíbrio e tris 50 mM pH7,5, glicerol 5% e NaCl 1M para eluição das proteínas em gradiente linear de 0-100%, em 20 CV. As amostras coletadas em coletor de frações foram concentradas e tiveram os tampões trocados em concentradores Vivaspin (Amersham-Bioscience). A pureza das frações foi checada por eletroforese SDS-PAGE da mesma forma descrita acima. As frações que continham bandas de proteínas equivalentes foram reunidas e concentradas em *Vivaspin* com membrana com corte de 10 kDa (GE Healthcare) por centrifugação a 3000 g.

Figura 4.6. Akta. Sistema para cromatografia líquida de rápida performance (FPLC).

4.10.3. Digestão com tripsina das bandas da eletroforese SDS-PAGE das amostras purificadas

A digestão das amostras com tripsina, para identificação por LC/MS/MS, foi realizada conforme método descrito por Shevchenko *et al*. (1996). Após eletroforese as bandas foram recortadas com auxílio de lâminas bisturi e transferidas para microtubos *Eppendorff* de 500 μL pré lavados com metanol. Os fragmentos foram descorados por lavagens (três vezes/15 min) com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. Após remoção do *coomassie* e SDS, os fragmentos foram desidratados com acetonitrila seguido de secagem em concentrador a vácuo refrigerado (*Speed vac*). Após secagem, as amostras foram reduzidas com DTT 10 mM (ditiotreitol) por 30 minutos. O DTT foi então removido e a amostra foi alquilada com iodoacetamida 50 mM (IAA) por 30 minutos. Este foi então removido e a amostra foi lavada com bicarbonato de amônio 100 mM (10 min) e desidratado com acetonitrila (5 min). A operação de reidratação com bicarbonato de amônio e desidratação foi repetida 3 vezes. Em seguida as amostras foram desidratadas em *Speed vac* por 15 min.

Às amostras, foram adicionados 10 μL de solução de tripsina (20 ng/μL) em ácido acético e bicarbonato de amônio e deixadas em repouso por 10 minutos. Então, o excesso de tripsina foi removido e adicionado de 20 μL de bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram deixadas em repouso por 16 a 24 h a 37 °C. Após este período, a fase líquida foi removida e os fragmentos sólidos foram lavados com 30 μL de ácido fórmico em acetonitrila 50 %, por 30 minutos (2 vezes). A fase líquida foi removida e reunida com a fase líquida anterior. Esta foi então concentrada em *Speed vac* até volume de 20 μL. Os peptídeos removidos foram armazenados em ultra-freezer a -80 °C para posterior análise por espectrometria de massa.

4.10.4. Identificação das proteínas isoladas por espectrometria de massa

Após digestão das proteínas com tripsina, foi realizada análise de sequência de peptídeos em espectrômetro de massa ESI-QUAD-TOF (Micromass) no laboratório de Genética de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP de Piracicaba e no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo.

Após geração da seqüência de peptídeos, foi utilizado o *software* Mascot para identificação de proteínas. Este *software* compara as sequencias de peptídeos obtidas com as depositadas em bancos de dados internacionais como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), um dos maiores bancos de dados em genômica e proteômica, permitindo identificar proteínas que apresentam massa e seqüência similares.

4.10.5. Cromatografia de interação hidrofóbica

Após purificação em cromatografia de troca iônica e eletroforese SDS-PAGE, como verificou-se presença de proteínas contaminantes na fração contendo enzima CBH I (identificada por LC/MS/MS), realizou-se uma cromatografica de interação hidrofóbica para separar a enzima CBH I das demais proteínas.

Para este método de purificação foi utilizada coluna de phenil sepharose TSK Gel. A cromatografia de interação hidrofóbica é um método de purificação e separação de biomoléculas baseado nas diferenças de hidrofobicidade das superfícies das moléculas.

A amostra (5 mL), após pré-purificação em coluna de troca aniônica, foi adicionada de 5 mL de tampão tris-HCl pH 7,5 100 mM contendo 2 M de $(NH_4)_2SO_4$. A amostra foi então injetada no sistema FPLC para purificação da enzima. O sistema foi configurado como se observa abaixo:

A seguir são mostradas as condições operacionais utilizadas na cromatografia de interação hidrofóbica:

Sistema: Äkta Purifier (Amersham, Biosciences)
Tampão A: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5
Tampão B: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 + $(NH_4)_2SO_4$ 1 M
Coluna: phenil sepharose TSK Gel
Equilíbrio da coluna com 2 volumes de coluna (2 VC) com tampão B
Volume de injeção: 10 mL
Fluxo: 1,5 mL/min
Volume de coluna: 25 mL
Pressão máxima na coluna: 0,18 MPa
Gradiente: início com 100% de B, após 2 volumes de coluna (2 CV)

Atingir 0% de B em 20 CV

Tamanho das frações no FT: 5 mL

Tamanho das frações durante gradiente: 1 mL

Tamanho das frações após atingir 0 % de B: 10 mL até 2 VC

λ: 280 nm

4.10.6. Determinação da massa molecular das enzimas purificadas

As massas moleculares das proteínas purificadas foram determinadas após eletroforese SDS-PAGE utilizando o software Gel-Pro Analyser 4.0. O gel foi digitalizado e a imagem tratada pelo software, o qual identifica as bandas de proteínas dos padrões de massa molecular e das amostras. Para localização das bandas, o software se baseia na intensidade de cor por coluna. É indicada ao software a coluna cujas bandas são as dos marcadores de massa molecular e indicados os respectivos valores de massa. As massas moleculares das amostras são determinadas com base na migração dos padrões de massa molecular. O software calcula com base no logarítimo da massa molecular *versus* mobilidade relativa dos padrões.

4.10.7. Eletroforese em gel nativo

A eletroforese em gel nativo permite avaliar a pureza do extrato enzimático e avaliar o grau de oligomerização da proteína, por separar a molecular por tanto por carga quanto por massa molecular. A eletroforese foi realizada em um sistema de eletroforese Pharmacia LKB a 140 V, 10 mA até acumular 268 AVh (average volts hour). Como padrões de massa molecular foram utilizadas tiroglobulina (609 kDa), ferritina (440 kDa); catalase (232 kDa); aldolase (140 kDa); albumina (67 kDa).

4.10.8. Atividade das enzimas purificadas

As medidas de atividades foram realizadas após confirmação da pureza das amostras, por eletroforese em gel nativo. Esta técnica permite verificar a pureza, pois separa as proteínas tanto por carga quanto por massa molecular, além de caracterizar a molécula quanto ao grau de oligomericação.

Após purificação e identificação, foram medidas as atividades das enzimas β-glucosidase e CBH I em diferentes substratos (avicel, CMC, celobiose e xilose) e os produtos formados foram medidas em por diferentes métodos (DNS e GOD).

4.10.9. Ensaios de fluorescência

Para análise de fluorescência foi utilizado o PC 1_Photon Counting Spectrofluorimeter ISS, com fonte ajustada para 15 mA, com aplicação de 1 μMol de proteína em cubeta de quartzo de 1 mm de distância óptica, fenda de 1 mm a 25 °C. A luz incidida foi a 280 nm. O sistema foi configurado para realização de uma varredura de 300 a 450 nm de luz emitida pelos aminoácidos tirosina e triptofano.

Todas as proteínas purificadas foram lidas e em uma segunda etapa foi adicionada guanidina 6 M e as amostras deixadas em repouso por 30 minutos e as leituras foram feitas novamente. Os dados aqui apresentados consistem em resultados preliminares dos estudos de estabilidade protéica das enzimas em questão, e os próximos passos consistem em aprofundar os detalhes dos experimentos realizando ensaios mais completos de forma a caracterizar o grau de estabilidade das enzimas purificadas frente a diferentes condições desnaturantes como variações de temperatura, extremos de pH e presença de etanol.

4.10.10. Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e V_{MAX}, aparentes, para atividade CMCásica e β-glucosidásica do preparado celulásico

Para determinação dos parâmetros cinéticos aparentes foram realizados ensaios para avaliação do efeito da concentração de substrato e os parâmetros cinéticos foram determinados pelo método do duplo recíproco de *Lineweaver-Burk*.

4.10.10.1. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação de β-glucosidásica e CMCásica

Para determinação da faixa de trabalho das concentrações de substrato de ambas as enzimas, foi utilizado o K_M descrito na literatura. Então, adotou-se um intervalo de 0,2 K_M a 3 K_M. Para avaliação do efeito da concentração de substrato na

atividade β-glucosidásica, foram realizados experimentos com diferentes concentrações de celobiose (0,15 a 5,7 mMol/L) com medidas de liberação do produto nos tempos 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20 e 30 minutos. Para avaliação do efeito do substrato na atividade CMCásica, a curva de progresso foi feita com concentrações de CMC de 3 a 28 g/L. As condições experimentais para reação enzimática foram de pH 5,0 e temperatura 50 °C.

4.10.10.2. Cálculo dos parâmetros K_M e V_{MAX}

A equação de Henri-Michaelis-Mentem (Equação 5) nos fornece a velocidade instantânea ou inicial relativa a V_{MAX} para uma dada concentração de substrato. Porém, a equação só é válida se *v* (velocidade) é medida num tempo suficiente de modo que a concentração de substrato permaneça praticamente constante. Para isto, é preferível que a hidrólise não ultrapasse 5% da concentração inicial de substrato. No entanto, para celulases, recomenda-se que não se ultrapasse 4 % para atividade FPásica (GHOSE, 1987) e 2 % para CMCásica (ZHANG *et al*. 2006).

O Ks, que nas condições definidas representa a constante de dissociação do complexo enzima-substrato, é conhecido com o nome de Constante de Michaelis (K_M) que é um dado de grande importância e ao mesmo tempo uma característica de cada enzima sob dadas condições. Este valor é independente da concentração tanto da enzima como do substrato e pode ser definido como a concentração do substrato que proporciona a metade da velocidade máxima de reação ($V_{MAX}/2$).

A partir da curva de progresso obtida como descrito no item anterior, foi determinada a velocidade inicial para cada concentração de substrato e estimados os parâmetros cinéticos K_M, V_{MAX} aparentes pelo método de linearização da equação de Michaelis-Menten por meio do duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* como descrito por Segel (1979).

$$V = \frac{V_{\max} . S}{K_S + S}$$ Equação 5

$$\frac{1}{V} = \frac{K_S}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$ Equação 6

A equação 6 representa uma reta cujo coeficiente angular é K_S/V_{max} e o valor da interseção da reta na ordenada é $1/V_{max}$, podendo ser calculados assim, os valores de V_{max} e K_S. Verifica-se também que quando $1/V=0$, $1/S=-1/K_S$.

4.11. Hidrólise da celulignina utilizando extrato enzimático concentrado de *P. funiculosum*

Os seguintes preparados enzimáticos foram obtidos utilizando o preparado celulásico LADEBIO/BR e o preparado enzimático comercial Multifect (Genencor®):

1. M25 (Comercial Multifect)
2. M12,5 (Comercial Multifect)
3. P25 (*Penicillium funiculosum*)
4. M12,5 P12,5 (50% Multifect + 50% *P. funiculosum*)

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL foi adicionada a celulignina (2,5 g) e os preparados enzimáticos (diluídos em 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0) com carga enzimática de 25 FPU por grama de celulignina, com exceção da enzima M12,5, que foi de 12,5 FPU/g da enzima comercial Multifect®.

Os frascos contendo bagaço e enzima foram mantidos sob agitação constante a 200 rpm e a 50 °C durante 18 horas. Neste período foram retiradas amostras para o levantamento do perfil cinético da hidrólise. As amostras foram centrifugadas a 10000 g e os sobrenadantes separados para quantificação de açúcares liberados.

As variáveis de resposta foram glicose e celobiose liberadas e foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O experimento foi realizado em duas repetições e as análises em duplicata. Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) em delineamento inteiramente

casualisado, em nível de 5 % de significância e o teste de médias foi realizado pelo teste de Tukey, também com nível de 5 % de significância.

4.12. Avaliação de diferentes níveis de deslignificação e efeito do BSA na hidrólise de celulignina

Com a finalidade de reduzir a quantidade de hidróxido sódio utilizada na deslignificação, foi avaliado o efeito de diferentes níveis de deslignificação na hidrólise enzimática da celulignina. O bagaço de cana foi deslignificado utilizando solução de hidróxido de sódio em diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0 e 4,0 %). O procedimento para deslignificação foi conforme procedimento descrito na etapa de pré-tratamento alcalino da celulignina.

Acredita-se que a lignina, presente em materiais lignocelulósicos, adsorve irreversivelmente as celulases, ocasionando assim uma redução da disponibilidade da enzima e, consequentemente, redução da eficiência de hidrólise (SUTCLIFFE e SADDLER, 1986; TATSUMOTO *et al*., 1988). Visando minimizar a adsorção das celulases na lignina, adicionou-se BSA (albumina bovina sérica) e avaliou-se o efeito da adição desta proteína na hidrólise enzimática da celulignina parcialmente deslignificada.

Às celuligninas parcialmente deslignificadas em diferentes graus, adicionou-se BSA 1,5 g/L duas horas antes da adição do preparado enzimático. Para este estudo a carga enzimática foi de 18 FPU/g. O preparado enzimático utilizado foi obtida pela mistura de enzimas do fungo filamentoso *P. funiculosum* e do comercial Multifect. Foi realizado um controle para cada celulignina sem adição de BSA.

Os frascos contendo celulignina de bagaço de cana e enzimas foram mantidos sob agitação constante a 200 rpm, a 50 °C durante 36 horas. Neste período, foram retiradas amostras para o levantamento do perfil cinético da hidrólise enzimática. As amostras foram centrifugadas a 10000 g e o sobrenadante separado para quantificação de açúcares liberados.

4.13. Produção de etanol de segunda geração por processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) utilizando o preparado celulásico LADEBIO/BR

Para produção de etanol por processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), foi utilizada a celulignina parcialmente deslignificada (utilizando solução de hidróxido de sódio 2% e o preparado celulásico LADEBIO/BR.

Inicialmente, foi realizado experimento em fermentômetro e, posteriormente, em biorreator instrumentado de bancada. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1 foi produzida em biorreator em batelada alimentada por pulsos. Além da avaliação prévia da estabilidade do Preparado Celulásico LADEBIO/BR, foram avaliadas também as atividades celulásicas a 37 e 50 °C, por serem as temperaturas empregadas no processo SSF.

4.13.1. Produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* JP1 em biorreator

Para produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* JP1, foi realizado repique em placas de Petri contendo meio YED, por estrias, de forma a obter colônias isoladas. A placa foi incubada a 37 °C por 36 h. Três colônias da levedura foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio nutritivo (PEREIRA JR., 1991) e glicose 20 g/L. Os frascos foram incubados a 37 °C, agitados a 200 rpm por 12 h. Após este período, o meio foi utilizado como inóculo em reator para produção de células.

A produção de células para inóculo no processo SSF foi realizada em biorreator Biostat B (B. Braun Biotech. Int.) com volume nominal do vaso de 5 L e volume útil de 2 L. O vaso contendo meio foi esterilizado a 121 °C por 30 min. A fermentação foi realizada a 37 °C, com agitação variando de 200 a 400 rpm e aeração de 0,5 a 2 vvm, de forma a manter o oxigênio dissolvido (DO_2) em 60 % de saturação, por 16 h. O processo foi conduzido por batelada alimentada por pulsos, com solução de glicose 750 g/L suplementado com uréia.

Após atingir a quantidade de células (em massa seca) necessária para os ensaios em fermentômetro e em biorreator, o meio foi centrifugado a 8000 rpm por 30 min. As células precipitadas foram utilizadas como inóculo nos ensaios em fermentômetro e na produção de etanol por SSF em biorreator.

4.13.2. Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático: ensaios em fermentômetro

Com o objetivo de avaliar o desempenho do preparado celulásico obtido neste estudo e avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático, foram realizados ensaios em fermentômetros, agitados em shaker modelo Excella E25 (New Brunswick Scientific). Em frascos Erlenmeyers de 500 mL foi adicionada a celulignina parcialmente deslignificada e o meio líquido mineral (PEREIRA Jr., 1991) para a levedura *Sacharomyces cerevisiae* JP1. Os frascos contendo os meios foram

esterilizados a 121 °C por 15 min e, após resfriamento, foi adicionado o preparado celulásico, acoplado do fermentômetro e mantido sob agitação a 50 °C. Após pré-hidrólise de 12 h, a temperatura foi reduzida para 37 °C e a levedura foi adicionada na concentração de 15 g/L. A fermentação foi acompanhada por pesagens periódicas do fermentômetro.

4.13.3. Produção de etanol usando celulignina em processo SSF alimentado

O processo SSF foi realizado em biorreator Biostat B (B. Braun Biotech. Int.) com volume nominal do vaso de 1,5 L e volume útil de 600 mL. Utilizou-se uma proporção sólido (g):líquido (mL) total de 200:420. O volume de meio líquido continha os nutrientes necessários para a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, o tampão citrato fosfato 25 mM pH 5,0 e o preparado celulásico LADEBIO/BR com uma carga enzimática total de 12,5 FPU/g. O preparado celulásico LADEBIO/BR utilizado neste estudo apresentava atividades FPásica de 63,1 U/mL, CMCásica de 602,0 U/mL e β-glucosidásica de 140,6 U/mL.

Inicialmente foi realizada pré-hidrólise com 100 g de bagaço, a 50 ºC, pH 5,0, agitação de 200 rpm por 12 h. Após liquefação, a temperatura foi reduzida para 37 °C, inoculada a levedura *Sacharomyces cerevisiae* JP1 15 g/L e o sistema alimentado com 50 g de celulignina parcialmente deslignificada, e a cada 24 h foram realizadas mais duas alimentações com carga de 25 g cada, totalizando os 200 g de sólidos. Amostras foram coletadas a cada hora durante as primeiras quatro horas e a cada duas horas até 48 horas de fermentação. As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante separado para quantificação de glicose, celobiose e etanol.

4.14. Procedimentos analíticos

4.14.1. Quantificação da atividade em papel de filtro

Em tubos de ensaio, foi inserida uma tira de papel de filtro de 1x6 cm, enroscada. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão citrato 50 mM pH 5,0 e 0,5 mL da enzima diluída no mesmo tampão. Os tubos foram incubados a 50 ºC por 1h. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 3 mL de reagente de DNS, seguido de incubação a 100 ºC por 5 min. Após este período, foram adicionados 20,0 mL de água destilada, seguido de homogeneização. A intensidade da cor formada foi lida

em espectrofotômetro a 540 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional. Foram realizados controles de enzima e controles de substrato para separar os açúcares não provenientes da reação enzimática. A atividade FPásica foi expressa em unidades internacionais (UI) a qual uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 μMol de açúcares redutores (glicose equivalente) por minuto de acordo com método descrito por Ghose (1987), Adney e Baker (1996) e Eveleigh *et al*. (2009).

4.14.2. Quantificação da atividade CMCásica

Em microtubos *Eppendorff* de 2 mL, foram adicionados 50 µL de solução de CMC 2% m/v e 50 µL de enzima diluída em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0. A mistura foi incubada a 50 ºC por 15 min. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 300 µL de reagente de DNS, seguido de incubação a 100 ºC por 5 min. Após este período, adicionou-se 1,5 mL de água, seguido de homogeneização. A intensidade da cor formada foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional. Foram realizados controles de enzima e controles de substrato para separar os açúcares não provenientes da reação enzimática. A atividade CMCásica foi expressa em unidades internacionais (UI) a qual uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 μMol de açúcares redutores (glicose equivalente) por minuto de acordo com método descrito por Ghose (1987), Adney e Baker (1996) e Eveleigh *et al*. (2009).

4.14.3. Quantificação da atividade β-glucosidásica

Em microtubos *Eppendorff* de 2 mL, foram adicionados 50 µL de solução de celobiose 2% m/v e 50 µL de enzima diluída em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0. A mistura foi incubada a 50 ºC por 15 min, e em seguida, foi levada ao banho-maria a 100°C por 5 min. A glicose liberada foi quantificada pelo método enzimático glicose oxidase (Kit GOD). A atividade β-glucosidásica foi expressa em unidades internacionais (UI) a qual uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 μMol de glicose por minuto de acordo com método descrito por Ghose (1987), Adney e Baker (1996) e Eveleigh *et al*. (2009).

4.14.4. Quantificação da atividade xilanásica

Em microtubos *Eppendorff* de 2 mL, foram adicionados 50 µL de solução de xilana de birkwood 2 % em tampão citrato pH 50 mM 5,0 e adicionados 50 µL de enzima diluída no mesmo tampão. A mistura foi incubada a 50 ºC por 15 min. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 300 µL de reagente de DNS, seguido de incubação a 100 ºC por 5 min. Após este período, adicionou-se 1,5 mL de água, seguido de homogeneização. A intensidade da cor formada foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional. A atividade xilanásica foi expressa em unidades internacionais (UI) a qual uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 µMol de açúcares redutores (xilose equivalente) por minuto.

4.14.5. Determinação do teor de proteínas

Para determinação de concentração de proteína, foi construída uma curva padrão utilizando-se uma solução de albumina bovina sérica (BSA) nas concentrações de 5 a 30 mg/L. A 800 µL de amostra, diluída apropriadamente em tampão citrato pH 5,0, foram adicionados 200 µL do reativo Bradford (BioRad). Essa solução foi incubada em temperatura ambiente por 5 min e, após este período, foram adicionados 1000 µL de água destilada. A intensidade da cor formada foi medida em espectrofotômetro a 595 nm após calibração do equipamento com o branco reacional.

4.14.6. Quantificação de glicose, celobiose, xilose e etanol por CLAE

Para quantificação de glicose, celobiose, xilose e etanol das amostras provenientes dos ensaios de hidrólise enzimática da celulignina e do processo SSF, as amostras foram centrifugadas a 10000 g a 4 °C por 15 min e o sobrenadante foi diluído com água Milli-Q e filtrado em membrana 0,45 µm. Os açúcares e etanol foram quantificados por CLAE (Waters 2414) equipado com detector de índice de refração e coluna HPX87b. A fase móvel foi água miliQ, a um fluxo de 0,6 mL/min.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo registra os principais achados desta tese de doutorado, que incluem a caracterização parcial da matéria-prima empregada e do material pré-tratado; otimização do meio de produção de celulases em frascos agitados, através de técnicas de planejamento experimental seqüencial, produção em biorreator instrumentado; concentração do extrato bruto sem células em rotaevaporador a vácuo e em sistema de ultrafiltração tangencial; caracterização do extrato enzimático bruto concentrado, empregando técnicas eletroforéticas, cromatografia de troca iônica, LC/MS e fluorescência. Adicionalmente, o preparado enzimático concentrado teve seus parâmetros cinéticos aparentes determinados e avaliação de sua estabilidade frente à estocagem e à temperatura de aplicação em processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas. Finalmente, o preparado enzimático foi aplicado na hidrólise de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de etanol de segunda geração, tendo sido os resultados altamente proeminentes e promissores.

5.1. Composição do bagaço e celulignina de bagaço de cana-de-açúcar

Após cada etapa de pré-tratamento (ácido e alcalino) do bagaço, as massas do material resultante foram medidas para determinação dos rendimentos. Dessa forma, constatou-se que para cada quilo de bagaço de cana (massa seca) obtém-se 0,687 kg de celulignina ácida e após pré-tratamento alcalino, 0,288 kg de celulignina parcialmente deslignificada.

O rendimento de celulignina de 28,8% obtido nas condições experimentais deste estudo pode ser considerado baixo, uma vez que o bagaço de cana apresenta em sua composição, aproximadamente, 34% de celulose (Tabelas 5.1 e 5.2). Sendo assim, observa-se que ocorrem perdas de massa durante os procedimentos de preparo da matéria-prima, em especial durante o pré-tratamento alcalino. Estas perdas ocorreram provavelmente devido à passagem das partículas menores pelas aberturas das peneiras utilizadas durante as lavagens com água para remoção da fração lignina. Além disso, os pré-tratamentos ácido e alcalino podem liberar pequenas quantidades de oligossacarídeos solúveis a partir da celulose, ocasionando assim sua lixiviação com as lavagens.

Na Tabela 5.1 estão apresentados os resultados da caracterização do bagaço de cana que exibiu composição dentro da faixa reportada na literatura: celulose, 33 a 36 %; hemicelulose, 28 a 30%; lignina, 18 a 20% e cinzas 2 a 4,8% (PANDEY *et al*., 2000).

Em relação à celulignina parcialmente deslignificada, verificou-se que o pré-tratamento foi eficiente na remoção das frações hemicelulose e lignina, com redução de 59% e 52%, respectivamente, e um aumento do teor de celulose de 34 para 68%. Resultados semelhantes foram obtidos por Aguiar e Menezes (2000), que realizaram um pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido fosfórico, seguido de outro com solução de hidróxido de sódio 4,0% (Tabela 5.2).

O pré-tratamento de material lignocelulósico é imprescindível não só para facilitar o acesso do microrganismo ao principal substrato (celulose), mas também em consonância com Jorgensen e Olsson (2006), a lignina é capaz de absorver as celulases e prejudicar sua ação catalítica quando se pretende utilizar material lignocelulósico para a produção de uma variedade de moléculas, como sinalizado na parte introdutória do presente trabalho de pesquisa. Esta adsorção é considerada

em parte, irreversível, sendo que após hidrólise da fração celulósica, somente 50% da atividade enzimática pode ser recuperada.

Tabela 5.1. Composição do bagaço de cana e celulignina.

Frações	**Bagaço de cana**	**Celulignina parcialmente deslignificada**
Celulose (%)	34,09 ± 1,20	67,97 ± 1,31
Hemicelulose (%)	29,61 ± 1,44	12,20 ± 0,94
Lignina (%)	19,41 ± 0,44	9,30 ± 0,62
Cinza (%)	7,94 ± 1,05	3,50 ± 0,42
Umidade (%)	4,41 ± 0,12	3,98 ± 0,15

Tabela 5.2. Composição de bagaço e celulignina reportados na literatura.

Frações	**Bagaço de cana**		**Celulignina de bagaço**	
			NaOH 4%	**NaOH 4%, H_3PO_4, vapor**
	Pandey *et al*. (2000)	Aguiar e Menezes (2000)	Aguiar e Menezes (2000)	
Celulose (%)	33 a 36	37,0	60,5	66,5
Hemicelulose (%)	28 a 30	-	-	-
Lignina (%)	18 a 20	24,6	10,7	10,0
Cinza (%)	2,0 a 4,8	-	-	-

Pré-tratamentos podem também melhorar o rendimento de hidrólise enzimática mesmo em material celulósico isento de lignina e hemicelulose, agindo nas ligações intramoleculares. Jeihanipour e Taherzadeh (2009) realizaram hidrólise enzimática de algodão pré-tratado com hidróxido de sódio de 2 a 20%, com relação sólido:líquido de 1:20 em temperaturas de 0, 23 e 100°C durante 3 h de exposição, e verificaram aumento do rendimento de hidrólise enzimática de 17,6 para até 99,1 %, na condição de hidróxido de sódio 20% a 0°C.

5.2. Avaliação do caráter constitutivo e papel indutor da celulose na produção de celulases por *Penicillium funiculosum*

Os resultados mostraram que existem enzimas do complexo celulásico produzidas por *P. funiculosum* de caráter constitutivo. Isto é observado nas Figuras

5.1 e 5.3 (atividades FPásica e β-glucosidásica), em que se constatam atividades celulásicas nos meios contendo somente glicose como fonte de carbono e ausência de celulose (indutor).

As β-glucosidases constitutivas, no entanto, apresentam baixas proporções quando comparadas com aquelas produzidas na presença de celulose, tanto a celulose microcristalina (comercial) quanto de celulignina de bagaço de cana. No caso das CMCases, não foram observadas atividades enzimáticas de caráter constitutivo (Figura 5.2). Jorgensen *et al*. (2004) estudaram o efeito de monossacarídeos na produção de celulases e xilanases em três diferentes espécies de *Penicillium*, e Chaudhary e Tauro (1982) avaliaram a seqüência da liberação de celulases por *Trichoderma reesei*. Os autores relataram que as endoglucanases são produzidas somente após esgotamento da glicose. Isto indica que a regulação do gene de β-glucosidases difere da regulação daquele que expressa atividade endoglucanásica ou a repressão desses genes é menos forte para as β-glucosidases (JORGENSEN *et al*., 2004). De acordo com Stemberg e Mandels (1980), as β-glucosidases são produzidas de forma constitutiva em baixos níveis, porém podem ser induzidas por metil-β-glicosídeos, e serem produzidas em altas quantidades. Chaudhary e Tauro (1982) verificaram que as β-glucosidases são produzidas em meio contendo glicose como única fonte de carbono, mesmo em baixas concentrações enzimáticas.

Em relação ao efeito indutor da celulose, foi verificado que a celuliginina apresentou maior indução sobre a produção de celulases de *P. funiculosum* que a celulose microcristalina (Figura 5.4), independente das atividades medidas. Do ponto de vista econômico, este é um importante resultado, uma vez que em fermentação submersa, o custo da fonte de carbono é estimado como uma das maiores contribuições para o custo de produção de celulases (RYU e MANDELS, 1980; LIMING e XUELIANG, 2004). Vários tipos de celulose purificada como Avicel, *Solka Floc* dentre outros podem ser usados como fonte de carbono para produção de celulases. Entretanto, seu custo pode ser um impeditivo em escala industrial (ESTERBAUER *et al*., 1991; PERSON *et al*., 1991; DOMINGUES *et al*., 2000).

Diversos autores (NIRANJANE *et al*., 2006; OLSSON *et al*., 2003; MARTINS *et al*., 2008; JORGENSEN *et al*., 2004; JUHÁSZ *et al*., 2005a) demonstraram que a

fonte de carbono tem grande influência sobre a produção de celulases. No presente estudo, a maior produção de celulases em meio contendo celulignina de bagaço de cana pode ter sido em função de este substrato apresentar composição mais complexa, com a presença de xilose e outros açúcares e, assim, ter induzido a produção de enzimas celulolíticas. De fato, o efeito da xilose na indução de celulases foi mostrado por Sestak e Farkas (1993). Os autores reportaram o papel repressor da glicose e indutor de alguns açúcares que são transportados para o interior da célula, sem no entanto sofrerem fosforilação. Dentre os açúcares que não são fosforilados, a xilose induziu o aumento de adenosina monofosfato cíclico (indutor) intracelular e manteve a glicose-6-fosfato (repressor) em concentrações basais, ocasionando assim, o aumento da síntese de celulases.

Outro aspecto a ser considerado é o efeito repressor da glicose. Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 pode-se observar que nos experimentos em que há altos níveis de glicose, houve baixa produção de celulases. O efeito repressor da glicose em altas concentrações na expressão de celulases foi primorosamente relatado por Sestak e Farkas (1993). No presente estudo, observou-se que a presença de glicose inicial no meio afetou negativamente a produção de celulases, especialmente no experimento em que o meio foi a celulignina de bagaço de cana. Entretanto, quando foi empregada celulose microcristalina como fonte de carbono, a presença de glicose em concentrações de até 5 g/L não apresentou efeito na produção de enzimas com atividade FPásica. Porém, até esta concentração, a glicose foi indutor para produção de β-glucosidases, ao passo que para atividade CMCásica, a concentração de 2,5 g/L provocou um efeito repressor. Este efeito repressor da glicose sobre a atividade CMCásica foi observado também no meio contendo celulignina de bagaço de cana. Este resultado contraria o observado por Rao *et al*. (1988) que estudaram a indução e repressão catabólica de celulases em *P. funiculosum* e concluíram que glicose em concentração de 5 g/L não reprime a síntese de endoglucanases. Os autores sugeriram, ainda, que a produção de celulases não é sujeita à repressão catabólica neste microrganismo. Entretanto, esses mesmos autores citaram que o fungo *P. funiculosum* só iniciava a produção após o terceiro dia de fermentação. Sendo assim, não podemos afirmar que *P. funiculosum* não sofre repressão catabólica, uma vez que até o terceiro dia o fungo não apresentou qualquer atividade celulásica

naqueles experimentos. Esta situação, ao contrário do que os autores concluíram, é um forte indício de repressão catabólica por glicose.

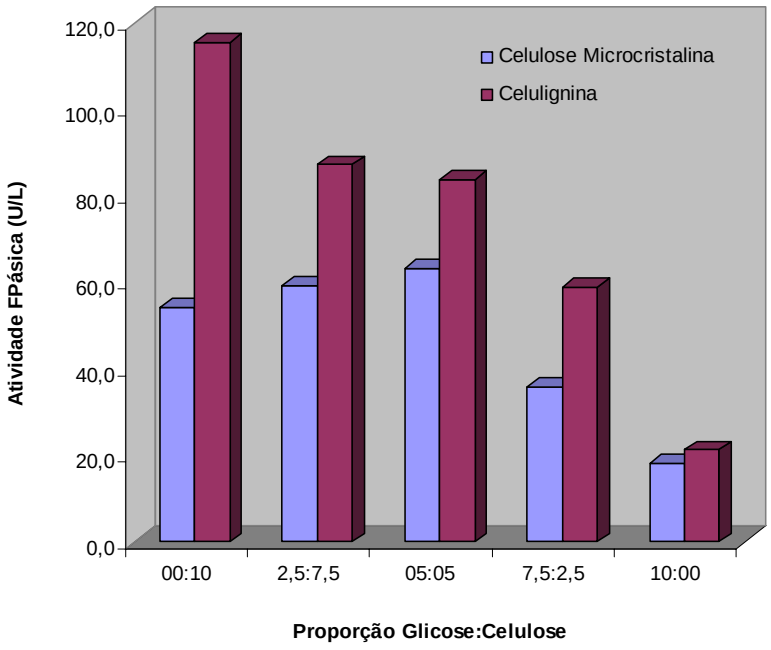


Figura 5.1. Produção de enzimas com atividade FPásica em meios com diferentes proporções de glicose e celulose.

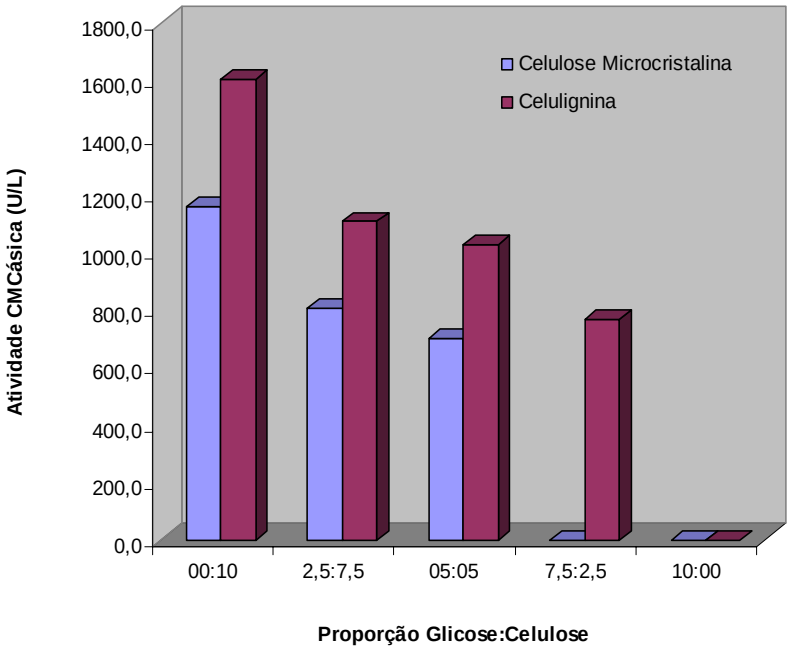


Figura 5.2. Produção de enzimas com atividade CMCásica em meios com diferentes proporções de glicose e celulose.

Sestak e Farkas (1993) estudaram a regulação metabólica da síntese de endoglucanase em *Trichoderma reesei* e verificaram que a glicose e outros monossacarídeos fosforiláveis aumentam a concentração de um possível repressor, glicose-6-fosfato, na célula, o qual pode causar o bloqueio na transcrição de genes EG (genes responsáveis pela produção de endoglucanases), mesmo em presença de indutores como celulose ou cAMP (adenosina monofosfato cíclico).

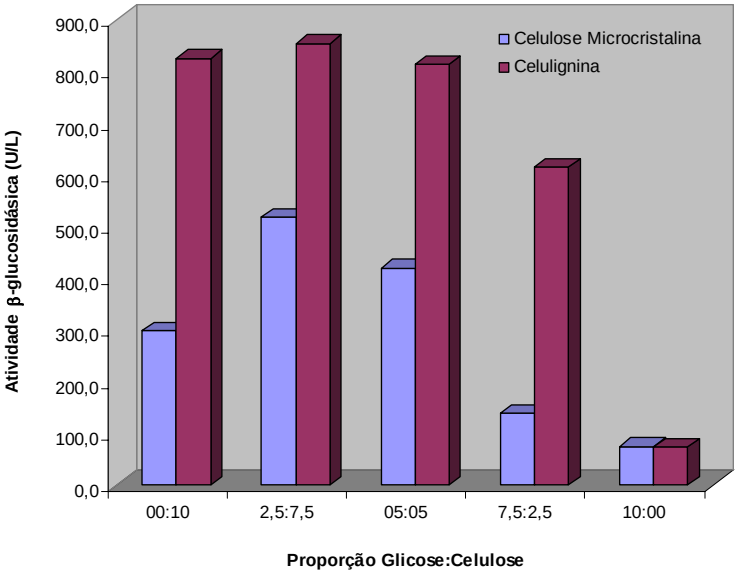


Figura 5.3. Produção de enzimas com atividade β-glucosidásica em meios com diferentes proporções de glicose e celulose.

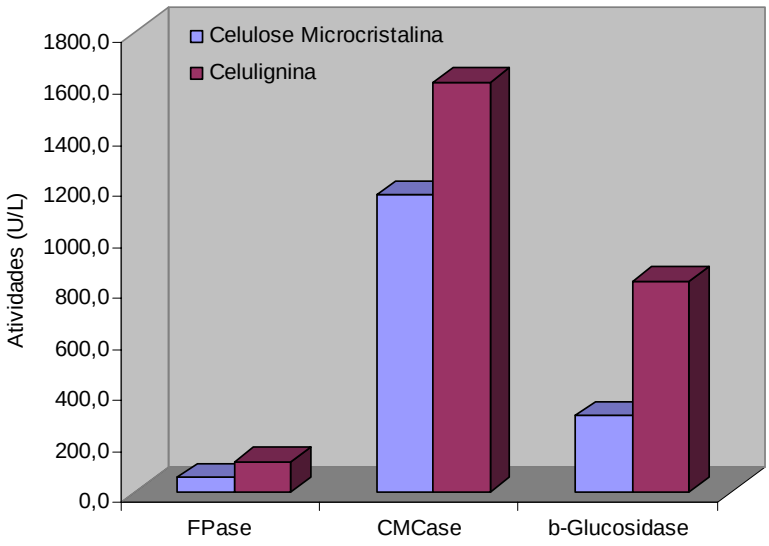


Figura 5.4. Atividades celulásicas produzidas em meio contendo como fonte de carbono, unicamente celulose microcristalina ou celulignina de bagaço de cana.

5.3. Planejamento sequencial para otimização da fonte de nitrogênio para produção de celulases por fermentação submersa de celulignina

O desenvolvimento da tecnologia de produção de qualquer biomolécula passa compulsoriamente pela otimização da composição do meio de cultivo. Neste sentido, realizaram-se inicialmente estudos de otimização da fonte de nitrogênio para a produção de celulases por *P. funiculosum*, tendo celulignina de bagaço de cana como fonte de carbono, na concentração de 15 g/L.

Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados do planejamento experimental fatorial 2^4. Neste planejamento, verificou-se que houve efeito das fontes de nitrogênio, com atividades variando de 39 a 172 U/L (atividade FPásica), de 1202 a 2261 U/L (atividade CMCásica) e 71 a 511 U/L (atividade β-glucosidásica). Por meio dos diagramas de Pareto para cada grupo de enzimas, constatou-se que a peptona pode ser excluída do planejamento seqüencial, uma vez que, estatisticamente, não apresentou importância significativa (p<0,05) para atividades FPásica e CMCásica e apresentou efeito negativo marginal para atividade β-glucosidasica. Este é um importante resultado, uma vez que a peptona é uma fonte de nitrogênio de alto custo.

Através do diagrama de Pareto, observou-se também que a uréia tem grande importância para expressão de enzimas com atividades FPásica e CMCásica. Já o sulfato de amônio apresentou efeito significativo positivo para a produção de β-glucosidase, ou seja, um aumento da concentração de sulfato de amônio do ponto mínimo para o máximo provocou um aumento da atividade β-glucosidásica. Quanto ao extrato de levedura, verificou-se um efeito significativo somente para atividade FPásica e teor protéico (Figuras 5.5 a 5.8).

O planejamento experimental 2^4 apresentou coeficiente de correlação, R^2, de 0,836; 0,873; 0,910 e 0,965 para as atividades FPásica, CMCásica, β-glucosidásica e teor protéico, respectivamente, mostrando que o modelo se ajustou aos resultados em, no mínimo, 83 % dos casos.

Tabela 5.3. Resultados do planejamento fatorial 2^4 para otimização da fonte de nitrogênio.

Experimento	Atividades (U/L)			Proteínas (mg/L) $R^2 = 0,965$
	FPásica $R^2 = 0,836$	CMCásica $R^2 = 0,873$	β-Glucosidásica $R^2 = 0,910$	
1	39,2	1327,6	170,5	30,0
2	87,1	1698,8	122,1	113,6
3	47,5	1331,6	473,5	90,3
4	71,1	1979,2	511,4	113,6
5	42,8	1457,9	155,7	247,2
6	83,6	2188,5	204,1	306,8
7	45,1	1343,4	385,1	250,4
8	112,0	1706,7	288,3	332,7
9	19,0	1256,5	113,6	225,1
10	145,9	2147,7	115,7	304,2
11	50,3	1592,2	244,1	238,7
12	91,7	1726,5	126,3	271,8
13	106,5	1202,5	71,5	258,8
14	171,6	2261,0	210,4	354,1
15	61,6	1434,2	233,6	251,7
16	81,8	1847,6	153,6	288,0
17 (C)	74,7	1726,5	223,1	273,1
18 (C)	69,7	1781,8	218,9	262,1
19 (C)	89,0	1752,8	225,8	267,9

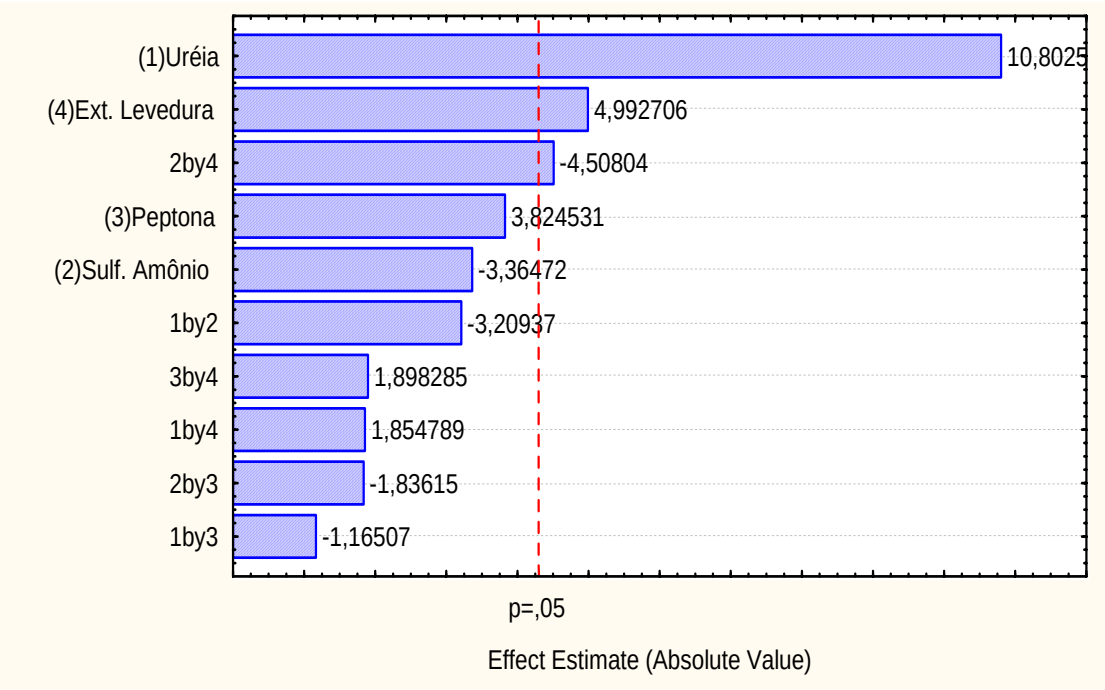


Figura 5.5. Diagrama de Pareto para atividade **FPásica**. Planejamento fatorial 2^4.

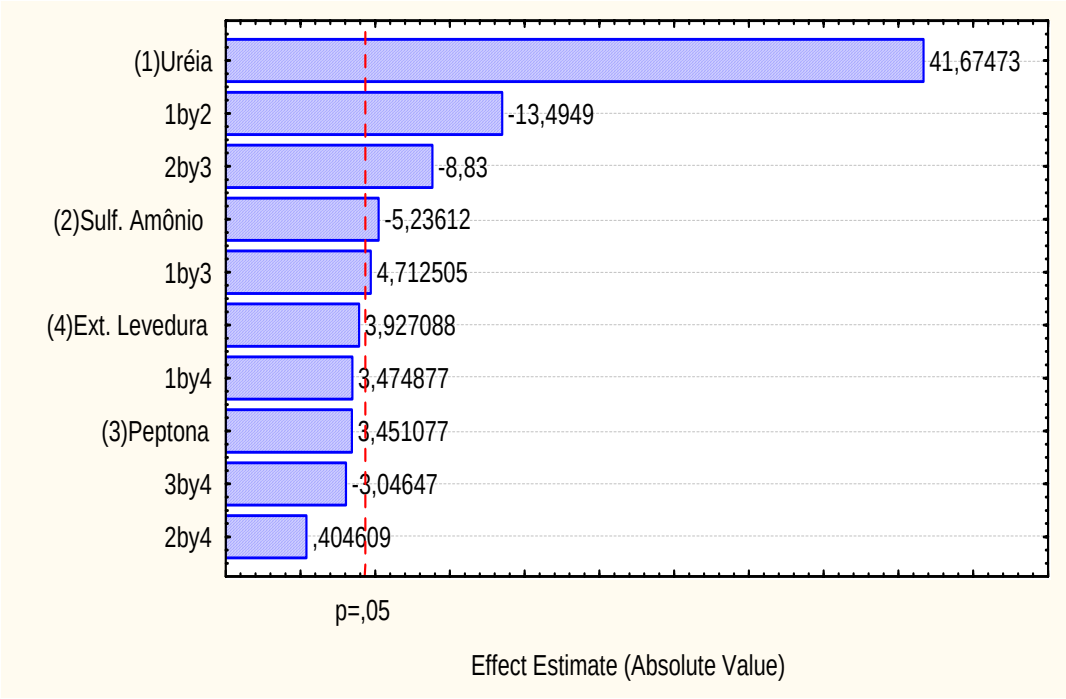


Figura 5.6. Diagrama de Pareto para atividade **CMCásica**. Planejamento fatorial 2^4.

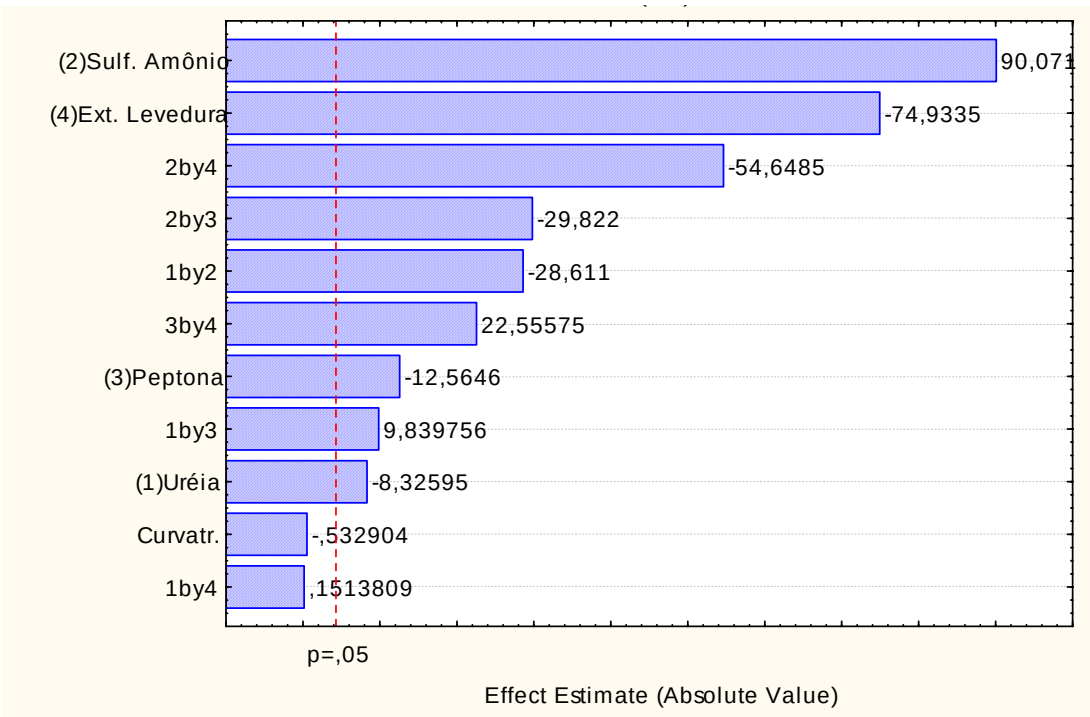


Figura 5.7. Diagrama de Pareto para atividade **β-glucosidásica**. Planejamento fatorial 2^4.

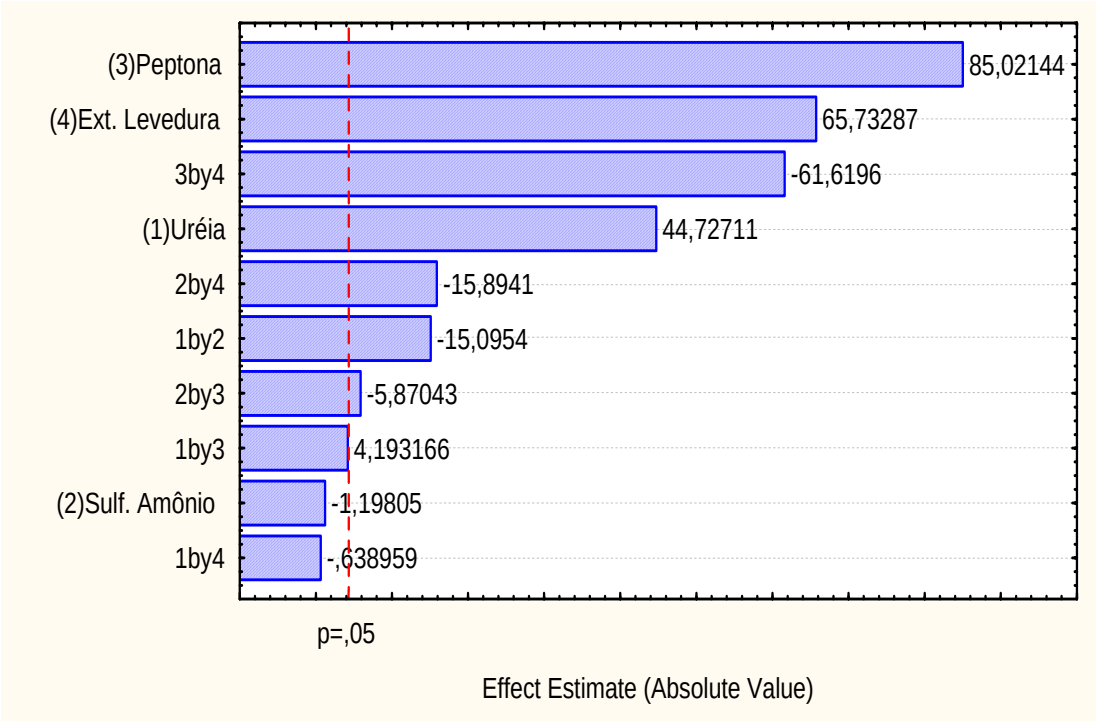


Figura 5.8. Diagrama de Pareto para o **teor protéico**. Planejamento fatorial 2^4.

Tendo em vista que se verificou efeito positivo e de grande importância, com exceção da peptona, das fontes de nitrogênio estudadas, e que a produção de celulases poderia ainda ser aumentada, realizou-se um segundo planejamento de experimentos, removendo a peptona e modificando os limites das concentrações das fontes de nitrogênio que permaneceram, conforme sinalizado pelo primeiro planejamento experimental.

Os resultados deste segundo planejamento revelaram um grande avanço no aumento das atividades enzimáticas, especialmente para a atividade CMCásica, passando de 2.261 U/L (valor máximo) no primeiro experimento, para 5.143 U/L, representando cerca de 100% de aumento.

Em relação à atividade FPásica, o aumento foi de 171,6 (valor máximo) para 250,0 U/L, correspondendo a um aumento de 46% em relação ao primeiro planejamento (Tabela 5.4). Verifica-se, ainda, que estas atividades podem ser ainda melhoradas já que os valores do ponto central ainda estão menores que os dos pontos fatoriais, indicando tendência de aumento no sentido do ponto máximo (Figuras 5.10, 5.12 e 5.14).

Avaliando-se os efeitos dos parâmetros, por meio do diagrama de Pareto, no segundo experimento (Figuras 5.9, 5.11 e 5.13), verificou-se que a uréia é a fonte de nitrogênio mais importante para a atividade de todos os grupos de celulases estudadas. Constatou-se ainda que esta fonte de nitrogênio apresentou efeito positivo, indicando que para o próximo planejamento, sua concentração pode ser ainda aumentada. Já o extrato de levedura apresentou efeito significativo para as atividades CMCásica e β-glucosidásica, logo, esta fonte foi mantida no terceiro planejamento da seqüência experimental.

O sulfato de amônio foi retirado do planejamento, uma vez que não apresentou efeito significativo sobre as atividades FPásica e β-glucosidásica. Entretanto, foi mantido na concentração de 4 g/L, uma vez que apresentou efeito marginal significativo para atividade CMCásica, com p_{valor} na mesma ordem de grandeza do limite de significância, conforme se observa da tabela da ANOVA (Tabelas 5.5, 5.6 e 5.7).

A análise de variância (ANOVA) mostra importantes dados do experimento como os valores de Probalidade de *Fisher*, cujo valor indica a significância dos fatores avaliados, suas interações, erros e a falta de ajuste do experimento. A soma dos quadrados dos fatores, interações e resíduos (*lack of fit* somado ao erro puro) são outros importantes indicadores na avaliação do experimento e escolha do modelo. Quanto maior o valor da soma dos quadrados maior é o efeito dos fatores avaliados.

No planejamento fatorial 2^3, verificou-se, através das tabelas da ANOVA, nas três atividades enzimáticas avaliadas, que os valores de Probabilidade de *Fisher* corroboram com os resultados do Diagrama de Pareto. Outro importante dado verificado foi a baixa relação entre a soma do quadrado da falta de ajustamento ou resíduo e a soma do quadrado total, representando apenas 4,24; 4,89 e 0,45% para as atividades FPásica, CMCásica e β-glucosidásica, respectivamente, o que indica que o modelo escolhido está adequado aos dados experimentais.

Por meio da Análise de Variância (ANOVA) verificou-se, também, que a curvatura foi significativa para as atividades FPásica e β-glucosidásica, sugerindo que há um ponto de máxima atividade. Além disso, os valores dos pontos centrais já se encontram próximos dos máximos obtidos na faixa estudada, demonstrando

assim, a necessidade de adição de pontos axiais ao experimento para otimização do meio de produção enzimática, uma vez que experimentos em fatoriais permitem apenas avaliação em modelos lineares. Dessa forma, o planejamento DCCR (Delineamento central composto rotacional) permitiu visualizar a superfície de resposta com valores máximos alcançáveis nas condições experimentais deste trabalho.

Tabela 5.4. Variáveis de resposta do segundo planejamento (fatorial 2^3) para otimização da fonte de nitrogênio.

Experimento	Atividades (U/L)			Proteínas (mg/L)
	FPásica R^2=95759	CMCásica R^2 =0,95104	β-Glucosidásica R^2 = 0,99549	R2 =0,9945
1	158,2	3995,1	834,8	43,5
2	201,7	4291,4	1540,3	44,4
3	137,4	3642,3	1021,5	82,2
4	240,0	4895,4	1701,9	119,4
5	191,5	4311,2	1311,0	310,3
6	220,8	4520,0	1716,6	88,0
7	140,7	4726,0	1344,8	60,8
8	175,4	5143,7	1728,4	119,7
9 (C)	224,9	4714,8	1622,6	60,4
10 (C)	234,2	4565,2	1687,2	70,6
11 (C)	250,1	4743,0	1713,0	79,5

Tabela 5.5. Tabela da ANOVA para atividade **FPásica**. Planejamento fatorial 2^3. R^2=0,95759.

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	*F*	p_{valor}
Curvatura	6167,73	1	6167,73	37,980	0,025
(1) Uréia	5516,14	1	5516,14	33,968	0,028
(2) Sulf. Amônio	776,43	1	776,43	4,781	0,160
(3) Extrato de Levedura	10,31	1	10,31	0,064	0,825
Interação 1 x 2	519,33	1	519,33	3,198	0,216
Interação 1 x 3	841,23	1	841,23	5,180	0,151
Interação 2 x 3	1615,33	1	1615,33	9,947	0,088
Lack of Fit	359,33	1	359,33	2,213	0,275
Erro puro	324,78	2	162,392		
Total	16130,61	10			

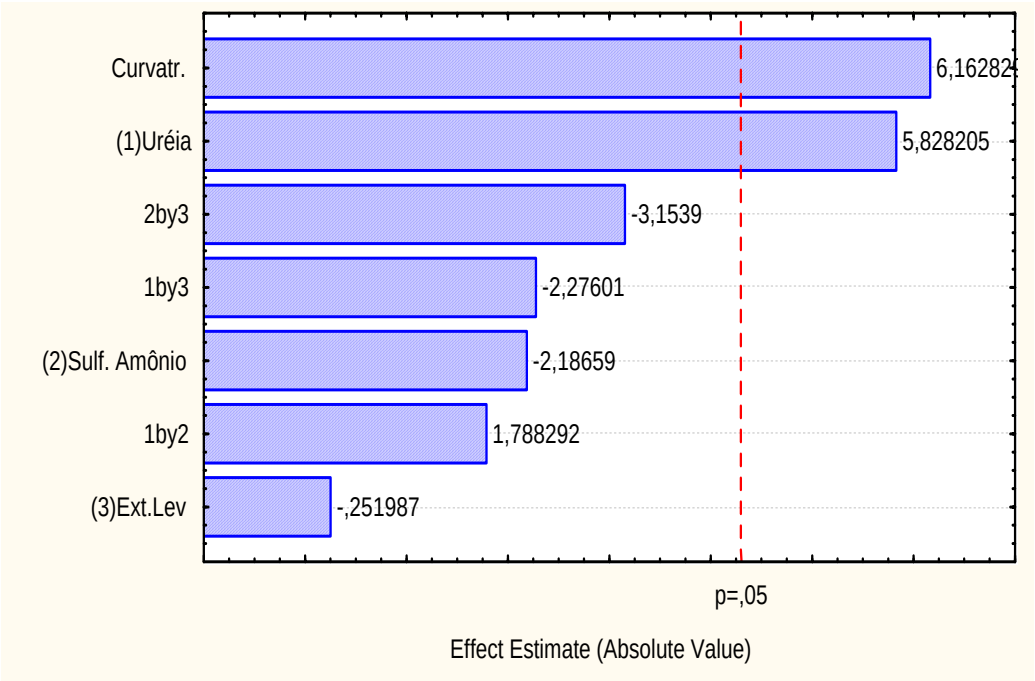


Figura 5.9. Diagrama de Pareto para atividade **FPásica**. Planejamento fatorial 2^3.

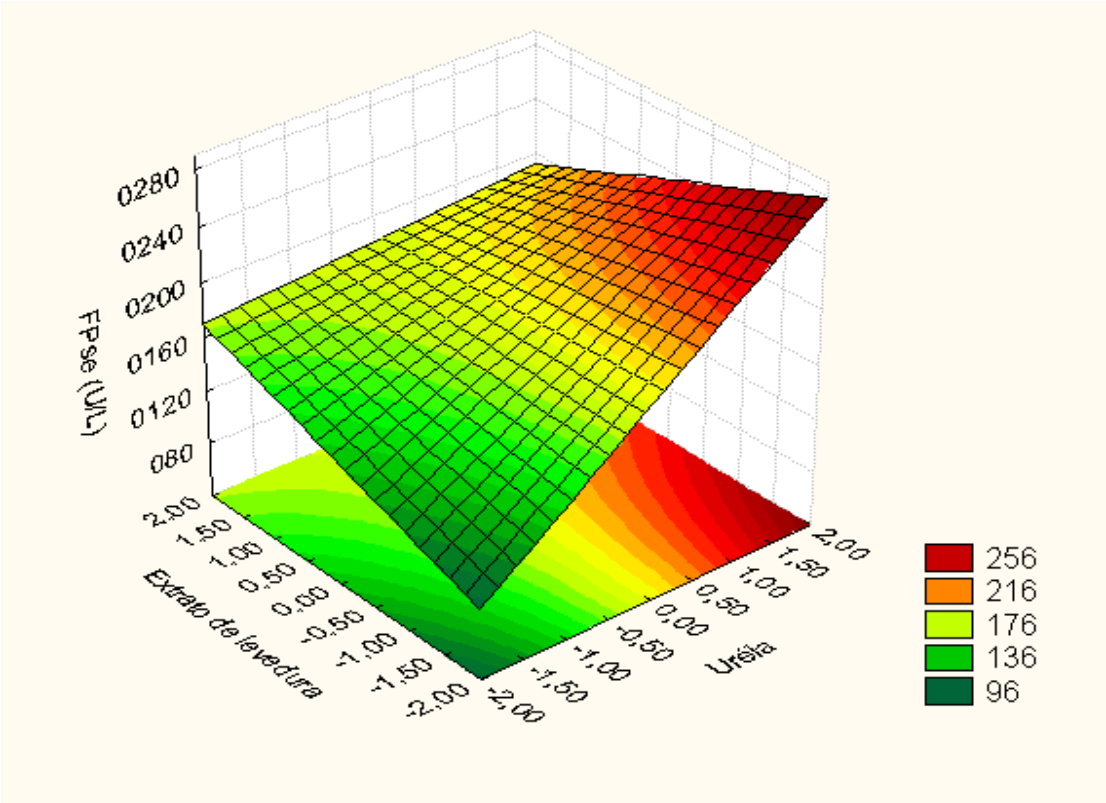


Figura 5.10. Superfície de resposta da atividade **FPásica** em função da uréia e extrato de levedura.

Tabela 5.6. Tabela da ANOVA para atividade **CMCásica**. Planejamento fatorial 2^3. R^2=0,95104.

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	*F*	p_{valor}
Curvatura	119115	1	119114,6	13,04	0,069
(1)Uréia	591823	1	591823,1	64,82	0,015
(2)Sulf. Amônio	207929	1	207929,2	22,77	0,041
(3)Extrato de Levedura	440277	1	440277,4	48,22	0,020
Interação 1 x 2	169818	1	169817,8	18,60	0,050
Interação 1 x 3	106458	1	106458,1	11,66	0,076
Interação 2 x 3	77498	1	77498,2	8,49	0,100
Lack of Fit	69916	1	69915,7	7,66	0,110
Erro puro	18261	2	9130,3		
Total	1801095	10			

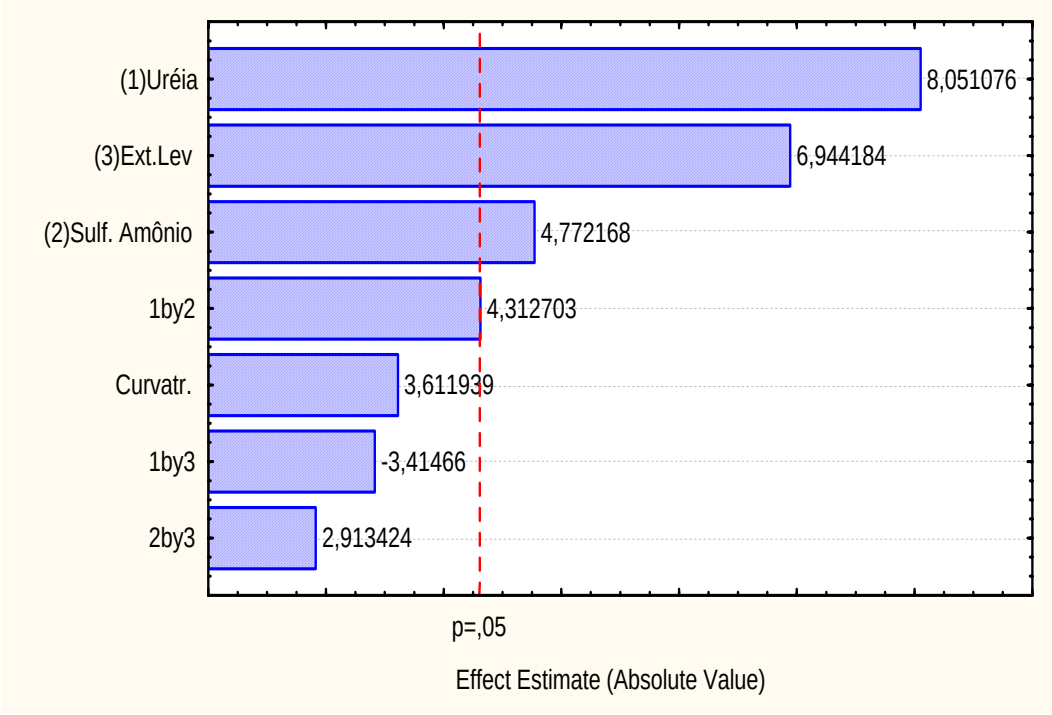


Figura 5.11. Diagrama de Pareto para atividade **CMCásica**. Planejamento fatorial 2^3.

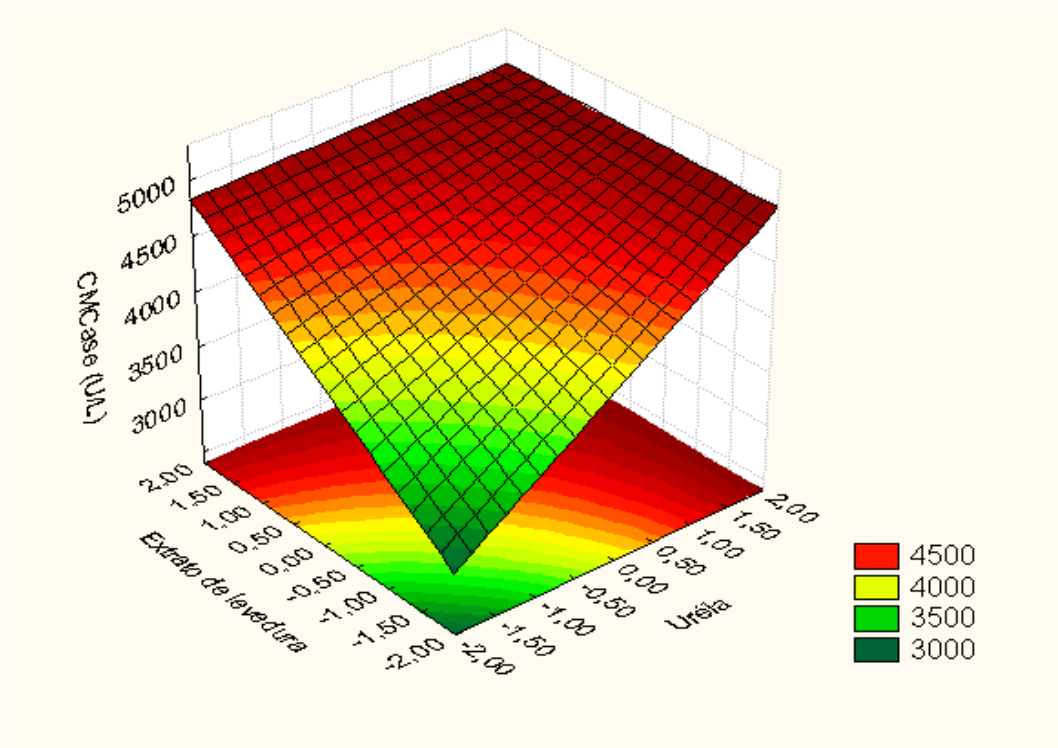


Figura 5.12. Superfície de resposta da atividade **CMCásica** em função da uréia e extrato de levedura.

Tabela 5.7. Tabela da ANOVA para atividade **β-glucosidásica**. R^2=0,99549. Planejamento fatorial 2^3.

Causas da variação	**Soma dos quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**	***F***	p_{valor}
Curvatura	164219,0	1	164219,0	75,71	0,0129
(1)Uréia	591432,0	1	591432,0	272,687	0,0036
(2)Sulf. Amônio	19393,3	1	19393,3	8,941	0,0960
(3)Extrato de Levedura	125588,6	1	125588,6	57,904	0,0168
Interação 1 x 2	276,5	1	276,5	0,128	0,7552
Interação 1 x 3	44507,5	1	44507,5	20,521	0,0454
Interação 2 x 3	11458,2	1	11458,2	5,283	0,1483
Lack of Fit	1,1	1	1,1	0,0005	0,9842
Erro puro	4337,8	2	2168,9		
Total	961214,0	10			

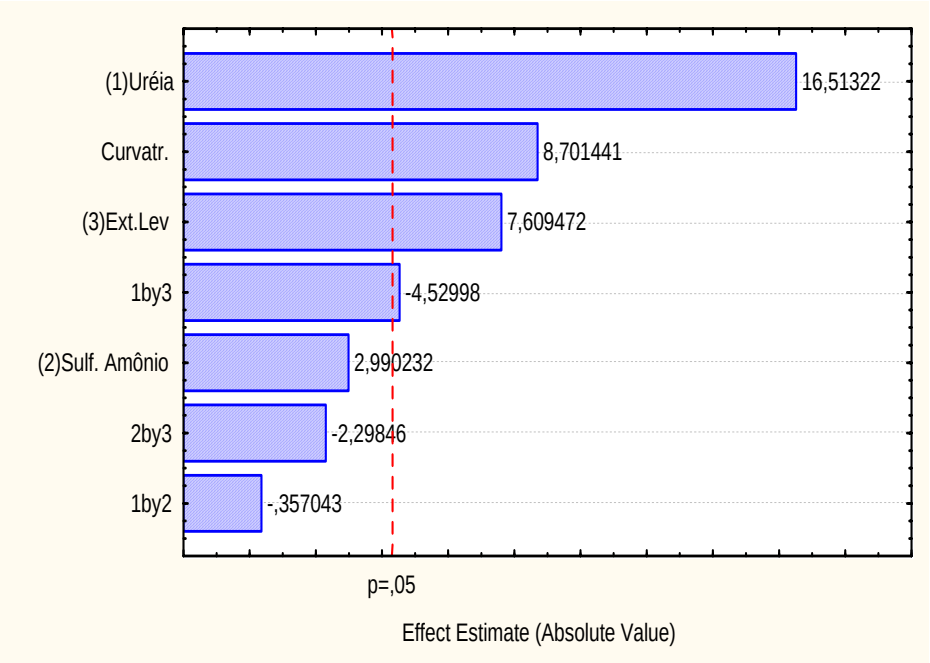


Figura 5.13. Diagrama de Pareto para atividade **β-glucosidásica**. Planejamento fatorial 2^3.

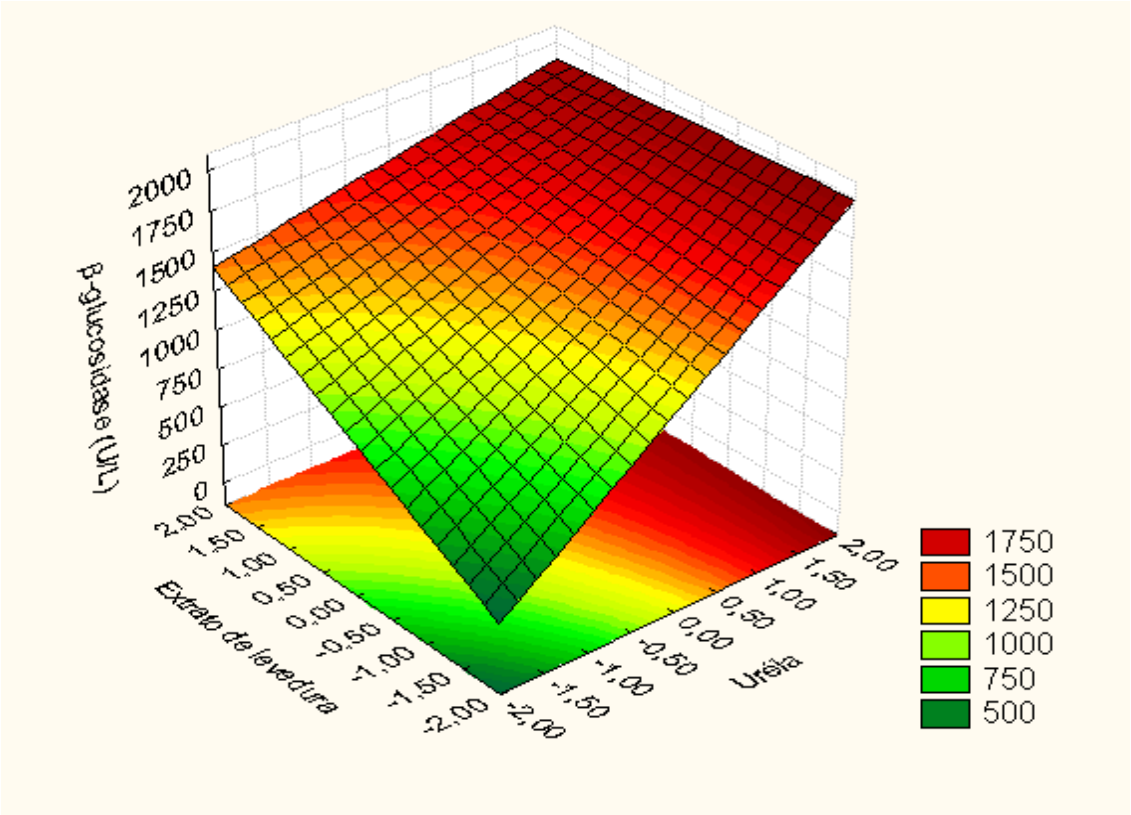


Figura 5.14. Superfície de resposta da atividade **β-glucosidásica** em função da uréia e extrato de levedura.

Visando identificar pontos de máximo para as três atividades enzimáticas em estudo, já que a análise estatística apontou para a existência de curvatura, realizou-se um último planejamento experimental, no qual foram adicionados pontos axiais que permitem predizer valores ótimos de concentração das fontes de nitrogênio avaliadas. Desta forma, empregou-se o planejamento de experimentos central composto rotacional (DCCR). Os resultados deste planejamento estão apresentados na Tabela 5.8 para as três atividades enzimáticas, bem como as respectivas tabelas da análise de variância (Tabelas 5.9, 5.10 e 5.11).

Tabela 5.8. Resultados do terceiro planejamento (DCCR) para otimização da fonte de nitrogênio.

Experimento	**Atividades (U/L)**		
	FPásica	**CMCásica**	**β-Glucosidásica**
1	157,9	4029,0	727,1
2	171,3	4353,5	1119,1
3	165,7	5301,8	1080,3
4	243,8	5513,4	1100,9
5	147,5	4480,5	743,0
6	263,3	6529,4	1213,3
7	208,0	5459,8	1084,9
8	255,1	7105,2	1435,1
9 (C)	250,1	5363,9	1390,2
10 (C)	269,3	5523,9	1499,0
11 (C)	260,5	5792,8	1420,2

Comparando-se os resultados otimizados com os obtidos nos pontos centrais do planejamento fatorial 2^4 (primeiro Planejamento), cuja composição da fonte de nitrogênio foi a adotada por Mandels e Weber (1969), observou-se um ganho significativo nas atividades dos três grupos celulásicos estudados. Ao final da otimização da fonte de nitrogênio, a atividade FPásica passou de 77,8 UI/L para 260,0 UI/L; a atividade CMCásica de 1.753,7 UI/L para 5.560,2 UI/L (média do ponto central) a 7.105,2 UI/L (experimento 8) e a atividade β-glucosidásica de 222,6 UI/L para 1.499,0 UI/L, correspondendo a um aumento de, aproximadamente, 3 vezes para as atividades FPásica e CMCásica e 7 vezes em relação à atividade β-glucosidásica.

Por meio da análise de variância (ANOVA), verificou-se que não houve interação significativa entre a uréia e o extrato de levedura para nenhum dos grupos

de celulases produzidos pelo fungo filamentoso em estudo, o que significa que cada uma apresentou efeito linear isolado, sem interferência uma na outra. A não interação entre a uréia e o extrato de levedura vem sendo observada em todas as etapas dos planejamentos experimentais seqüenciais.

Corroborando com o segundo experimento (fatorial 2^3), que apresentou curvatura significativa, no terceiro experimento observou-se efeito quadrático significativo para as atividades FPásica e β-glucosidásica, indicando assim comportamento curvilíneo e convexo (efeito quadrático negativo) em determinada região da superfície de resposta. Em relação ao *lack of fit* ou a falta de ajuste do modelo, verificou-se que não foi significativo (p>0,05), ou seja, o modelo se ajustou adequadamente aos pontos experimentais, representando com confiabilidade os resultados.

Tabela 5.9. Tabela da ANOVA para atividade **FPásica**. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Causas da variação	**Soma dos quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**	***F***	p_{valor}
(1) Uréia (L)	8132,95	1	8132,955	88,42	0,011
Uréia (Q)	7209,91	1	7209,912	78,39	0,012
(2) Extrato de Levedura (L)	2693,02	1	2693,021	29,28	0,032
Extrato de Levedura (Q)	2898,94	1	2898,940	31,52	0,030
Interação 1L x 2L	1048,12	1	1048,121	11,39	0,078
Lack of Fit	2961,58	3	987,195	10,73	0,086
Erro puro	183,96	2	91,979		
Total	23141,82	10			

Tabela 5.10. Tabela da ANOVA para atividade **CMCásica**. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Causas da variação	**Soma dos quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**	***F***	p_{valor}
(1)Uréia (L)	1473886	1	1473886	31,364	0,030
Uréia (Q)	512272	1	512272	10,901	0,081
(2)Extrato de Levedura (L)	2831711	1	2831711	60,258	0,016
Extrato de Levedura (Q)	43303	1	43303	0,921	0,438
Interação 1L x 2L	3186	1	3186	0,068	0,819
Lack of Fit	3093423	3	1031141	21,942	0,044
Erro puro	93986	2	46993		
Total	8200284	10			

Tabela 5.11. Tabela da ANOVA para atividade **β-glucosidásica**. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Causas da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p_{valor}
(1)Uréia(L)	145154,2	1	145154,2	46,036	0,021
Uréia (Q)	373622,6	1	373622,6	118,494	0,008
(2)Extrato de Levedura (L)	86185,8	1	86185,8	27,334	0,035
Extrato de Levedura (Q)	76366,9	1	76366,9	24,220	0,039
Interação 1L x 2L	34504,9	1	34504,9	10,943	0,080
Lack of Fit	36382,9	3	12127,6	3,846	0,213
Erro puro	6306,2	2	3153,1		
Total	692364,9	10			

Por meio do diagrama de Pareto (Figuras 5.15, 5.16 e 5.17) verifica-se que ambas as fontes de nitrogênio apresentaram efeito quadrático significativo, com exceção para atividade CMCásica, confirmando que, para este grupo de enzima, a faixa de concentração das fontes de nitrogênio (uréia e extrato de levedura) poderia ser ainda maior, uma vez que a falta do efeito quadrático e com efeito linear positivo, indicou um modelo linear, com tendência ao aumento da concentração das fontes de nitrogênio estudadas.

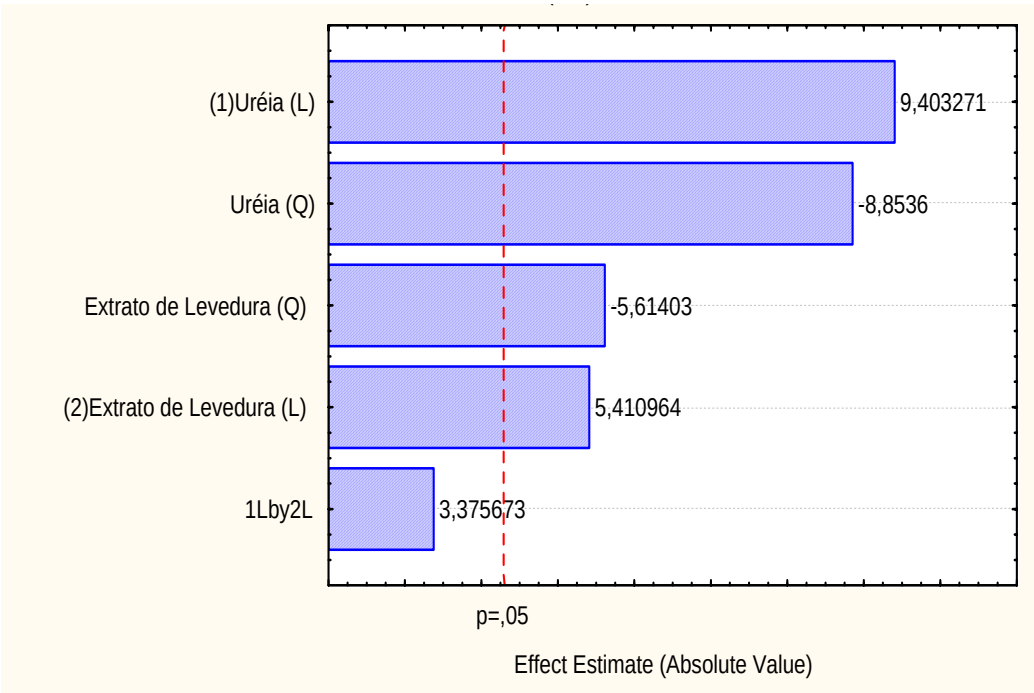


Figura 5.15. Diagrama de Pareto para atividade **FPásica**. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

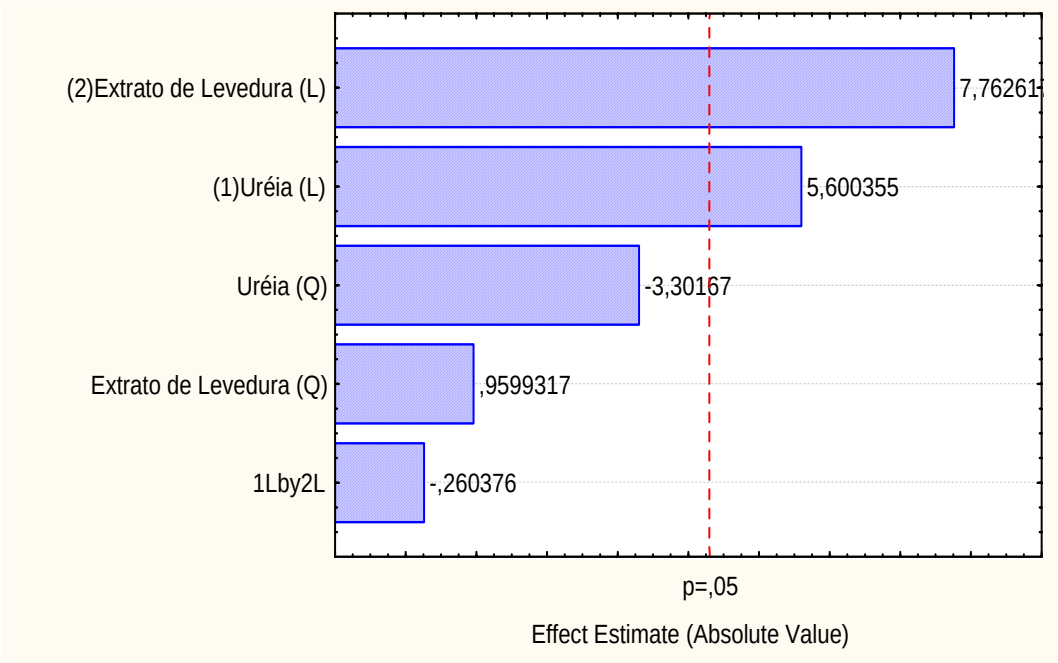


Figura 5.16. Diagrama de Pareto para atividade **CMCásica**. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

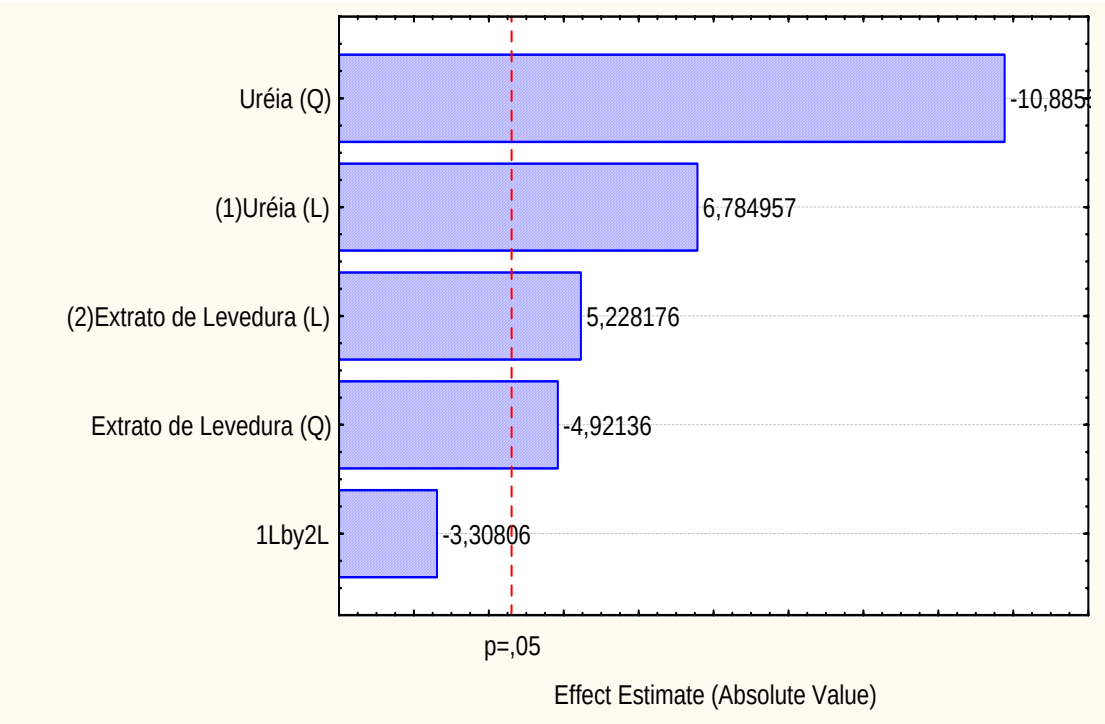


Figura 5.17. Diagrama de Pareto para atividade **β-glucosidásica**. Delineamento composto central rotacional (DCCR).

Nas Figuras 5.18, 5.19 e 5.20 estão apresentadas as superfícies de resposta do experimento. Observou-se para atividade FPásica e β-glucosidásica um ponto de máximo relativamente semelhante entre os dois grupos enzimáticos. Já para atividade CMCásica, verifica-se que poderia ser ainda aumentada, entretanto, como pode-se observar, o aumento dos níveis de uréia e extrato de levedura poderá agir de forma oposta às atividades FPásica e β-glucosidásica.

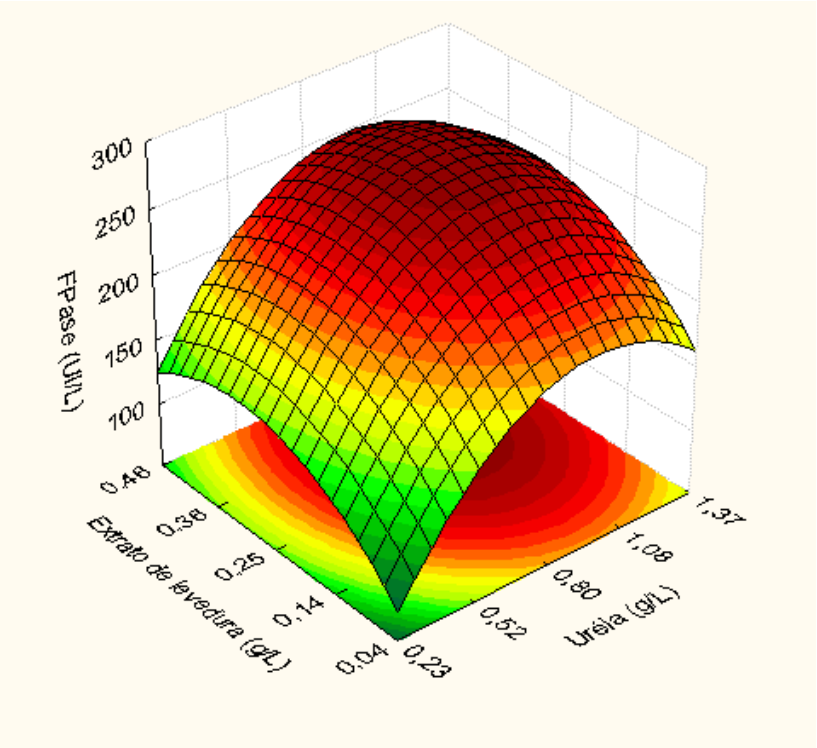


Figura 5.18. Superfície de resposta da otimização da fonte de nitrogênio para atividade **FPásica.**

Estes resultados são promissores ao serem comparados com os dados obtidos por Carvalho (2007), que após otimizar tanto fontes de nitrogênio quanto fontes de minerais, em frascos agitados, alcançou atividade FPásica de aproximadamente 170 U/L, CMCásica entre 4.400 e 5.600 U/L e β-glucosidásica de 1.300,0 U/L. Por outro lado, os valores alcançados nesta etapa do presente estudo são menores quando comparados com atividades obtidas em biorreator instrumentado no trabalho de Carvalho (2007), cuja atividade FPásica foi de 508, CMCásica de 9.204 e β-glucosidásica de 2.395 UI/L.

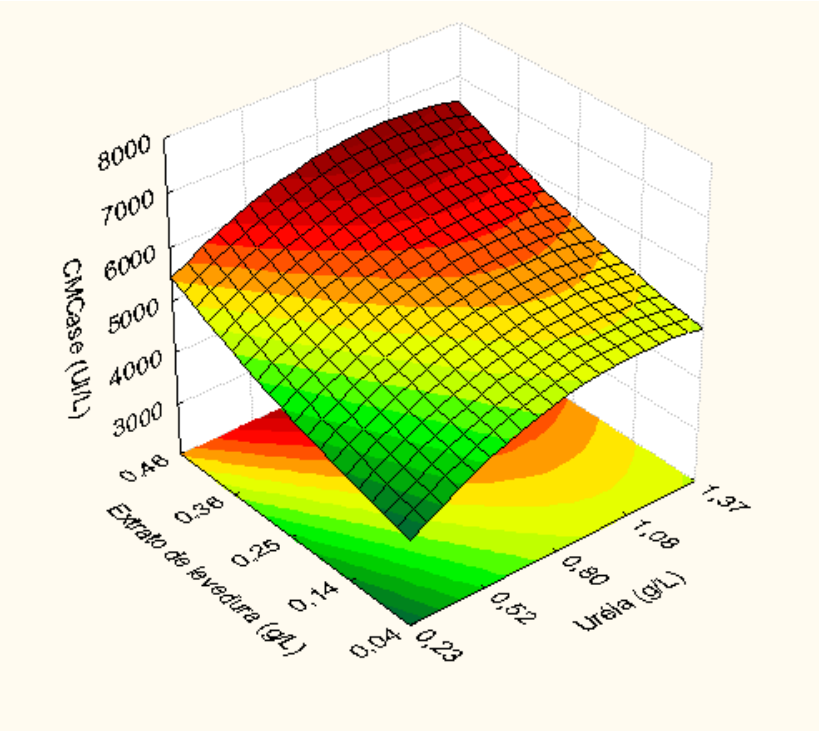


Figura 5.19. Superfície de resposta da otimização da fonte de nitrogênio para atividade **CMCásica.**

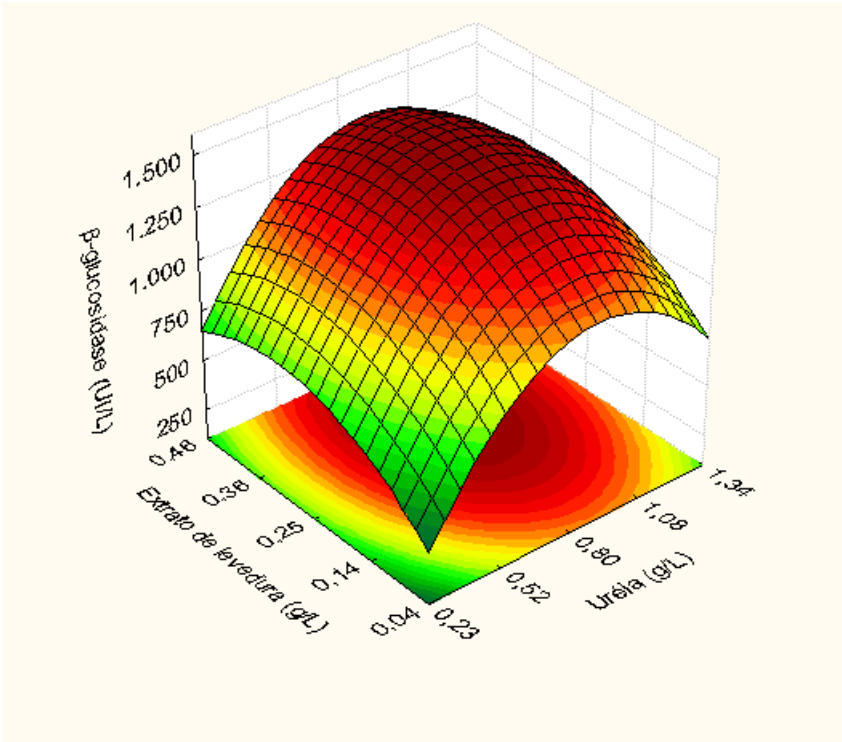


Figura 5.20. Superfície de resposta da otimização da fonte de nitrogênio para atividade **β-glucosidásica**.

Martins *et al*. (2008) avaliaram a produção de celulases por *Penicillium echinulatum* em diversos substratos e obtiveram valores de atividade FPásica de 270 UI/L, CMCásica de 1.530 UI/L e β-glucosidásica de 190 UI/L ao final de 192 h de fermentação. Jorgensem e Olsson (2006) produzindo celulases de *Penicillium brasianum*, obtiveram atividade FPásica de 360 UI/L e 590 UI/L em meio contendo como substrato Sigmacell e madeira pré-tratada a vapor, após 165 h de fermentação.

Os fungos filamentosos podem usar uma surpreendente diversidade de compostos como fontes de nitrogênio; no entanto, certos compostos nitrogenados como amônia, glutamina e glutamato, são fontes preferenciais de nitrogênio por estes agentes biológicos. Entretanto, quando estas fontes primárias de nitrogênio não estão disponíveis ou estão presentes em baixas concentrações a ponto de limitar o crescimento, diversas fontes diferentes podem ser usadas, como nitrato, nitrito, purina e amidas, aminoácidos e proteínas. A utilização de qualquer das fontes secundárias é altamente regulada e quase sempre requer a formação de uma via catabólica específica, ou seja, o microrganismo necessita se adaptar, criando uma via específica na ausência de uma fonte preferencial (MARZLUF, 1997).

Na natureza, o nitrogênio amoniacal é o primeiro produto formado no processo de decomposição de matéria orgânica, especificamente de uréia, por microrganismos decompositores, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A uréia é um composto orgânico facilmente convertido a amônia e, possivelmente por esta razão, foi a fonte de maior importância para as atividades celulásicas. De acordo com Marzluf (1997), o controle do nitrogênio secundário envolve a ativação de genes, a qual é bloqueada na presença de uma fonte preferencial. Por esta razão, o sulfato de amônio mostrou-se sem efeito significativo para atividade FPásica e na produção de β-glucosidases. Entretanto, o extrato de levedura, uma fonte secundária de nitrogênio (nitrogênio amino) apresentou efeito significativo positivo na produção de celulases. Isto se deve ao fato do extrato de levedura ser não somente fonte de nitrogênio, mas também fonte de vitaminas, em especial do complexo B, que são de grande importância na regulação do metabolismo. Estas vitaminas são importantes na síntese de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), entre outros, que são cofatores

enzimáticos essenciais no funcionamento de enzimas ligadas às vias glicolíticas, ciclo de ácido tricarboxílico entre outras do metabolismo celular.

5.4. Validação da otimização das fontes de nitrogênio

Com objetivo de validar a otimização das fontes de nitrogênio foi gerado um modelo matemático para predizer os valores ótimos das fontes de nitrogênio e as atividades alcançáveis nestas condições. Desta forma, foram realizados experimentos para validar os valores preditos pelos modelos.

Na Tabela 5.12 estão apresentados os valores preditos para as atividades celulásicas e valor *Desirability* da otimização da fonte de nitrogênio. O valor da função *Desirability* para se atingir o ótimo das três atividades simultaneamente, de 0,872, indicou que a otimização por esta função atende 87,2 % do máximo obtenível. Os valores ótimos para uréia e extrato de levedura foram de 0,97 g/L e 0,36 g/L, respectivamente. Na Figura 5.21 pode ser visualizada a superfície de resposta da função *Desirability*.

Os modelos matemáticos que representaram a produção de celulases, nas condições experimentais deste estudo, estão representados nas equações que se seguem:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot Ur^2 + \beta_2 \cdot El^2 + \beta_3 \cdot Ur + \beta_4 \cdot El + \beta_5 \cdot Ur \cdot El + \varepsilon$$

Equação 7

Onde:
Ur = Uréia
El = Extrato de levedura
ε = Erro puro

$$Atividade\ FPásica = 259{,}97 - 35{,}73\,Ur^2 - 22{,}66\,El^2 + 31{,}88\,Ur + 18{,}35\,El + 2{,}769$$

Equação 8

$$Atividade\ CMCásica = 5560{,}19 - 301{,}19\,Ur^2 + 87{,}57\,El^2 + 429{,}23\,Ur + 594{,}95\,El - 28{,}22\,Ur \times El + 62{,}579$$

Equação 9

$$Atividade\ \ \beta-glucosidás\ \ ica = 1436,47 - 257,22\ Ur^2 - 116,29\ El^2 + 134,70\ Ur + 103,79\ El + 16,210$$

Equação 10

Tabela 5.12. Valores preditos das atividades celulásicas conforme a função *Desirability*.

Atividades (U/L)	Limites		Valor predito	Resultado experimental
	-0,95%	+0,95%		
FPase (UI/L)	220,5	286,7	253,6	227,2 ± 6,3
CMCase (UI/L)	5805,4	6759,4	6282,4	6916,7 ± 241,5
β-Glucosidase (U/L)	1324,6	1571,8	1448,2	1374,7 ± 59,3

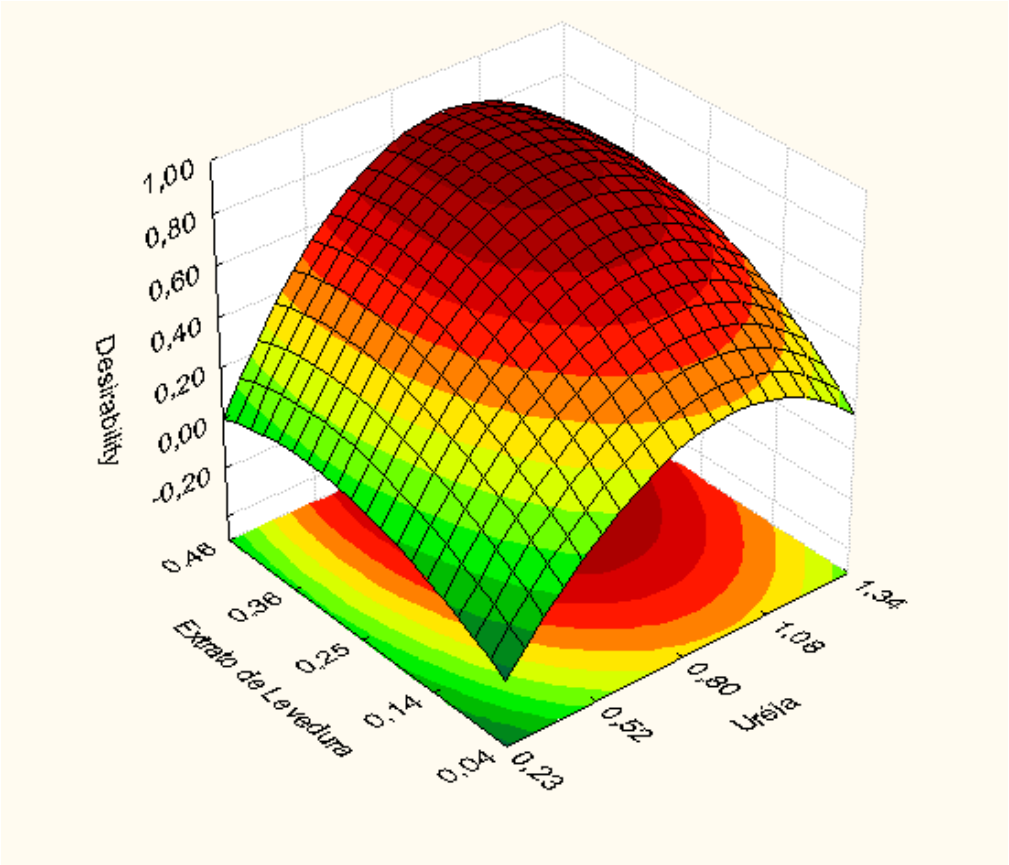


Figura 5.21. Superfície da função *Desirability* para otimização das fontes de nitrogênio para produção de celulases por *Penicillium funiculosum*.

5.5 Produção de celulases em biorreator

A produção de celulases em biorreator foi realizada utilizando o meio de cultivo nas condições otimizadas de fontes de nitrogênio. Na etapa de produção de celulases em biorreator, avaliou-se a forma de obtenção e o tamanho do inóculo.

5.5.1 Avaliação da forma de obtenção do inóculo

Na Figura 5.22 pode-se observar os perfis cinéticos da produção de celulases por *P. funiculosum*. Verifica-se que no biorreator G (Figura 5.22a), inoculado com células crescidas em meio contendo glicose como única fonte de carbono, ao final de 156 h de fermentação, foram alcançadas atividades de 540,0 U/L (FPásica), 6.865,2 U/L (CMCásica) e 1.691,7 U/L (β-glucosidásica). Observa-se um período de 60 (CMCásica) a 84 h (FPásica e β-glucosidásica) para o início da produção de celulases. O longo período para o início da produção é indesejável, naturalmente. Para reduzir este tempo, foram realizadas mais duas fermentações nas mesmas condições, diferenciando apenas a forma de preparo do inóculo. Neste segundo experimento, as células do pré-inóculo foram crescidas inicialmente em glicose e depois aclimatadas em meio contendo celulignina de bagaço de cana como única fonte de carbono (biorreator G+C). Neste caso (Figura 5.22b), atingiram-se valores de atividades enzimáticas de 482,0 U/L (FPásica), 7.044,0 U/L (CMCásica) e 1.906,6 U/L (β-glucosidásica) ao final de 72 h de fermentação, e conseqüentemente, a produtividade volumétrica foi aumentada. Da mesma forma, o biorreator GC, ou seja aquele em que as células foram crescidas em meio contendo glicose e celulignina de bagaço de cana, atingiram-se os mesmos patamares de atividades alcançados com o biorreator G+C em 72 h (Figura 5.22c). No entanto, do ponto de vista tecnológico, o biorreator GC apresenta vantagens uma vez que o tempo de produção de inóculo para o biorreator G+C foi de 120 h dividido em duas etapas, a primeira com glicose e a segunda, de aclimatação em meio contendo celulignina, enquanto o tempo de produção de inóculo no biorreator GC foi de 72 h em uma única etapa.

A indução e a via de secreção de celulases são altamente reguladas por diversos mecanismos. No modelo de indução em *Penicillium purpurogenum*, Suto e Tomita (2001) propuseram que as celulases constitutivas degradam a celulose a celooligossacarídeos e glicose. Estes sacarídeos entram na célula e a glicose é assimilada como fonte de carbono. A β-glucosidase intracelular converte

celooligossacarídeos de pequeno tamanho a glicose e posteriormente à gentiobiose, por transglicosilação. A gentiobiose formada induz a síntese de celulases e estas são excretadas ao meio externo, hidrolisando celulose e ocasionando liberação de glicose e celooligossacarídeos, que são absorvidos pela célula, recomeçando o ciclo, como mostrado na Figura 2.8, item 2.1.8.

No meio contendo somente glicose como fonte de carbono como no pré-inóculo do biorreator G, esta via ainda não está formada uma vez que o microrganismo dispõe de uma fonte de carbono facilmente assimilável. Sendo assim, ao passar o micélio de um meio rico em glicose para um meio contendo celulose como única fonte de carbono, o fungo *P. funiculosum* necessitou de 60 a 84 h para secretar celulases em níveis detectáveis pelo método empregado. Já no biorreator G+C, assim como no GC, a fase de adaptação ocorreu no período de produção do inóculo (pré-inóculo). Sendo assim, o microrganismo foi inoculado com os mecanismos de produção e secreção já formados, permitindo menor tempo de operação do biorreator principal, o de produção de celulases.

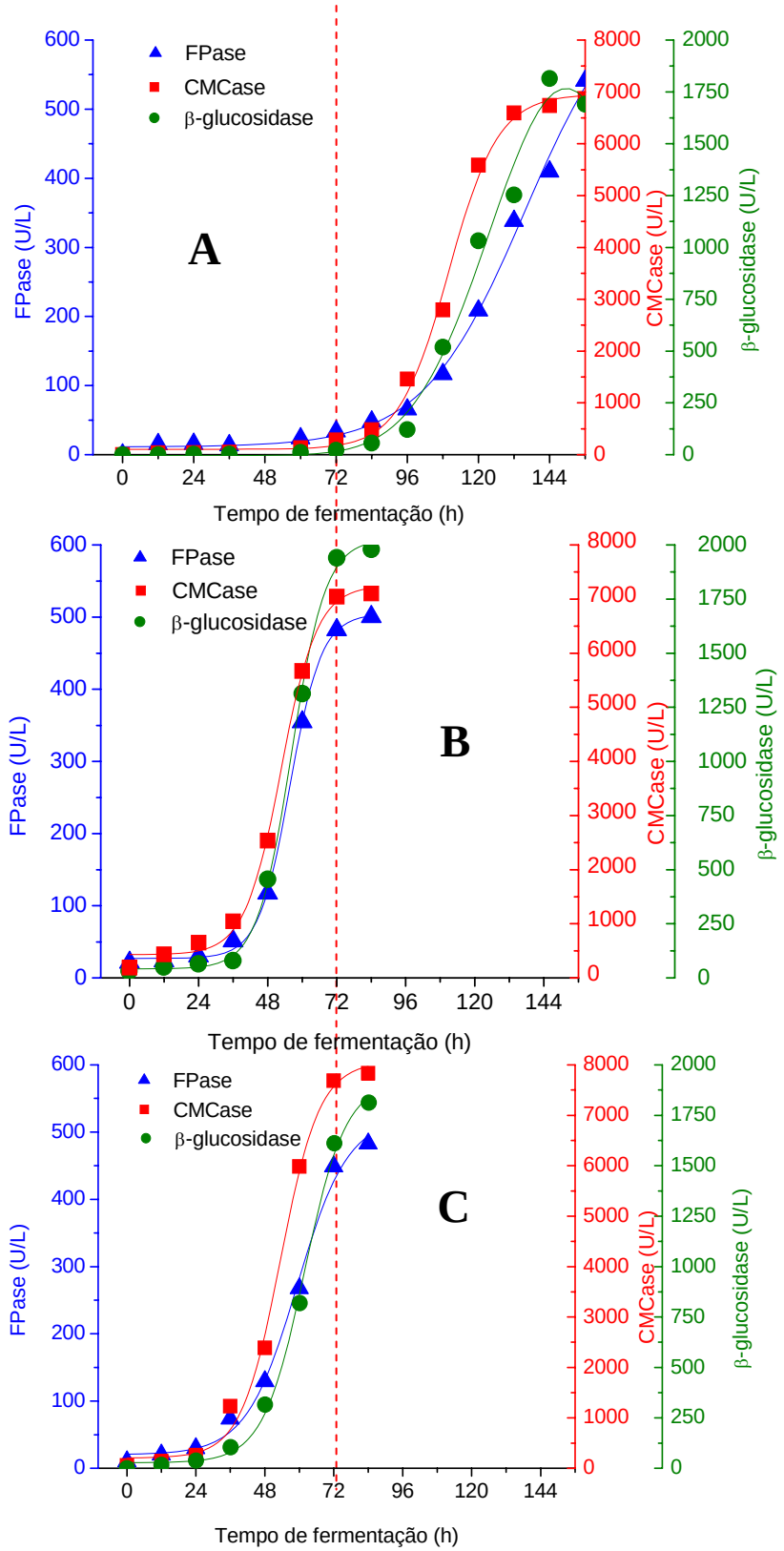


Figura 5.22. Perfil cinético da produção de celulases por *P. funiculosum* em biorreator. **A**, biorreator inoculado com microrganismo crescido em meio contendo glicose (G); **B**, biorreator inoculado com microrganismo crescido em meio contendo glicose e aclimatado em meio contendo celulignina (G+C); e **C**, biorreator inoculado com microrganismo crescido em meio contendo glicose e celulignina (GC).

5.5.2 Efeito do tamanho de inóculo

Os perfis de produção de celulases com diferentes tamanhos de inóculo (5 e 10% v/v) estão apresentados na Figura 5.23. Observa-se que a produção de celulases no biorreator inoculado com 10% de pré-inóculo foi superior, com aumento de 88, 84 e 42% para atividades FPásica, Avicelásica e CMCásica, respectivamente. Em relação à atividade β-glucosidásica, verificou-se um aumento de apenas 4%. Além do aumento de produção de enzimas, com inóculo de 10 % v/v, constatou-se que a produção de celulases ocorreu em menor tempo, tendo sido reduzido de 72 para 60 h. Conseqüentemente, a produtividade volumétrica (Q_P) aumentou quando se utilizou a maior concentração de inóculo.

Na Tabela 5.13 pode-se observar que a produtividade volumétrica (Q_P) no biorreator inoculado com 10% de pré-inóculo foi superior à obtida no biorreator inoculado com 5%, durante todo o processo. Da mesma forma, o teor de proteínas foi maior e a produção mais rápida no biorreator inoculado com o maior tamanho de inóculo (Figura 5.24). O aumento da atividade celulásica no meio é concomitante com o aumento da produção de proteínas secretadas pelo microrganismo. Por meio da Figura 5.25, que exibe a atividade específica das celulases, observa-se que no que concerne às atividades FPásica e Avicelásica, estas se mantiveram constantes durante todo o período de fermentação, indicando que as enzimas exoglucanásicas são produzidas seguindo o mesmo perfil cinético da produção de proteínas. Por outro lado, as atividades CMCásica se destacaram por um aumento da atividade específica até 36 h (biorreator inoculado com 10% v/v) e 48 h (reator inoculado com 5% v/v), mostrando um aumento da proporção de endoglucanases em relação ao total de proteínas produzidas. Após o período de máxima atividade específica para CMCases, observa-se um declínio, provocado, provavelmente, pela produção de outras proteínas. Esta diminuição da atividade específica de CMCases coincide com o aumento da atividade específica de β-glucosidases. A maior produção de CMCases (ou endoglucanases) na fase inicial (36 a 48 h); a produção constante de Avicelase (ou exoglucanases) durante todo o período de fermentação; e a maior proporção de β-glucosidases após 36 a 48 h, é um comportamento que se assemelha ao modo de ação sinérgico das celulases, as quais atuam em duas fases distintas: a hidrólise primária e a secundária. A hidrólise primária ocorre na superfície dos substratos sólidos liberando açúcares solúveis com grau de polimerização de

até 9 unidades indo para 6 na fase de liquefação pela ação de endoglucanases e exoglucanases. Na hidrólise secundária, que ocorre na fase pós-liquefação, primeiramente há a hidrólise da celobiose a glicose pela ação das β-glucosidases (ZHANG e LYND, 2004). Essas diferenças nas proporções que as celulases são produzidas podem ser regidas por fatores como alterações químicas do meio de cultivo durante a fermentação (aumento e/ou diminuição da substância indutora); e, as necessidades fisiológicas associadas ao crescimento celular.

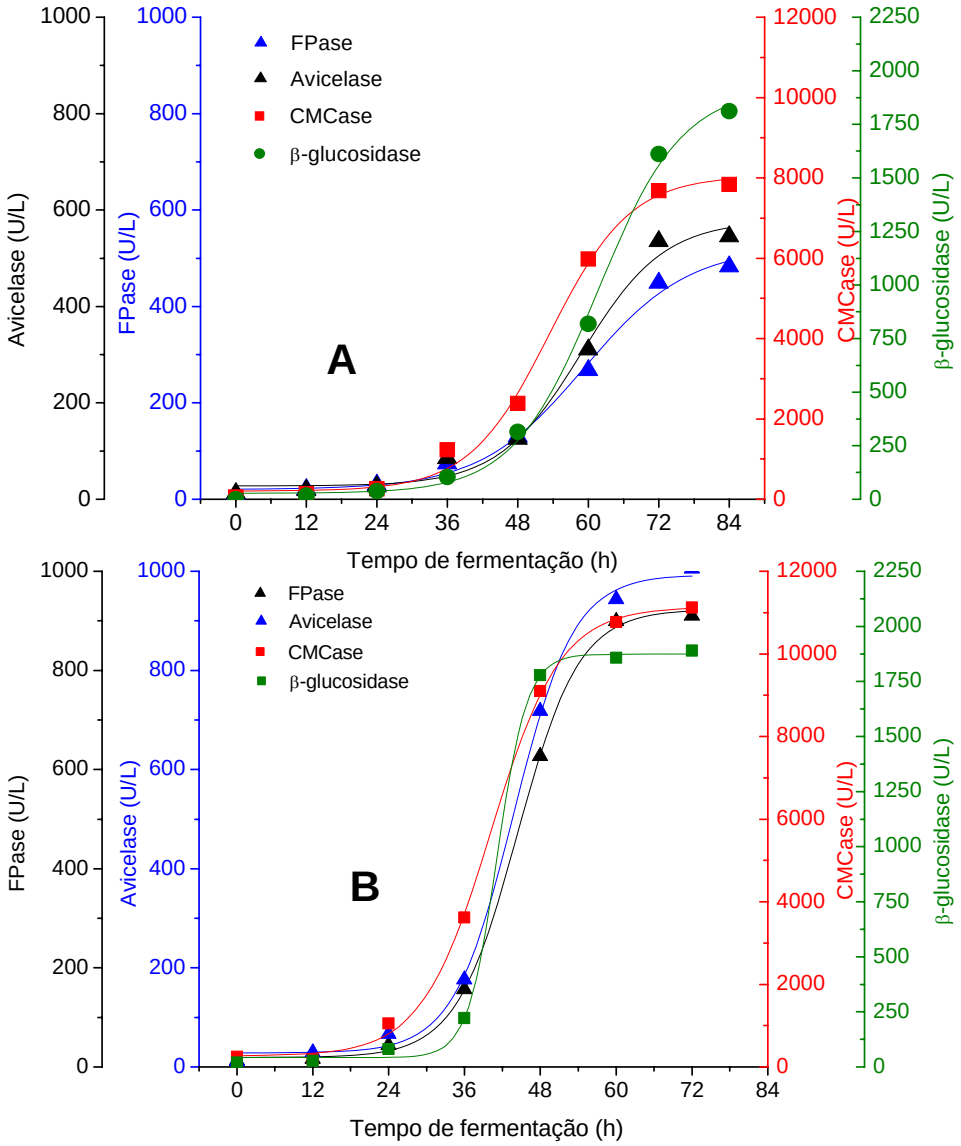


Figura 5.23. Perfil cinético da produção de celulases em biorreator inoculado com 5 % v/v (**A**) e 10 % v/v (**B**) de pré-inóculo.

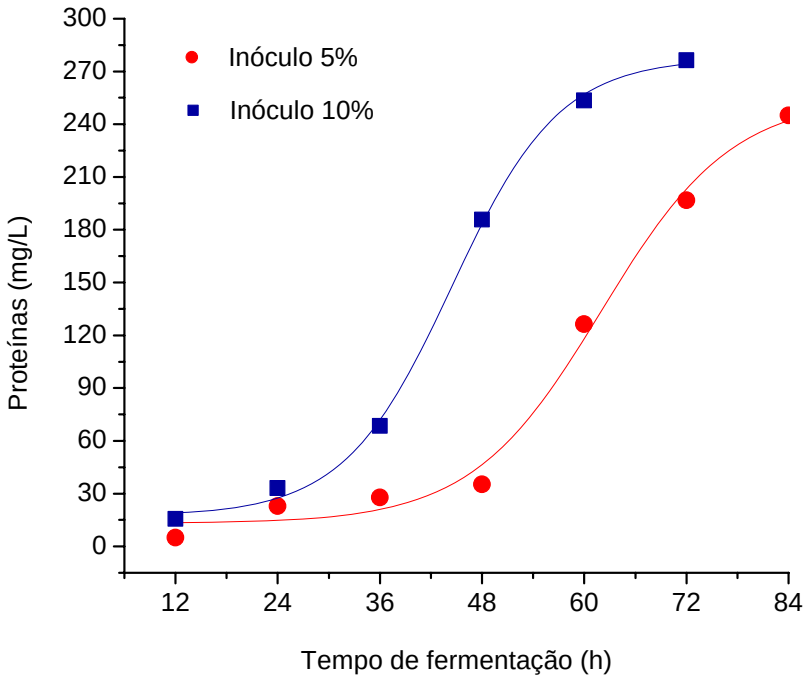


Figura 5.24. Perfil cinético da produção de proteínas em biorreator inoculado com 5 e 10%v/v de pré-inóculo de células de *P. funiculosum*.

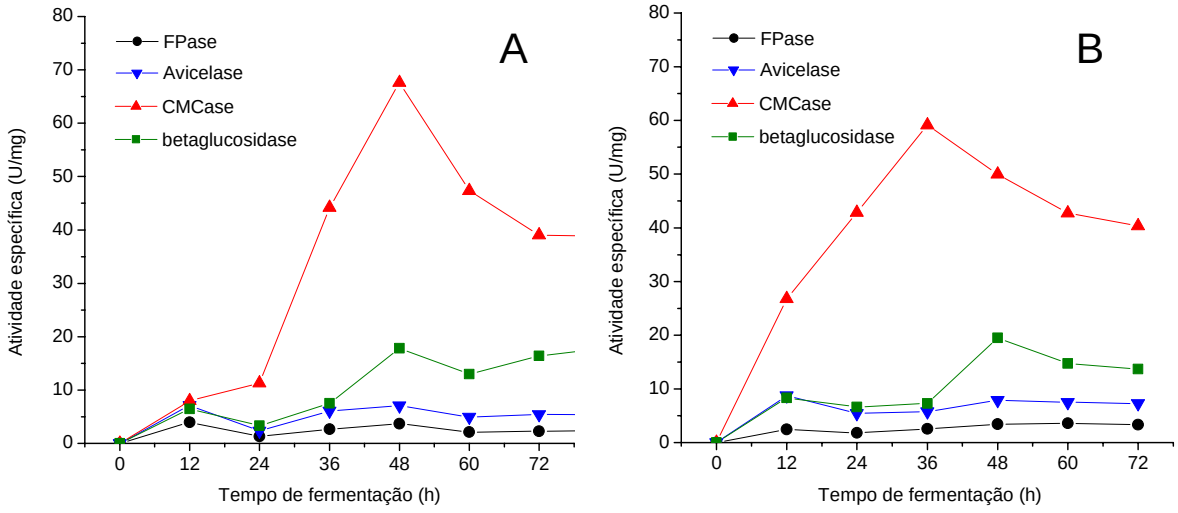


Figura 5.25. Atividades específicas de celulases de *P. funiculosum* em biorreator inoculado com 5 % v/v (A) e 10 % v/v (B) de pré-inóculo.

Tabela 5.13. Produtividade volumétrica (Q_P) de celulases em biorreator inoculado com 5 % v/v e 10 % v/v de pré-inóculo.

Tempo de fermentação (h)	Produtividade volumétrica - Q_P (U/L.h)					
	Pré-inóculo de 5%			Pré-inóculo de 10 %		
	Fpase	CMCase	β-glucosidase	Fpase	CMCase	β-glucosidase
12	1,7	11,5	1,4	1,4	14,8	2,3
24	1,2	10,8	1,6	1,8	43,8	3,4
36	2,0	34,2	2,9	4,3	100,5	6,2
48	2,7	49,8	6,6	13,1	189,6	37,0
60	4,5	99,7	13,6	15,0	179,5	31,0
72	6,2	106,7	22,4	12,6	154,5	26,2
84	5,7	93,3	21,6	nd	nd	nd

Na Tabela 5.14, estão apresentados os resultados de produção de celulases em relação ao conteúdo de celulose inicial da celulignina de bagaço de cana (U/g). Observa-se que, ao final da fermentação, houve um aumento de 88 e 42 % das atividades FPásica e CMCásica, respectivamente, no biorreator inoculado com 10 % de pré-inóculo. Por meio destes resultados pode-se estimar a relação entre as atividades enzimáticas produzidas e a massa de matéria-prima. Assim, nas condições experimentais deste estudo, considerando que cada 100 kg de bagaço rendem 28,8 kg de celulignina (contendo 68% de celulose), pode-se obter, então, 1.310.757 FPU, 16.018.733 EGU e 2.720.022 BGLU para cada 100 kg de bagaço.

Tabela 5.14. Atividades celulásicas produzidas por grama de celulose inicial (U/g).

Tempo de fermentação (h)	Pré-inóculo de 5%			Pré-inóculo de 10 %		
	FPase	CMCase	β-glucosidase	FPase	CMCase	β-glucosidase
12	1,48	10,12	1,20	1,20	13,05	2,02
24	2,19	19,04	2,81	3,24	77,32	5,97
36	5,43	90,48	7,67	11,51	266,02	16,31
48	9,52	175,60	23,17	46,14	669,27	130,75
60	19,68	439,88	60,18	66,13	792,08	136,55
72	**32,99**	**565,00**	**118,49**	**66,93**	**817,95**	**138,89**
84	35,49	575,97	133,24	nd	Nd	Nd

5.5.3 Produção de xilanases por *P. funiculosum* em biorreator

A Figura 5.26 apresenta o perfil cinético da produção de xilanases em biorreator inoculado com 10 % v/v de pré-inóculo. Observa-se que o fungo filamentoso *P. funiculosum*, além das celulases, possui maquinário para produção de xilanases. Possivelmente, este microrganismo produz enzimas com atividade

xilanásica como enzimas auxiliares na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Neste caso, a matéria-prima utilizada como indutor da produção de enzimas, possuía cerca de 12% de hemicelulose, o que, provavelmente, induziu a expressão de xilanases concomitantemente à produção de celulases, conforme se observa na figura.

Esta característica pode ser de grande importância na composição de um preparado enzimático para a hidrólise de material lignocelulósico pré-tratado, uma vez que, mesmo após pré-tratamentos ácido e alcalino, ainda permanece significativo teor de hemicelulose.

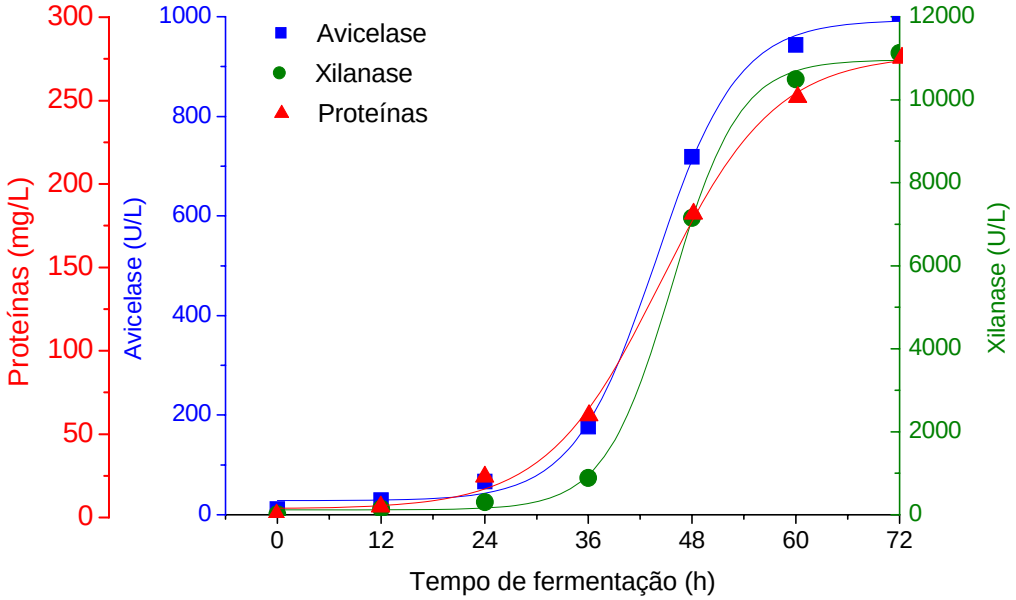


Figura 5.26. Perfil cinético da produção de proteínas e atividades **xilanásica e avicelásica**. Biorreator inoculado com 10 % v/v de pré-inóculo.

5.5.4 Considerações gerais sobre a produção de celulases

Os valores de atividade enzimática em cada etapa da otimização das concentrações das fontes de nitrogênio e em biorreator estão apresentados na Figura 5.27. Observa-se um aumento das atividades FPase de, aproximadamente, 12 vezes, CMCase de 6,3 vezes e β-glucosidase de 8,5 vezes em relação ao planejamento 1, o qual foi baseado na composição do meio clássico de Mandels e Weber (1969). Desta forma, constatou-se que foi possível aumentar a produção de enzimas modificando o meio de cultivo em frascos agitados e em biorreator, controlando melhor as condições de pH (5) e oxigênio dissolvido (20-40% da

saturação). Certamente, a produção de celulases pode ainda ser aumentada por meio de modificações das condições de aeração, pH, aumento da concentração da fonte de carbono e nitrogênio com uso de planejamentos experimentais. O reciclo de células é outro fator que pode incrementar a produção de celulases em biorreator, uma vez que as células já estarão com toda a maquinaria metabólica formada e adaptada para o crescimento em material lignocelulósico.

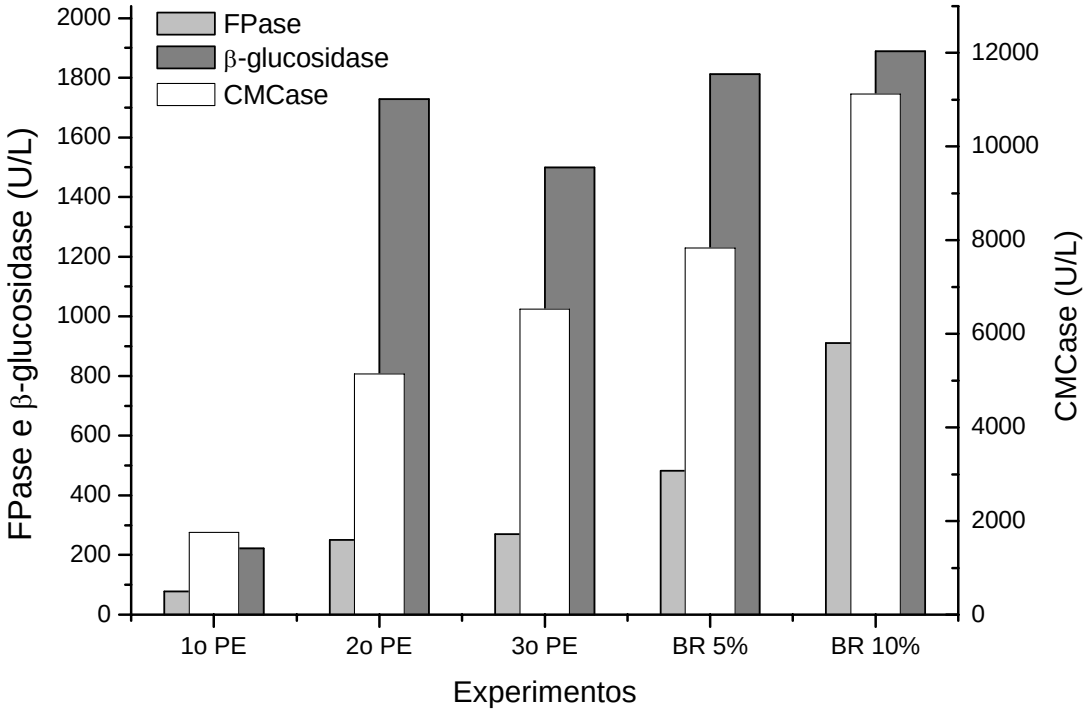


Figura 5.27. Evolução da produção de celulases durante as etapas de otimização da fonte de nitrogênio por meio de planejamentos experimentais em frascos agitados e em biorreatores. PE: planejamento de experimentos; BR 5%: biorreator inoculado com 5%v/v de pré-inóculo; BR 10%: biorreator inoculado com 10%v/v de pré-inóculo.

Wooley *et al*. (1999) estabeleceram alguns parâmetros e valores no projeto de uma planta industrial para produção de celulases, sendo que dois dos parâmetros foram relacionados à produção (rendimento de 200 FPU/g de celulose+xilose e produtividade de 75 $FPU.L^{-1}.h^{-1}$). No presente estudo, os rendimentos e produtividade alcançados ainda estão três e cinco vezes menores, respectivamente, em relação aos valores utilizados por Wooley *et al*. (1999) para projetar uma produção em grande escala. Vale lembrar, no entanto, que os autores utilizaram como microrganismo produtor de celulases, o fungo *T. reesei* modificado para

superprodução destas enzimas. Sendo assim, acredita-se no grande potencial da linhagem de *P. funiculosum* utilizada no presente estudo para produção de celulases em escala industrial. Como colocado anteriormente, os rendimentos e a produtividade em celulases deste fungo podem ainda ser melhorados, seja por melhoramento genético ou por avanços na otimização das condições de cultivo.

5.6. Concentração dos extratos enzimáticos de *P. funiculosum*

Com o objetivo de desenvolver um produto enzimático de forma dedicada (*in plant production*) para emprego na produção de etanol de segunda geração e de outras moléculas passíveis de produção a partir de materiais de composição lignocelulósica, dentro do contexto de biorrefinaria, esta seção trata da concentração do extrato bruto sem células, para posterior caracterização e aplicação na hidrólise de celulose de bagaço de cana.

Os resultados dos diferentes métodos de concentração estão apresentados nas Tabelas 5.15 e 5.16. A concentração por evaporador rotativo à vácuo e à temperatura de 45ºC, sem adição de substâncias estabilizadoras (rotaevaporador I), mostrou-se ineficaz com perdas de 84 a 94% das atividades celulásicas. De acordo com Yamane *et al*. (1990) as moléculas de água da camada de solvatação têm papel fundamental na estabilidade protéica devido, principalmente, às interações hidrofóbicas, forças de *van der Walls*, pontes salinas e ligações de hidrogênio. Porém, variações no meio como temperatura, pH, força iônica, entre outras, podem induzir as modificações na estrutura da proteína de sua forma ativa para desnaturada. Isto se deve à exposição dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das enzimas ocasionada pelas alterações na organização das moléculas de água da camada de solvatação.

Estabilizantes, como glicerol e PEG, agem modificando a camada de solvatação, substituindo parte das moléculas de água por estas substâncias hidrofílicas, conduzindo a uma reorganização das moléculas de água devido ao incremento do número de interações intramoleculares por ligações de hidrogênio, que contribui para estabilidade da molécula protéica.

Com isto, observa-se que nos processos de concentração realizados com uso de glicerol e PEG, as perdas de atividade foram reduzidas (Tabela 5.15). Iyer e Ananthanarayan (2008) estudaram os efeitos de sete polietilenoglicóis (PEG) de

massas moleculares médias de 400-8.000 Da e dois álcoois polivinílicos (PVAs) com média de massas moleculares de 10.000 e 50.000 Da, sobre amilase pancreática e verificaram que a maioria apresentou ativação e estabilização da atividade enzimática. Os efeitos destes aditivos estabilizantes foram analisados também em diferentes enzimas (cinco α-amilases, β-amilase, glucoamilase, isoamilase, pululanase e ciclomaltodextrina glucaniltransferase), tendo sido verificados efeitos positivos na estabilidade de todas as enzimas investigadas.

Tabela 5.15. Atividades celulásicas do extrato bruto sem células e do concentrado em rotaevaporador a vácuo.

Rotaevaporador I: sem adição de estabilizadores / FC volumétrico: 75			
	FPásica (U/L)	**CMCásica (U/L)**	**β-glucosidásica (U/L)**
Extrato bruto	223,226	2.520,944	880,174
Concentrado	2.265,77	10.409,59	3.507,62
Perdas (%)	86,47	94,494	94,69
Rotaevaporador II: adição de glicerol 0,75 % / FC volumétrico: 75			
	FPásica (U/L)	**CMCásica (U/L)**	**β-glucosidásica (U/L)**
Extrato bruto	125,16	2.098,92	1.016,78
Concentrado Final	5.447,72	69.276,76	40.679,01
Perdas (%)	41,966	55,99	46,66
Rotaevaporador III: adição de glicerol 0,75 % e PEG 8000 0,2% / FC volumétrico: 25			
	FPásica (U/L)	**CMCásica (U/L)**	**β-glucosidásica (U/L)**
Extrato bruto	240,03	6.916,71	1.374,69
Concentrado	6.786,02	104.968,69	26.094,58
Perdas (%)	0,000	39,30	24,07

FC: fator de concentração

Quanto às atividades celulásicas dos extratos concentrados em sistema de ultrafiltração tangencial em membranas de fibras ocas (Tabela 5.16), verificou-se que as perdas foram dependentes do corte (*cut-off*) da membrana. Membranas de abertura de 10 kDa permitem a passagem de moléculas de até 30 kDa, dessa forma celulases de baixa massa molecular e mesmo proteínas acessórias são perdidas durante o processo de concentração. Devido à observação dessas perdas, utilizou-se membranas com abertura menor (5 kDa), o que permitiu recuperação de quase toda a atividade celulásica, com perda de apenas 3% da atividade CMCásica. Sendo assim, o processo de ultrafiltração tangencial em membranas de fibras ocas de abertura 5 kDa, foi definido como ideal e adotado para a obtenção do preparado celulásico LADEBIO/BR.

Tabela 5.16. Atividades celulásicas nas diferentes etapas de concentração em membranas de fibras ocas em dois diferentes *cut-off*.

Hollow fiber: *cut-off*: 10 kDa / Fator de concentração volumétrico: 45,4				
	Atividades (U/L)			**Volume (mL)**
	FPásica	**CMCásica**	**β-glucosidásica**	
Extrato bruto	**510,8**	**7.100,3**	**1.979,6**	**6.000**
Microfiltrado	482,0	7.045,0	1.906,6	5.900
Resíduo Microfiltração	334,5	1.307,3	504,0	100
Concentrado	**1.7067,6**	**277.186,7**	**81.649,8**	**130**
Permeado final	262,8	1.102,8	9,5	5.670
Atividade teórica	21.876,5	319.732,6	86.528,7	
Perdas (%)	22,0	13,3	5,6	
Hollow fiber: *cut-off*: 5 kDa / Fator de concentração volumétrico: 64				
Extrato bruto	**1.135,4**	**10.252,5**	**2.260,0**	**6.350**
Microfiltrado	961,5	9.664,2	2.200,0	6.300
Resíduo Microfiltração	234,6	981,0	583,9	100
Concentrado	**63.065,6**	**601.995,2**	**140.562,2**	**98**
Permeado final	30,1	194,0	3,1	6.250
Atividade teórica	61.810,5	621.271,7	141.428,6	
Perdas (%)	**0,0**	**3,1**	**0,6**	

5.7. Estabilidade do preparado celulásico

Nas Figuras 5.28 e 5.29 estão apresentadas as atividades dos preparados enzimáticos concentrados durante a incubação a 37 e 50°C, tanto daquele concentrado em rotaevaporador à vácuo (rotaevaporador III) quanto do preparado concentrado em sistema de ultrafiltração em membrana, este último denominado preparado celulásico LADEBIO/BR.

Verifica-se que ambos os preparados enzimáticos apresentam estabilidade das três atividades avaliadas, durante todo o período de incubação. A boa estabilidade do preparado enzimático é de grande importância uma vez que o seu uso em processos de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas requer que as atividades que fazem parte do *pool* enzimático apresentem boa estabilidade tanto a 50°C (fase de pré-hidrólise), quanto a 37°C (fase de fermentação simultânea à hidrólise).

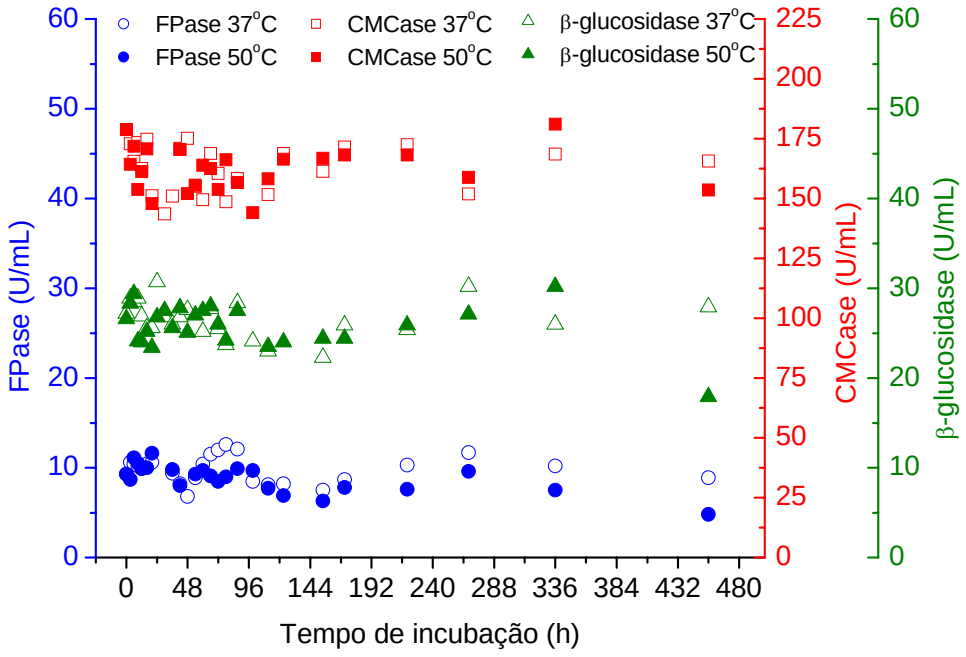


Figura 5.28. Estabilidade do preparado celulásico de *P. funiculosum*, concentrado em rotaevaporador a vácuo e incubado a 37 e 50°C.

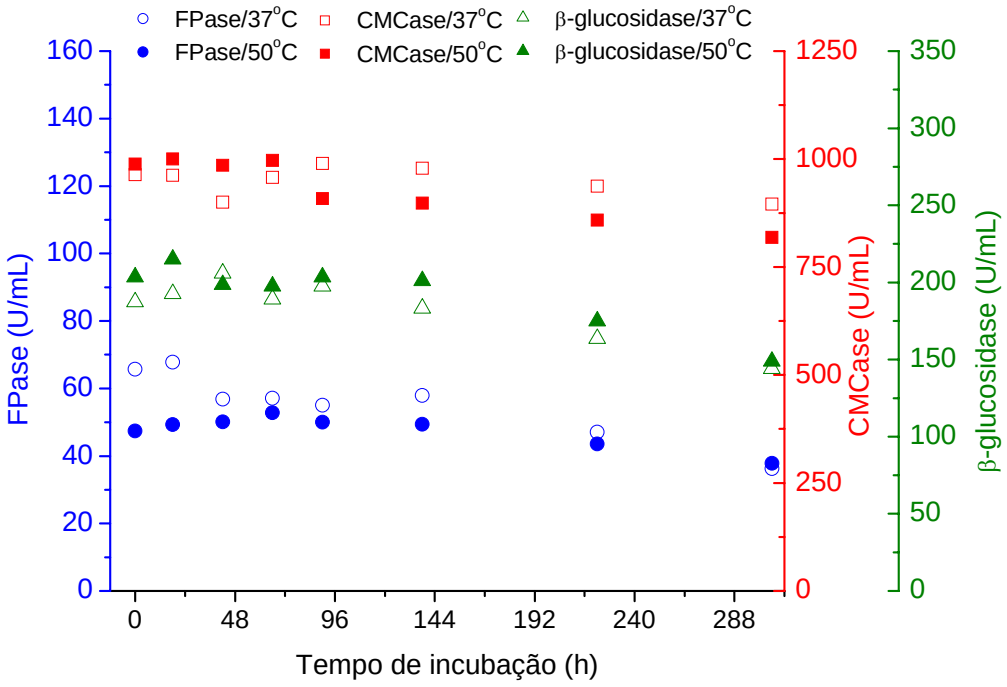


Figura 5.29. Estabilidade do preparado celulásico de *P. funiculosum*, concentrado por ultrafiltração em membrana (LADEBIO/BR) e incubado a 37 e 50°C.

Na Figura 5.30 estão apresentados os resultados das atividades celulásicas durante a estocagem a 7°C (em refrigerador). Verifica-se que até 32 meses de armazenamento, o preparado enzimático de *P. funiculosum* apresentou todas as atividades avaliadas estáveis. A boa estabilidade tanto nas temperaturas de atuação no processo (37 e 50°C), quanto na estocagem, colocam este preparado enzimático com grandes chances de se tornar um produto comercial, caso a economicidade do processo seja favorável.

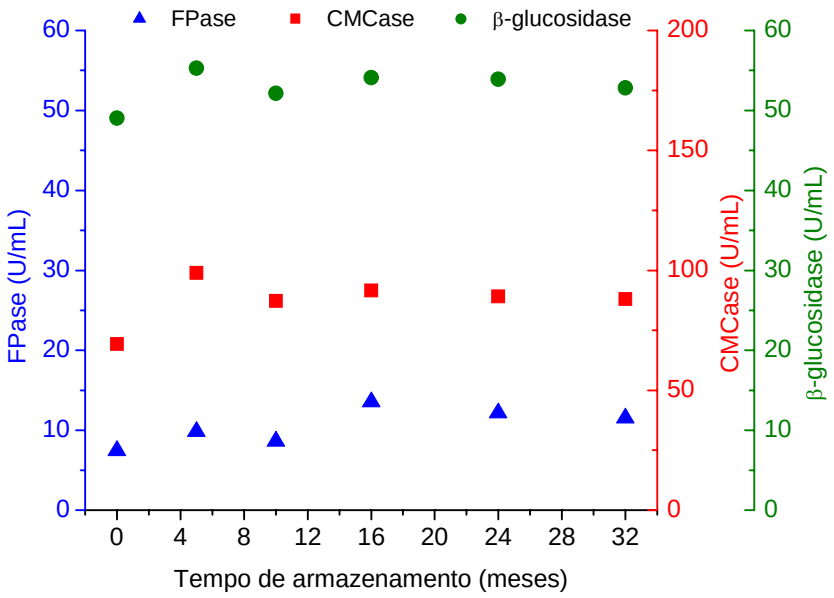


Figura 5.30. Estabilidade do preparado celulásico de *P. funiculosum* frente ao armazenamento sob refrigeração a 7°C.

5.8. Identificação preliminar das enzimas no *pool* concentrado com atividades CMCásica e β-glucosidásica em zimograma

A Figura 5.31A apresenta os eletrofoterogramas do preparado enzimático LADEBIO/BR, nos quais se pode observar que o fungo *P. funiculosum* secreta ao meio uma grande quantidade de proteínas. No zimograma da Figura 5.31B identificam-se bandas com atividade CMCásica (gel corado com vermelho de Congo) e verificam-se, ainda, que estas isoenzimas apresentam grande variação quanto ao tamanho. No que concerne à atividade β-glucosidásica (gel corado com esculin+cloreto férrico), foi constatada uma única banda de massa molecular aproximadamente 100 kDa (Figura 5.31C). Khantan *et al*. (1985) constataram

presença de duas isoenzimas com atividade β-glucosidásica em extrato enzimático de *P. funiculosum*. Apesar de ser o mesmo microrganismo, este pode secretar complexos enzimáticos distintos dependendo das necessidades fisiológicas frente ao ambiente ou ao meio em que se encontra.

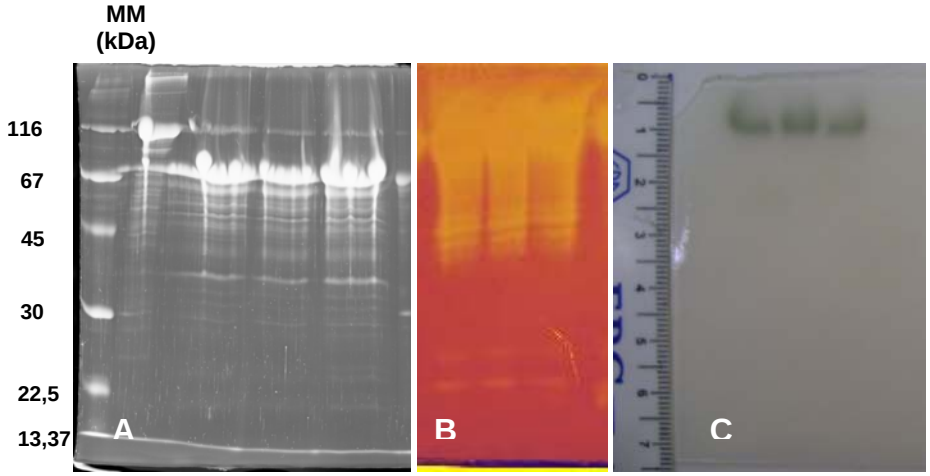


Figura 5.31. Separação eletroforética de proteínas do extrato bruto de *P. funiculosum*. A – Eletroforese SDS-PAGE; B – Zimograma de CMCases; C – Zimograma de β-glucosidases.

Tendo sido constatada a presença de enzimas, com atividade celulolítica, com grande variação de massa molecular, realizou-se uma precipitação fracionada com sulfato de amônio de forma a recuperar todas as frações protéicas e determinar a concentração mínima necessária do sal para precipitação destas proteínas. As etapas seguintes do trabalho foram realizadas para separar cada isoenzima e confirmar a identificação por meio de LC/MS/MS.

5.9. Purificação e caracterização das enzimas de *P. funiculosum* no extrato bruto concentrado

As fases de purificação e caracterização compreenderam as etapas de pré-purificação por precipitação com sulfato de amônio, purificação por cromatografia de troca iônica, identificação das enzimas purificadas por LC/MS/MS, quantificação das atividades das enzimas purificadas e avaliação preliminar da alteração molecular frente a condições desnaturantes, utilizando técnicas de fluorescência. Os resultados destas etapas estão apresentados nos itens a seguir.

5.9.1. Precipitação com sulfato de amônio

Um dos primeiros passos da purificação de enzimas consiste na sua precipitação com sulfato de amônio. Na Tabela 5.17 estão apresentados os

resultados da atividade celulásica da suspensão de proteínas precipitadas com sulfato de amônio nas concentrações de 20 a 80% da saturação e na Figura 5.32 estão exibidas as porcentagens das atividades celulásicas recuperadas nas amostras tratadas com as diferentes concentrações de sulfato de amônio.

De acordo com Lucarini *et al*. (2005), proteínas precipitadas com uso de sais, em geral, não são desnaturadas e as atividades são recuperadas após ressolubilização. Além disso, o uso de sulfato de amônio para precipitação tem a vantagem de apresentar ação estabilizante sobre as proteínas, por evitar proteólise e ação bacteriana.

Tabela 5.17. Atividades celulásicas após precipitação com sulfato de amônio.

Sulfato de amônio (%)	**Atividades (U/L)**		**Proteína (mg/L)**
	CMCásica	**β-Glucosidásica**	
20	737,0	412,7	81,8
30	1.124,9	1.785,5	247,1
40	1.791,3	13.517,5	580,2
50	46.161,7	73.791,9	9.151,0
60	38.643,3	22.151,7	1.820,8
70	1.312,8	930,5	226,3
80	1.184,7	514,3	135,9
Total	90.955,7	113.104,1	12.243,1

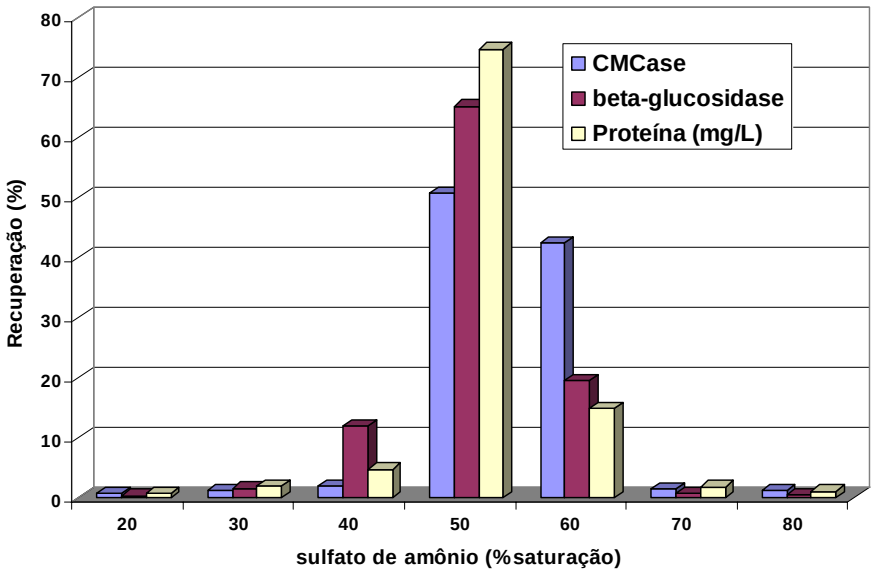


Figura 5.32. Porcentagem de recuperação de atividades celulásicas após precipitação com sulfato de amônio.

Na Figura 5.33 está ilustrado o gel SDS-PAGE das proteínas obtidas da precipitação fracionada com sulfato de amônio. Verificou-se a presença de no mínimo 19 bandas de proteínas nos precipitados de 40 a 60%. Nota-se que apesar de, aproximadamente, 97 % das proteínas precipitarem com 60% de sulfato de amônio, nos precipitados com 70 e 80 % houve a presença de bandas (indicado com seta) que não estavam presentes nos precipitados com menor concentração de sulfato de amônio. Os resultados indicaram a necessidade do uso de 80% de sulfato de amônio para permitir a recuperação de grande parte das proteínas, evitando dessa forma a exclusão de algum composto protéico que possa ter importância na hidrólise enzimática, seja ela de função catalítica ou acessória.

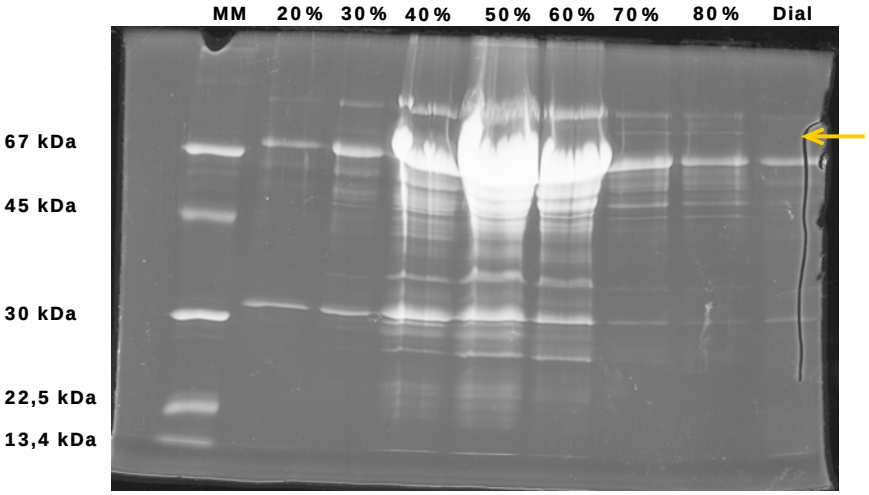


Figura 5.33. Separação eletroforética de proteínas do extrato celulásico precipitado com sulfato de amônio (20 a 80% da saturação). MM: padrão de massa molecular; Dial: extrato enzimático dialisado (antes de precipitação).

5.9.2. Purificação de enzimas do preparado concentrado por cromatografia de troca iônica

Com a finalidade de se obterem enzimas puras para identificação e caracterização, foi realizada a cromatografia de troca aniônica após precipitação com sulfato de amônio (80% de saturação). Esta modalidade de cromatografia baseia-se na carga líquida da proteína e na sua capacidade de se ligar a uma matriz carregada positivamente. As proteínas adsorvidas na matriz são eluídas após serem trocadas por outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior afinidade pela fase estacionária.

No cromatograma apresentado na Figura 5.34, os picos representam a intensidade de absorção de luz UV a 280 nm pelas moléculas de proteínas ou outras capazes de absorver no mesmo comprimento de onda. Após cromatografia, as frações foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE para identificação das que continham proteínas e o seu respectivo grau de pureza. Na Figura 5.35 estão ilustrados os géis SDS-PAGE das frações coletadas após cromatografia e do extrato enzimático bruto. Observou-se que com o protocolo desenvolvido, foi possível separar cinco proteínas, identificadas como 2, 3, 4, 7 e 9, em uma única etapa. Por meio da eletroforese (Figura 5.35) constatou-se que dentre as proteínas secretadas pelo fungo filamentoso *P. funiculosum*, três são majoritárias, as codificadas como 3, 4 e 7, seguida da proteína 2.

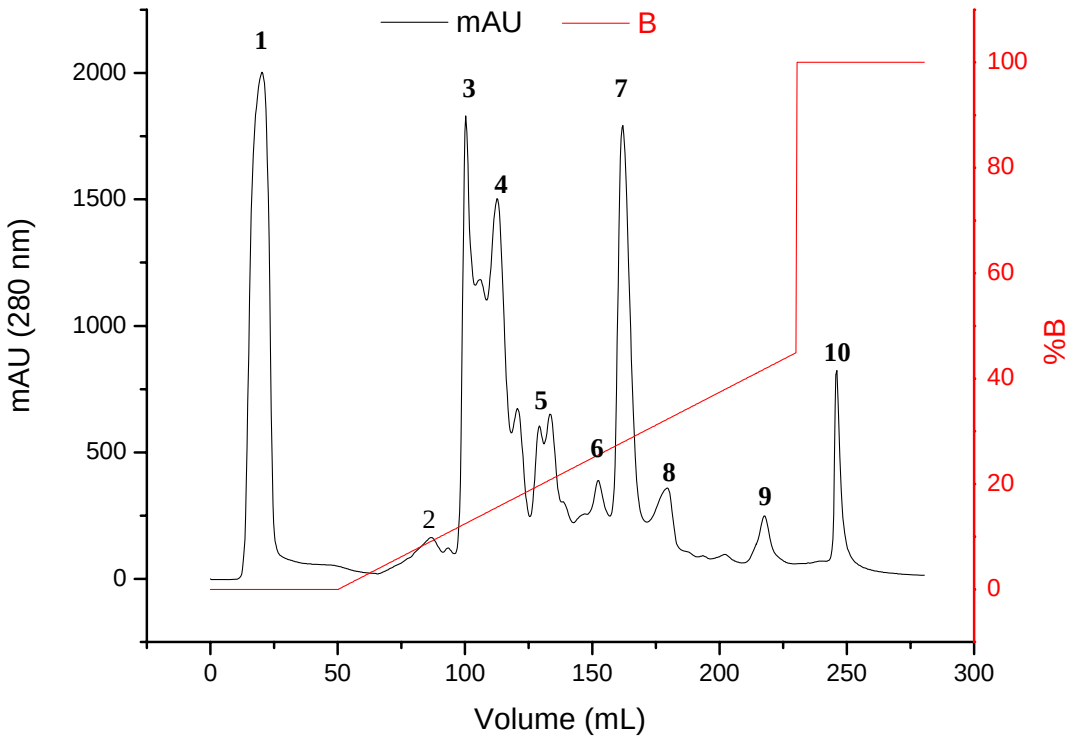


Figura 5.34. Cromatografia de troca aniônica da purificação de proteínas secretadas por *P. funiculosum* em *Äkta Purifier*. Em vermelho, o aumento da proporção de uso da bomba B, representando o gradiente de força iônica.

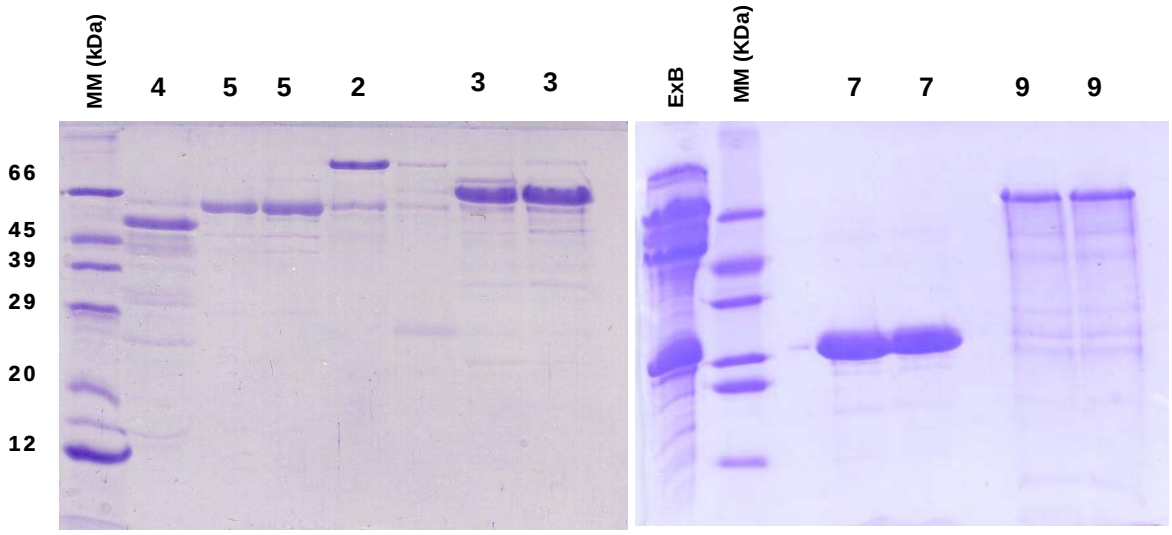


Figura 5.35. Géis SDS-PAGE das frações obtidas na purificação de enzimas por cromatografia de troca aniônica. Os números indicam as identificações dos picos do cromatograma da Figura 5.34. MM: marcador de massa molecular; ExB: extrato enzimático bruto.

5.9.3. Identificação das enzimas por LC/MS/MS

A técnica da espectrometria de massas identifica com alta precisão a razão massa/carga dos peptídeos ionizados e fragmentados. Através de processamentos desses dados é possível comparar os resultados com aqueles armazenados em bancos de dados internacionais como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), um dos maiores bancos de dados em genômica e proteômica, permitindo recuperar peptídeos que apresentam massas e seqüência similares. Através de múltiplas fragmentações, com sucessivas perdas dos aminoácidos das extremidades, é possível construir a seqüência da proteína por meio do *software Mascot.*

As proteínas codificadas como 2, 3, 4 e 9 no gel SDS-PAGE, apresentadas na Figura 5.35 do item 5.9.2, foram identificadas por LC/MS/MS (Laboratório de Genética de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP) como sendo β-glucosidase (seqüência não mostrada), CBH I, CBH II e endoglucanase (seqüência não mostrada), respectivamente. Os demais picos do cromatograma apresentado na Figura 5.34, correspondentes a outras proteínas purificadas, encontram-se em processo de identificação.

As seqüências de peptídeos, identificadas por LC/MS/MS, das enzimas CBH I e CBH II secretadas pelo fungo *P. funiculosum* estão apresentadas abaixo. As seqüências destacadas em negrito são as que coincidem com as depositadas no banco de dados da NCBI. Neste banco de dados não foram localizadas seqüências de peptídeos de celulases de *P. funiculosum* depositadas, porém, foram encontradas similaridades de seqüência com CBH I de *Penicillium* sp. (cobertura de seqüência de 18%) e de *Penicilium occitanis* (cobertura de seqüência de 21%) e CBH II de *Acremonium cellulolyticus* (cobertura de sequencia 19%).

CBH I (cobertura de seqüência de 18% quando comparado com CBH I de *Penicillium* sp.)

1 MSALNSFNMY KSALILGSLL ATAGAQQIGT YTAETHPSLS WSTCKSGGSC
51 TTNSGAITLD ANWRWVHGVN TSTNCYTGNT WNSAICDTDA SCAQDCALDG
101 ADYSGTYGIT TSGNSLR**LNF VTGSNVGSR**T YLMADNTHYQ IFDLLNQEFT
151 FTVDVSHLPC GLNGALYFVT MDADGGVSKY PNNK**AGAQYG VGYCDSQCPR**
201 DLKFIAGQAN VEGWTPSANN ANTGIGNHGA CCAELDIWEA NSISEALTPH
251 PCDTPGLSVC TTDACGGTYS SDR**YAGTCDP DGCDFNPYRL GVTDFYGSGK**
301 **TVDTTKPFTV VTQFVTNDGT STGSLSEIR**R **YYVQNGVVIP QPSSK**ISGIS
351 GNVINSDYCA AEISTFGGTA SFNKHGGLTN MAAGMEAGMV LVMSLWDDYA
401 VNMLWLDSTY PTNATGTPGA ARGTCATTSG DPKTVESQSG SSYVTFSDIR
451 VGPFNSTFSG GSSTGGSTTT TASRTTTTSA SSTSTSSTST GTGVAGHWGQ
501 CGGQGWTGPT TCVSGTTCTV VNPYYSQCL

CBH I (cobertura de seqüência de 21% quando comparado com CBH I de *Penicillium occitanis*)

1 MSALNSFNMY KSALILGSLL ATAGAQQIGT YTAETHPSLS WSTCK**SGGSC**
51 **TTNSGAITLD ANWR**WVHGVN TSTNCYTGNT WNSAICDTDA SCAQDCALDG
101 ADYSGTYGIT TSGNSLR**LNF VTGSNVGSR**T YLMADNTHYQ IFDLLNQEFT
151 FTVDVSHLPC GLNGALYFVT MDADGGVSKY PNNK**AGAQYG VGYCDSQCPR**
201 DLKFIAGQAN VEGWTPSANN ANTGIGNHGA CCAELDIWEA NSISEALTPH
251 PCDTPGLSVC TTDACGGTYS SDR**YAGTCDP DGCDFNPYRL GVTDFYGSGK**
301 **TVDTTKPFTV VTQFVTNDGT STGSLSEIR**R YYVQNGVVIP QPSSKISGIS
351 GNVINSDYCA AEISTFGGTA SFNKHGGLTN MAAGMEAGMV LVMSLWDDYA
401 VNMLWLDSTY PTNATGTPGA AR**GTCATTSG DPK**TVESQSG SSYVTFSDIR
451 VGPFNSTFSG GSSTGGSTTT TASRTTTTSA SSTSTSSTST GTGVAGHWGQ
501 CGGQGWTGPT TCVSGTTCTV VNPYYSQCL

CBH II (cobertura de seqüência de 19% quando comparado com CBH II de *Acremonium cellulolyticus* Y-94)

```
  1 MLRYLSIVAA TAILTGVEAQ QSVWGQCGGQ GWSGATSCAA GSTCSTLNPY
 51 YAQCIPGTAT STTLVKTTSS TSVGTTSPPT TTTTKASTTA TTTAAASGNP
101 FSGYQLYANP YYSSEVHTLA IPSLTGSLAA AATKAAEIPS FVWLDTAAKV
151 PTMGTYLANI EAANKAGASP PIAGIFVVYD LPDRDCAAAA SNGEYTVANN
201 GVANYKAYID SIVAQLKAYP DVHTILIIEP DSLANMVTNL STAKCAEAQS
251 AYYECVNYAL INLNLANVAM YIDAGHAGWL GWSANLSPAA QLFATVYKNA
301 SAPASLRGLA TNVANYNAWS ISSPPSYTSG DSNYDEKLYI NALSPLLTSN
351 GWPNAHFIMD TSRNGVQPTK QQAWGDWCNV IGTGFGVQPT TNTGDPLEDA
401 FVWVKPGGES DGTSNSSATR YDFHCGYSDA LQPAPEAGTW FQAYFVQLLT
451 NANPALV
```

Além destas enzimas identificadas (CBH I, CBH II, β-glucosidase e endoglucanase), por meio de LC/MS/MS foi possível encontrar a sequência de peptídeos da proteína 7 (30 kDa) da Figura 5.35, conforme se observa abaixo. Porém, não foi encontrada proteína com sequência similar a desta, sendo assim, é referenciada apenas como proteína 7 no decorrer do trabalho.

Proteína hipotética. Cellulase de *P. funiculosum* (NCBI)

```
MLRYLSIVAATAILTGVEAQQSVWGQCGGQGWSGATSCAAGSTC

STLNPYYAQCIPGTATSTTLVKTTSSTSVGTTSPPTTTTTKASTTATTTAAASGNPFS

GYQLYANPYYSSEVHTLAIPSLTGSLAAAATKAAEIPSFVWLDTAAKVPTMGTYLANI

EAANKAGASPPIAGIFVVYDLPDRDCAAAASNGEYTVANNGVANYKAYIDSIVAQLKA

YPDVHTILIIEPDSLANMVTNLSTAKCAEAQSAYYECVNYALIKPHLAHVAMYIDAGH

AGWLGWSANLSPAAQLFATVYKNASAPASLRGLATNVANYNAWSISSPPSYTSGDSNY

DEKLYINALSPLLTSNGWPDAHFIMDTSRNGVQPTKQQAWGDWCNVIGTGFGVQPTTN

TGDPLEDAFVWVKPGGESDGTSNSSATRYDFHCGYSGALQPAPEAGTWFQAYFVQLLT

NANPALV
```

A proteína 7 trata-se de uma estrutura ainda não identificada ou não depositada no banco de dados da NCBI. É importante sua identificação, pois esta representa no mínimo 15% do total de proteínas secretadas pelo fungo filamentoso *P. funiculosum*, conforme será discutido no item que se segue. Por esta proteína ser

uma das majoritárias entre as celulases do fungo em estudo, será dada especial atenção para sua identificação e caracterização em trabalhos futuros.

5.9.4. Massas moleculares das celulases de *P. funiculosum*

A massa molecular das enzimas de interesse é um dos conhecimentos básicos para caracterização de enzimas e serve de base para o estabelecimento de técnicas de separação, concentração por membranas, escolha de colunas para possível separação tanto em nível laboratorial quanto em colunas industriais. Na Tabela 5.18 estão apresentadas as massas moleculares das celulases secretadas pelo fungo *P. funiculosum*, incluindo da proteína 7. Foi possível estimar, através do rendimento de purificação, a proporção das enzimas CBH I e II (30%) e da proteína 7 (15%). É importante o conhecimento da proporção entre as diversas enzimas formadoras do complexo celulolítico de *P. funiculosum* para melhor entendimento de sua eficiência na hidrólise de material lignocelulósico.

Dentre as celulases secretadas por *T. reesei*, a CBH I representa 60%, a CBH II, 25% e endoglucanases, 15% (GRITZALI e BROWN, 1979). A produção de enzima EG I representa de 5 a 10% das proteínas secretadas, porém, é proposto que a EG II é a responsável pela maior atividade endoglucanásica produzida por *T. reesei* (SUOMINEN *et al*., 1993 e CASTRO *et al*., 2010).

Tabela 5.18. Massa molecular das enzimas purificadas de *P. funiculosum*.

Enzima	Massa Molecular (kDa)
CBH I	63,8
CBH II	51,1
β-glucosidase	77,3
Endoglucanase	58,5
Proteína 7	30,0

As massas moleculares das celulases do fungo filamentoso *P. funiculosum* estão próximos dos encontrados na literatura (Tabela 5.19), podendo variar de acordo com a fonte, conforme se observa na tabela, podendo, ainda, estar relacionada com a diferença na composição em isoenzimas.

Tabela 5.19. Massas moleculares de celulases de diversas fontes.

Fonte	Enzima	MM (kDa)	Referências
Humicola insolens	Endoglucanase	57	Hayashida *et al*. (1988)
Humicola insolens	Exo-glucanase	72	Hayashida *et al*. (1988)
Humicola insolens	β-glucosidase	250	Hayashida *et al*. (1988); Hayashida e Oshioka (1980a,b)
Trichoderma harzianum	β-glucosidase	75	Yun *et al*. (2001)
Talaromyces thermophillus	Endoglucanase	50	Nakkharat e Haltrich (2005)
Aspergillus oryzae	β-glucosidase	43	Riou *et al*. (1998)
T. reesei QM 9414	CBH II	49,7	Coutinho e Henrissat (1999)
P. funiculosum	Celobiohidrolase	55	Coutinho e Henrissat (1999)
Aspergillus niger AMS	β-glucosidase	48	Coutinho e Henrissat (1999)
Talaromyces emersonii	Endoglucanase I	35	Moloney *et al*. (1985)
Talaromyces emersonii	β-glucosidase	135	Coughlan e McHale (1988)
Talaromyces emersonii	Celobiohidrolase A	66	Tuohy *et al*. (2002)
X. fastidiosa	Endoglucanase	61,6	Simpson *et al*. (2000)
X. fastidiosa	CBH	70,9	Simpson *et al*. (2000)
X. fastidiosa	β-glucosidase	80,3	Simpson *et a*l. (2000)

5.9.5. Atividades das enzimas purificadas

O conhecimento das atividades das enzimas isoladamente é de grande importância para compreensão das eficiências de hidrólise dos preparados celulásicos, bem como permite melhor entendimento das sinergias entre as várias isoenzimas que compõem os sistemas celulásicos dos microrganismos. Neste trabalho, foram medidas as atividades de três enzimas purificadas (β-glucosidase, CBH I e proteína 7). Os trabalhos de quantificação das atividades das outras enzimas purificadas deverão continuar até completa elucidação da boa eficiência do sistema enzimático secretado pelo fungo filamentoso *P. funiculosum* e servir de base para engenharia de produto visando um preparado enzimático altamente eficiente na hidrólise de material lignocelulósico.

Na Tabela 5.20 estão apresentadas as atividades das enzimas em diferentes substratos e os açúcares liberados, quantificados tanto pelo método de DNS quanto pelo método enzimático da glicose oxidase (GOD). Os diferentes métodos de quantificação de açúcares indicam se os açúcares liberados são predominantemente oligossacarídeos ou glicose. As soluções enzimáticas utilizadas nesses ensaios apresentavam teor protéico de 8 mg/mL (CBH I e proteína 7) e 2,6 mg/mL (β-glucosidase).

Tabela 5.20. Atividades (U/mL) das enzimas CBH, β-glucosidase e da proteína 7 purificadas.

Enzima	Substratos							
	Papel filtro		Avicel		CMC		Celobiose	Xilana
	DNS	GOD	DNS	GOD	DNS	GOD	GOD	DNS
CBH I	0,41	1,59	16,27	4,06	4,91	4,37	42,98	21,28
β-glucosidase	-	-	-	-	-	-	229,54	-
Proteína 7	0,70	0,77	0,44	0,34	1,85	0,13	-	1,80

Verifica-se que a enzima CBH I de *P. funiculosum* apresentou atividades em Avicel, CMC, celobiose e em xilana. Esta enzima pode ser considerada a chave para o entendimento da boa atuação do preparado celulásico secretado por *P. funiculosum*, uma vez que foi capaz de hidrolisar tanto a estrutura cristalina da celulose (Avicel) quanto a celobiose. Além disso, a atividade em xilana pode ser de grande vantagem também para a hidrólise, já que materiais lignocelulósicos, mesmo após pré-tratamento, ainda apresentam teores de hemicelulose não negligenciáveis em sua composição. Sendo assim, sua remoção facilita o acesso de outras celulases à celulose.

Na Tabela 5.20 observa-se ainda a grande especificidade da β-glucosidase, com elevada atividade em celobiose e nenhuma atividade nos demais substratos. Já a proteína 7 apresentou atividades principalmente em CMC e em xilana. Na literatura, enzimas com atividade em celulose e em xilana são pouco reportadas. Jagtap e Rao (2005) purificaram a enzima 1,4-β-glucan glucohidrolase de baixa massa molecular (14 kDa), capaz de hidrolisar tanto celulose (CMC) quanto xilana.

5.9.6. Eletroforese em gel nativo das enzima CBH I e da proteína 7

Na Figura 5.36 observa-se o gel de eletroforese nativo da proteína 7 (PR7) e da enzima CBH I purificada por cromatografia de troca iônica e interação hidrofóbica. Por meio deste gel foi possível confirmar a pureza da proteína nas amostras, pela presença de uma única banda, já que por este método de eletroforese a proteína migra pelo gel tanto por massa molecular como por carga, o que não acontece em um gel SDS-PAGE. O gel de eletroforese nativo permitiu também constatar que as enzima CBH I e a proteína 7 apresentam a forma monomérica.

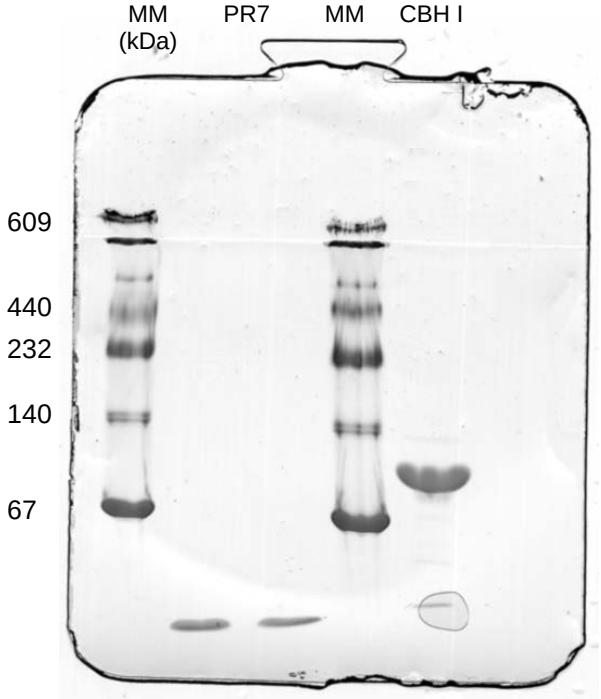


Figura 5.36. Gel de eletroforese em condições nativas da proteína 7 (PR7) e da CBH I. MM marcador de massa molecular.

5.9.7. Ensaios de fluorescência

O fenômeno da fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, passando do estado fundamental para o estado excitado; este elétron ao retornar ao estado fundamental é acompanhado pela liberação de energia em excesso através da emissão de radiação. Em moléculas protéicas o triptofano e a tirosina são os aminoácidos que absorvem luz UV e toda a resposta é reflexo da presença e posição (externalizada ou internalizada) destes na superfície da molécula protéica.

Os espectros de fluorescência para β-glucosidase e proteína 7 demonstram

que houve um deslocamento dos picos para direita (de aproximadamente 340 para 360 nm), o que indica um desenovelamento dessas proteínas com conseqüente exposição dos resíduos de triptofano e/ou tirosina (Figuras 5.37 e 5.38). Nas demais proteínas (CBHI, CBHII e endoglucanase) tal deslocamento foi menos acentuado (Figuras 5.39, 5.40 e 5.41), o que indica que essas proteínas já possuem resíduos de triptofano externos. Isso pode ser confirmado conforme descrito na literatura de que esses aminoácidos são responsáveis pela interação enzima substrato no módulo de ligação ao substrato (CBM). A diminuição do sinal de fluorescência se dá pela presença de guanidina nos tampões.

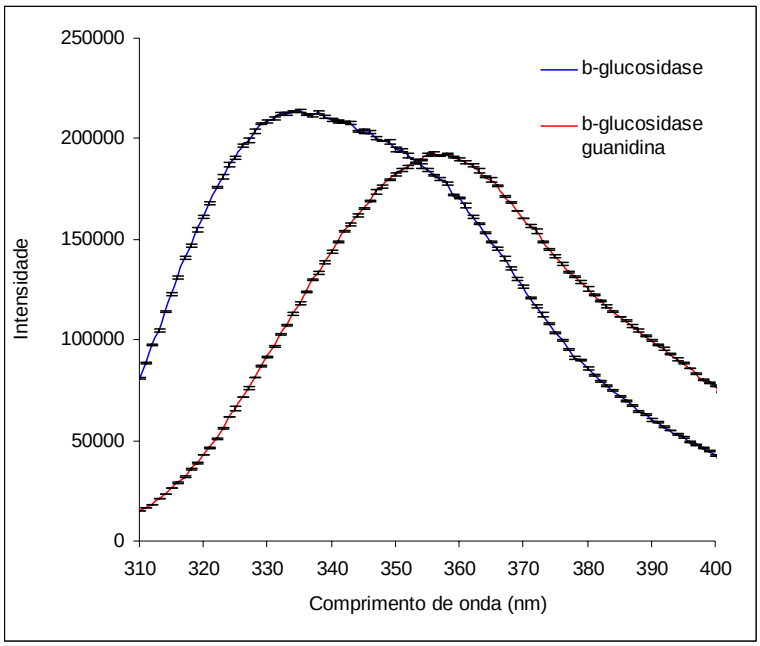


Figura 5.37. Ensaio de fluorescência de **β-glucosidase purificada** de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min.

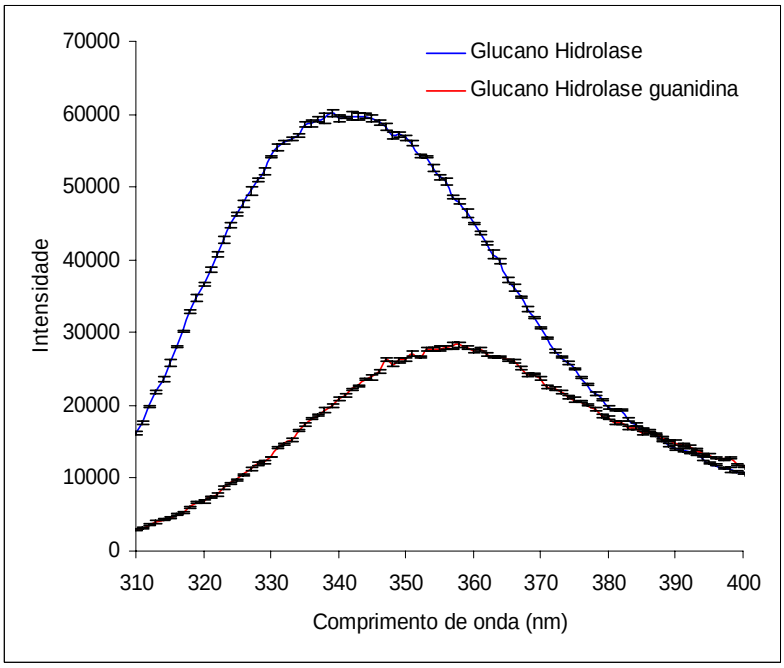


Figura 5.38. Ensaio de fluorescência da **proteína 7 purificada** de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min.

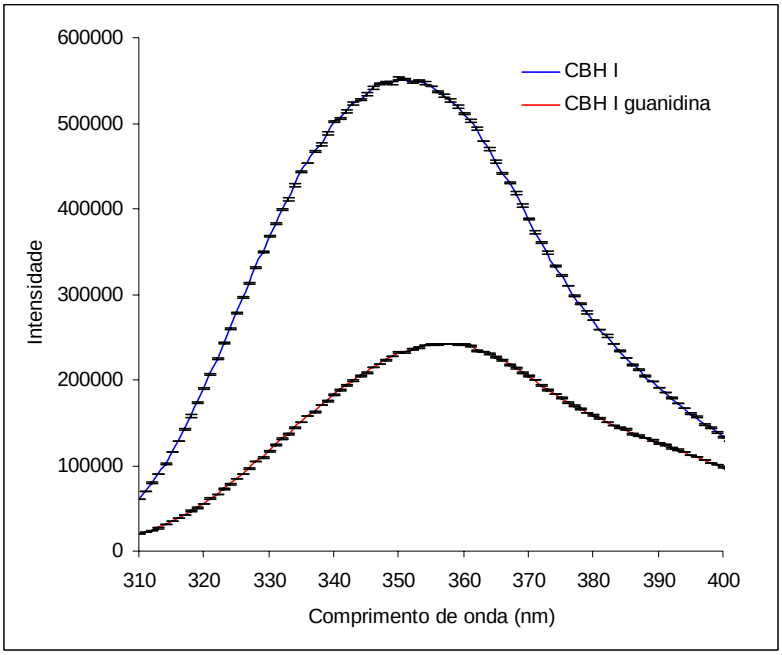


Figura 5.39. Ensaio de fluorescência de **CBH I purificada** de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min.

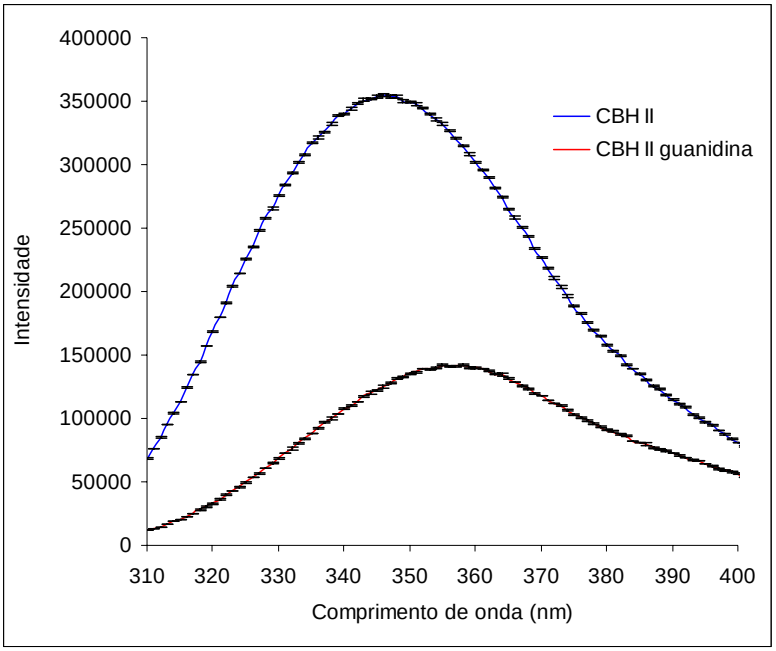


Figura 5.40. Ensaio de fluorescência de **CBH II purificada** de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min com a proteína.

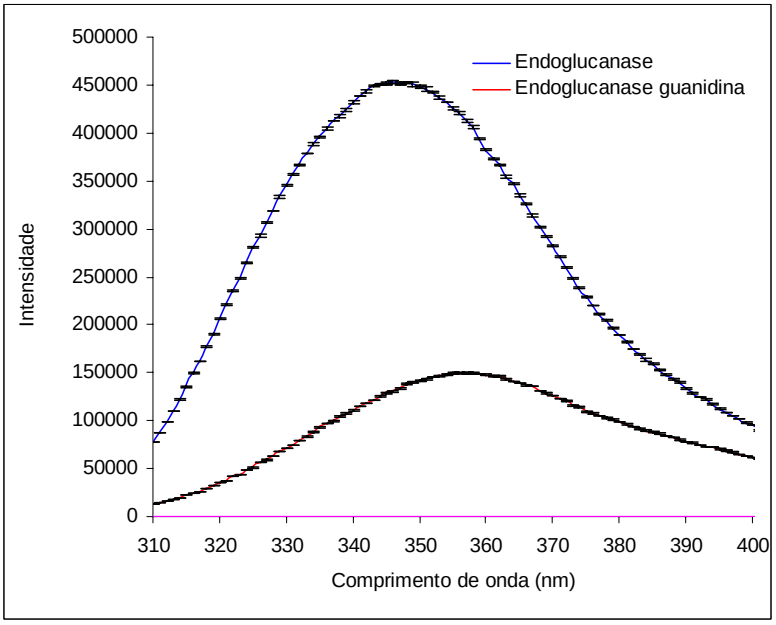


Figura 5.41. Ensaio de fluorescência de **endoglucanase purificada** de *Penicillium funiculosum* antes e após a adição de guanidina 6M incubada por 30 min.

Os resultados obtidos nesta série de experimentos, como o comportamento da enzima frente às condições desnaturantes, servirão de base ou modelo para

estudos futuros, particularmente no tocante à estabilidade da molécula frente às modificações de pH, temperatura, concentração de etanol no meio. Este trabalho ainda está em andamento no Laboratório de Cristalografia/IFSC/USP.

5.10. Parâmetros cinéticos K_M e V_{max} aparentes do preparado enzimático LADEBIO/BR

A constante de *Michaelis* (K_M) está relacionada com a afinidade da enzima pelo substrato e expressa a concentração de substrato na qual se atinge a metade da velocidade máxima de reação. Dessa forma, quanto maior o valor de K_M, menor é a afinidade da enzima por um dado substrato (SEGEL, 1979). A velocidade máxima de reação (V_{MAX}) é aquela alcançada quando os sítios catalíticos estão saturados, ou seja, todos os sítios catalíticos estão formando o complexo enzima-substrato, e assim atuando em máxima velocidade.

Os valores de K_M e V_{max}, além de serem característicos das enzimas, têm grande importância prática em processos enzimáticos. Empregando-se a equação de *Michaelis-Menten* integrada obtém-se um modelo matemático, o qual permite determinar o produto formado em quaisquer tempos de hidrólise. Este é um método interessante uma vez que leva em consideração a redução da concentração de substrato ao longo da reação enzimática e, conseqüentemente, a redução da atividade com o tempo.

Na Figura 5.42 estão apresentados os resultados das curvas de progresso para β-glucosidase visando a determinação dos valores de velocidade inicial para cada concentração de substrato. Os coeficientes dos termos lineares da equação polinomial correspondem aos valores de velocidade inicial, os quais foram utilizados para determinação dos parâmetros K_M e V_{MAX}.

Os dados fornecidos pela curva de progresso permitiram construir o gráfico de *Michaelis-Menten*, representando o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial (V_i) da reação enzimática e a linearização pelo método de *Lineweaver-Burk* (Figuras 5.43 e 5.44).

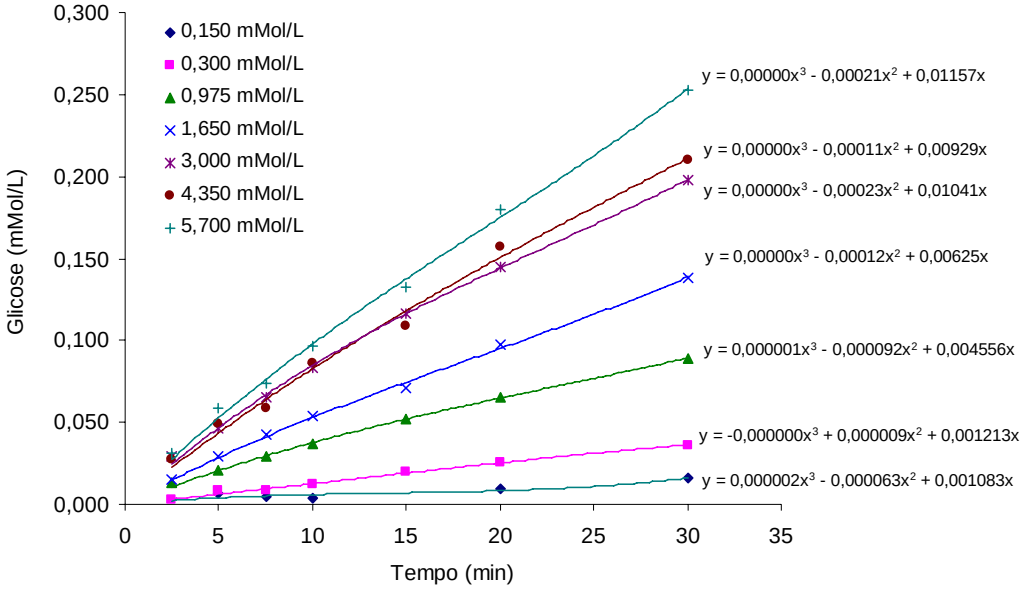


Figura 5.42. Curvas de progresso da ação de β-glucosidase de *Penicillium funiculosum*.

A constante de *Michaelis* (K_M) e a velocidade máxima (V_{MAX}) aparentes de reação enzimática foram de 1,426 mMol.L^{-1} e 0,01 mMol.L^{-1}.min^{-1}, respectivamente, para β-glucosidase e K_M, 7,57 g.L^{-1} e V_{MAX}, 0,875 g.L^{-1}.min^{-1} para enzimas com atividade CMCásica. Estes valores estão próximos aos reportados por Castro (2006) para enzimas celulásicas desta mesma linhagem, que encontrou, K_M de 10,926 g.L^{-1} para CMCase e 1,747 mMol.L^{-1} para β-glucosidase.

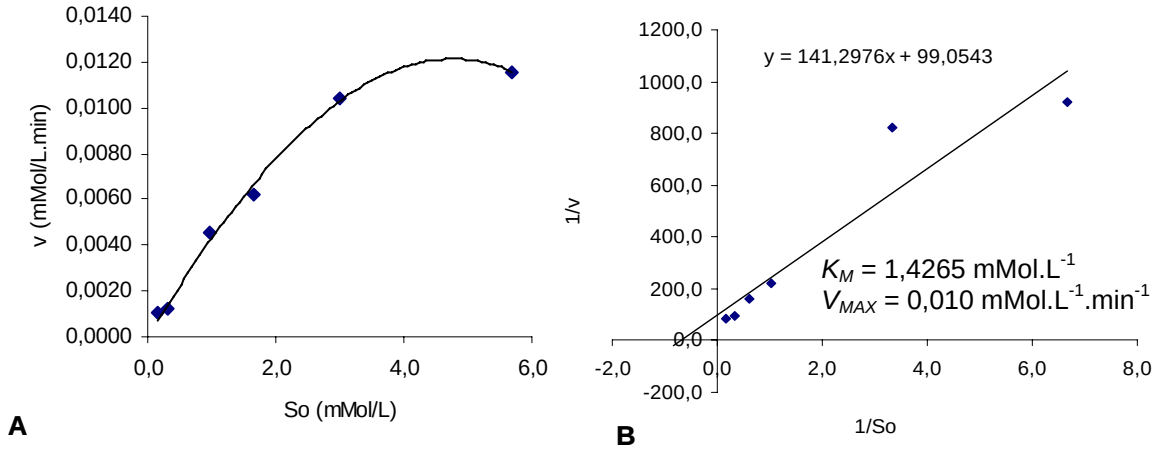


Figura 5.43. Gráfico de *Michaelis-Menten* (**A**) e a linearização por duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para enzima **β-glucosidase** de *P. funiculosum*. Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação.

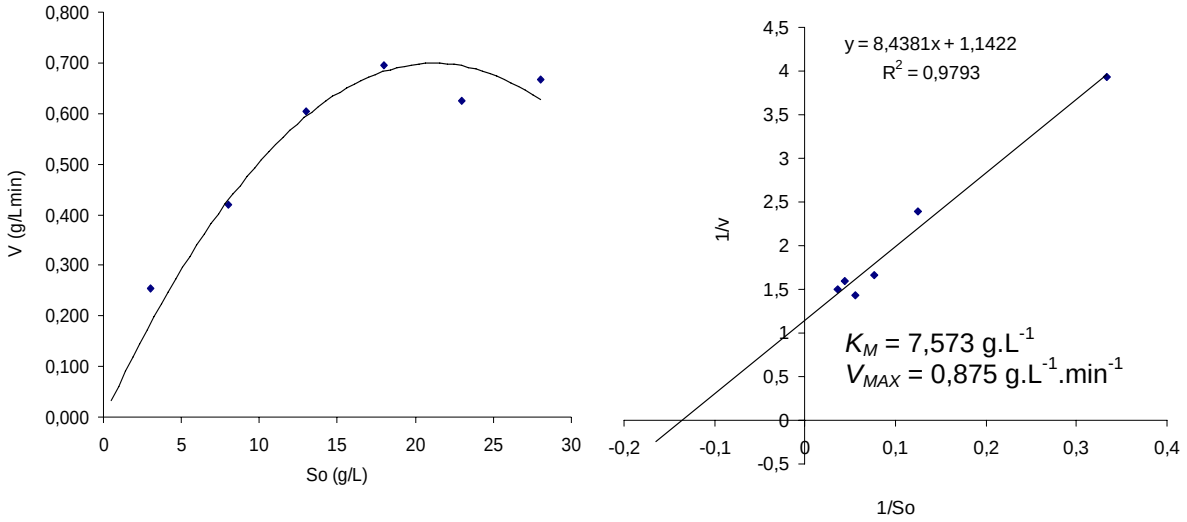


Figura 5.44. Gráfico de *Michaelis-Menten* (**A**) e a linearização por duplo recíproco de *Lineweaver-Burk* (**B**) para **CMCase** de *P. funiculosum*. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação.

5.11. Aplicação do preparado celulásico LADEBIO/BR na hidrólise de celulignina de bagaço de cana

Objetivando-se avaliar o desempenho do preparado celulásico concentrado de *P. funiculosum* com um preparado comercial da empresa Genencor (Multifect®), assim como investigar o possível sinergismo entre o produto enzimático desenvolvido no presente trabalho com o preparado comercial, realizaram-se experimentos de hidrólise enzimática de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada (CLBPD). Para tal, ao substrato foi aplicada uma carga enzimática de 25FPU/g, quando os preparados eram adicionados isoladamente, ou quando combinados ao meio era adicionado metade da carga enzimática de cada um (12,5 FPU/g). Adicionalmente, para se avaliar a efetividade da adição do preparado de *P. funiculosum*, foi realizada a hidrólise de CLBPD também utilizando apenas 12,5 FPU/g da enzima comercial. Os resultados desta série de experimentos estão exibidos na Figura 5.45.

Verificou-se que o preparado comercial Multifect liberou no máximo 12,9 g/L de glicose em 18 horas de hidrólise enzimática, quando adicionado de uma carga de 25 FPU/g e 9,1 g/L quando adicionado de 12,5 FPU/g, correspondendo a 66,3 e 46,7% de rendimento de hidrólise, respectivamente (Tabela 5.21). Os valores desta variável de resposta foram significativamente aumentados quando metade da carga

da enzima comercial foi substituída pelo preparado enzimático de *P. funiculosum* (M12,5 P12,5), elevando a concentração de glicose liberada para 18,4 g/L, o que representa um rendimento de hidrólise de 94,8%. O preparado enzimático de *P. funiculosum* (P25) liberou ao final de 18 horas, 16,7 g/L de glicose, correspondendo a um rendimento de hidrólise de 85,9%. Ficou evidenciada não somente a superioridade do preparado LADEBIO/BR, como também o positivo sinergismo que o mesmo confere ao preparado comercial. Isto, seguramente, se deve a diferentes proporções das principais atividades enzimáticas que fazem parte do *pool* celulásico. Conforme reportado recentemente na literatura, através de um artigo de nosso grupo de pesquisa (CASTRO *et al.*, 2010), diferentes fungos filamentosos produzem enzimas do complexo celulásico em proporções variadas. O experimento controle, no qual os preparados enzimáticos foram substituídos pela adição de tampão, não apresentou, como esperado, liberação de glicose, demonstrando que somente a temperatura de 50°C não foi suficiente para que ocorresse hidrólise.

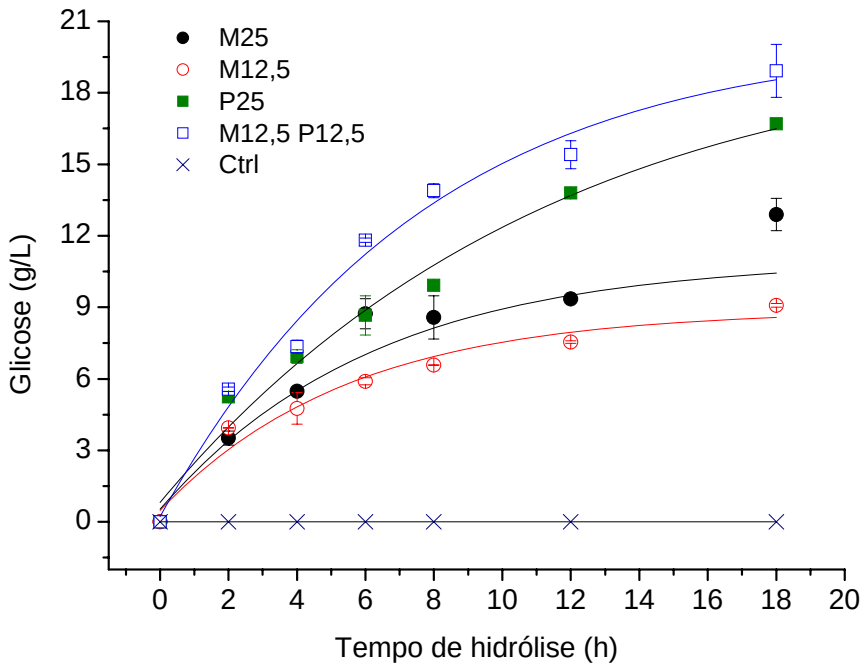


Figura 5.45. Cinética de hidrólise enzimática de celulignina de bagaço de cana. Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70 % celulose). **M25** (Multifect 25 FPU/g); **M12,5** (Multifect 12,5 FPU/g); **P25** (enzima de *P. funiculosum* 25 FPU/g); **M12,5 P12,5** (Multifect 12,5 FPU/g + enzima de *P. funiculosum* 12,5 FPU/g).

Tabela 5.21. Rendimento de hidrólise de celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada por celulases de *Penicilium funiculosum* (P) e enzima comercial Multifect (M). Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70% celulose).

Enzima	**Carga enzimática (FPU/g)**	**Rendimento (%)**
M25	25	66,3 ± 3,5
M12,5	12,5	46,7 ± 0,4
P25	25	85,9 ± 1,1
M12,5 P12,5	25	94,8 ± 2,0

M25 (Multifect 25 FPU/g); M12,5 (Multifect 12,5 FPU/g); P (enzima de *Penicillium funiculosum* 25 FPU/g); MP (Multifect 12,5 FPU/g+ enzima de *P. funiculosum* 12,5 FPU/g).

Os rendimentos de hidrólise alcançados neste estudo foram bastante superiores aos obtidos por Martins *et al*. (2008), Juhász *et al*. (2005a), Sukumaran *et al*. (2009), Jorgensen e Olsson (2006) e Jorgensen *et al*. (2005), que trabalharam com diversas fontes celulósicas e celulases de diferentes origens, conforme se observa na Tabela 5.22.

Por meio de análise de variância (ANOVA) verificou-se que houve efeito estatístico significativo entre tratamentos, ou seja, as enzimas diferiram entre si quanto à liberação de glicose ao final de 18 horas de hidrólise (Tabela 5.23). Pelo teste de Tukey constatou-se que a combinação de preparado enzimático que permitiu maior liberação de glicose, foi o de Multifect + *Penicillium* (MP), seguido pelo preparado de *Penicillium* (Tabela 5.24).

Constata-se que os preparados cuja composição continha celulases de *P. funiculosum*, apresentaram melhoria no rendimento de hidrólise. Possivelmente, este bom desempenho dos sistemas celulásicos de *P. funiculosum* deve-se ao fato de este fungo ser capaz de secretar sistemas celulásicos com atividades balanceadas, como mencionado anteriomente (CASTRO *et al.*, 2010). Jorgensen e Olsson (2006) também reportam que diversas espécies do gênero *Penicillium* têm mostrado a habilidade de produzir sistema enzimático completo e melhor relação entre as atividades FPásica e β-glucosidásica do que o tradicional fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, que é o microrganismo mais utilizado na produção comercial destas enzimas.

Tabela 5.22. Rendimento de hidrólise de celulose de diversas fontes.

Origem da enzima	**Fonte celulósica**	**Celulose (g/L)**	**Tempo de hidrólise (h)**	**Carga enzimática (FPU/g)**	**Rendimento de hidrólise (%)**
P. equinulatum (1)	Polpa *kraft* branqueada	20,0	24	10	43,94
Celuclast 1.5 (1)	Polpa *kraft* branqueada	20,0	24	10	32,15
Celluclast + Novozym 188 (1)	Polpa *kraft* branqueada	20,0	24	10	46,71
T. reesei RUT C30 (2)	Sabugo de milho pré-tratado	20,0	24	15	59,00
T. reesei RUT C30 (2)	Sabugo de milho pré-tratado	20,0	24	15	30,00
T. reesei RUT C30 (2)	Solka floc	20,0	24	15	31,00
T. reesei RUT C30 (2)	Solka floc	20,0	24	15	36,00
T. reesei RUT C30 (2)	Abeto	20,0	24	15	23,00
Celuclast (2)	Sabugo de milho pré-tratado	20,0	24	15	41,00
P. brasilianum (3)	Sigmacell	25,0	69	25	77,00
P. pinophilum (4)	Abeto	21,7	24	25	48,00
Celluclast (4)	Abeto	21,7	24	25	14,00
Celluclast + Novozym 188 (4)	Abeto	21,7	24	25	59,00
T. reesei + *A. niger* (5)	Bagaço de cana	20,0	24	80 (+10 BGLU/g)	3,79
T. reesei + *A. níger* (5)	Bagaço de cana	20,0	48	50 (+5 BGLU/g)	17,64

(1) Martins et al. (2008); (2) Juhász et al. (2005a); (3) Jorgensen e Olsson (2006); (4) Jorgensen et al. (2005); (5) Sukumaran et al. (2009).

Tabela 5.23. Quadro de análise de variância do experimento, ao final de 18 h de hidrólise.

C. Variação	**G.L.**	**S.Q.**	**Q.M.**	***F***
Tratamentos	3	112,50	37,50	312,5**
Resíduo	4	0,48	0,12	
Total	7	112,98		

Tabela 5.24. Teste de Tukey para hidrólise enzimática ao final de 18 h.

Tratamentos	**Glicose liberada (g/L)**
Multifect + *Penicillium*	18,91 a
Penicillium	16,70 b
Multifect 25 FPU/g	12,89 c
Multifect 12,5 FPU/g	9,08 d

Letras iguais não apresentam diferença estatística entre si, em nível de 5 % de significância. DMS = 1,41

Além disso, a mistura de diferentes tipos de celulases permite um maior sinergismo. Hoshino *et al*. (1997) avaliaram o sinergismo entre pares de exo e endoglucanases e observaram que os maiores graus de sinergismo envolvem as enzimas CBHI e CBHII com outras enzimas e entre si. Reiterando, nossos achados vão ao encontro das observações destes autores, pois através da técnica de LC/MS/MS, foram identificadas, em nosso estudo, a presença majoritária destas enzimas (item 5.9.3) produzidas por *P. funiculosum*. Além da presença de CBH I e CBHII, verifica-se que este fungo é um bom produtor também de β-glucosidases, enzimas-chave na produção de glicose, que é o substrato para a produção de etanol de segunda geração.

A razão entre as atividades FPásica e β-glucosidásica do extrato bruto de *P. funiculosum* foi de 1:3,8 e do preparado Multifect foi de 1:0,8. Em processos SSF, esta razão é importante para evitar o acúmulo de celobiose no meio, que é um inibidor das celobiohidrolases. O efeito positivo da adição de preparado celulásico de *P. funiculosum* na diminuição da concentração de celobiose pode ser observado na Figura 5.46, na qual também se verifica o acúmulo de celobiose somente nos meios hidrolisados com a enzima comercial, aplicando-se tanto a carga enzimática de 12,5 FPU/g quanto a de 25 FPU/g, permanecendo no meio, 0,89 g/L e 2,28 g/L de celobiose, respectivamente. Já nos meios hidrolisados pela mistura de enzima comercial com preparado de *P. funiculosum* houve apenas um acúmulo inicial, porém, a celobiose foi convertida a glicose após duas horas, indicando a boa atuação de β-glucosidases de *P. funiculosum* na mistura enzimática.

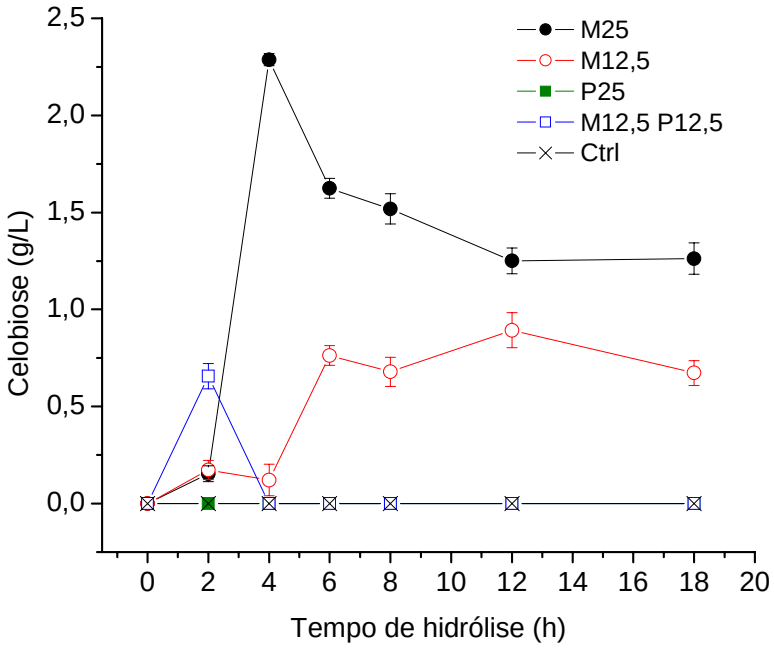


Figura 5.46. Celobiose liberada durante 18 horas de hidrólise. Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70 % celulose). **M25** (Multifect 25 FPU/g); **M12,5** (Multifect 12,5 FPU/g); **P25** (enzima de *Penicillium funiculosum* 25 FPU/g); **M12,5P12,5** (Multifect 12,5 FPU/g+ enzima de *P. funiculosum* 12,5 FPU/g).

5.12. Hidrólise enzimática do bagaço com diferentes níveis de deslignificação e efeito da adição de BSA na hidrólise do bagaço pré-tratado

A literatura é controversa no que se refere à necessidade de deslignificar o material lignocelulósico, particularmente quando a produção de etanol de segunda geração é considerada, já que este biocombustível classifica-se no grupo de produtos da Biotecnologia como de baixo valor agregado, havendo a necessidade imperiosa de se estabelecerem compromissos com a economicidade do processo tecnológico. Foi com esta inquietude, ou seja, a de se avaliar a imprescindibilidade da deslignificação de celulignina de bagaço de cana que esta série de experimentos foi realizada.

Partindo-se da premissa de que a principal função da deslignificação era a de melhorar a acessibilidade das enzimas, em particular endo e exoglucanases, às fibras celulósicas e de que o agente alcalino (NaOH) empregado no pré-tratamento da celulignina de bagaço de cana (CLBC), embora eficiente era um insumo que podia onerar o custo de produção do etanol de segunda geração, programou-se esta série experimental, na qual buscou-se pela máxima redução das concentrações de

hidróxido de sódio, sem que isto comprometesse o rendimento de hidrólise enzimática.

Na Figura 5.47 estão apresentados os resultados do efeito de diferentes graus de deslignificação alcalina na hidrólise enzimática de CLBC. Observou-se que não houve diferença significativa na hidrólise de CLBC tratada com 1 ou 4% de NaOH. A CLBC tratada com 0,5% de NaOH apresentou bom grau de hidrólise enzimática nas primeiras 12 h, no entanto, após este tempo, verificou-se uma diminuição na eficiência hidrolítica, quando comparada com a CLBC tratada com 1 ou 4% de NaOH. Já a hidrólise enzimática de CLBC pré-tratada com 0,1% de NaOH foi pouco eficiente.

A diminuição da eficiência na hidrólise de CLBC tratada com baixas concentrações de NaOH deve-se, seguramente, à barreira física ocasionada pela lignina residual, dificultando o acesso das enzimas à celulose. Além disso, a lignina residual pode adsorver as celulases irreversivelmente, reduzindo assim, a carga enzimática disponível para hidrólise (SUTCLIFFE e SADDLER, 1986; TATSUMOTO *et al*., 1988). Neste sentido, em consonância com o trabalho de Yang e Wyman (2005), buscou-se pela investigação também da adição de BSA ao meio reacional, que se ligaria à lignina residual, deixando as enzimas disponíveis para a hidrólise propriamente dita.

Assim como a adição de BSA, surfactantes e polímeros podem ser utilizados para a melhoria da hidrólise enzimática. Gomes (2009) fez uso de tween e PEG na sacarificação de celulignina de bagaço de cana e constatou um aumento da conversão de glucana a glicose. No caso de surfactantes, os grupamentos de óxido de etileno favorecem as ligações de hidrogênio entre os átomos de oxigênio das ligações éter e as hidroxilas fenólicas da lignina. Além disso, ocorrem as interações hidrofóbicas entre os grupamentos fenil da lignina e os grupamentos CH_2 e CH_3 dos surfactantes. Estas interações intermoleculares fazem com que o surfactante ocupe um volume na superfície do material sólido, diminuindo assim a adsorção das enzimas.

Contrariando os achados de Yang e Wyman (2005), que observaram melhoria na eficiência de hidrólise de palha de milho, aplicando BSA duas horas antes da adição de celulases, verificou-se no presente trabalho que não houve diferenças estatísticas significativas entre os meios adicionados ou não de BSA.

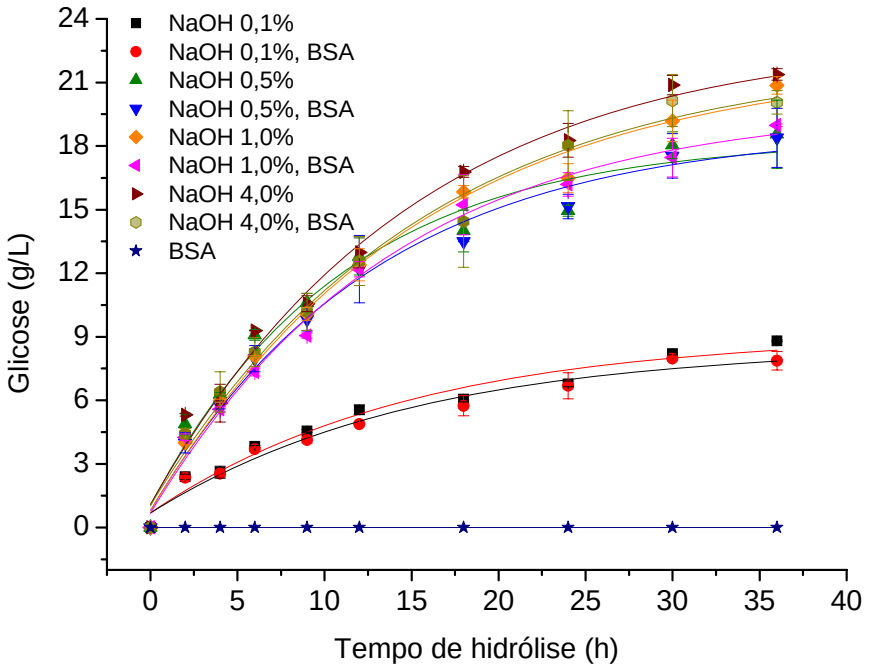


Figura 5.47. Cinética da hidrólise enzimática de celulignina de bagaço de cana pré-tratada com diferentes graus de deslignificação (NaOH em diferentes concentrações) e ausência e presença de BSA. Enzima utilizada: M12,5P12,5 (Multifect 12,5 FPU/g+ enzima de *P. funiculosum* 12,5 FPU/g). Concentração de sólidos, 25 g/L; carga enzimática, 18,5 FPU/g.

5.13. Produção de etanol de segunda geração por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) utilizando o preparado celulásico LADEBIO/BR

Nesta seção estão apresentados os resultados dos ensaios envolvidos no processo SSF, incluindo as atividades celulásicas nas temperaturas aplicadas no processo; produção de células; ensaios em fermentômetro; e, finalmente, a produção de etanol por SSF em biorreator de bancada com o produto desenvolvido no presente estudo.

5.13.1. Atividades celulásicas

O preparado celulásico LADEBIO/BR apresentou atividades FPásica de 63,1 U/mL, CMCásica de 602,0 U/mL e β-glucosidásica de 140,6 U/mL (Tabela 5.16). Na Tabela 5.25 estão apresentados os resultados das atividades relativas das celulases nas temperaturas aplicadas no processo SSF, 37 e 50°C. Foram consideradas como 100% de atividades celulásicas, aquelas alcançadas na temperatura de 50°C. Verificou-se que as atividades enzimáticas são reduzidas em 20 a 30% com a diminuição da temperatura de 50 para 37°C. Castro (2006) avaliou a atividade de

celulases de *P. funiculosum* a 37, 50 e 60°C e observou uma redução de aproximadamente 15% das atividades celulásicas. A redução das atividades com a diminuição da temperatura é esperada, uma vez que as celulases apresentam faixa de temperatura ótima entre 50 e 55°C. Em temperaturas inferiores à ótima, as enzimas diminuem sua atividade por estarem com sua conformação alterada (grau de enovelamento diferente do ótimo). As velocidades de reação diminuem, portanto, quanto mais distante da faixa ótima de temperatura o sistema reacional estiver.

Tabela 5.25. Atividades relativas do preparado celulásico LADEBIO/BR a 37 e 50°C.

	Atividade relativa (%)		
Temperaturas (°C)	**FPásica**	**CMCásica**	**β-glucosidase**
37	79,4	73,4	66,5
50	100,0	100,0	100,0

5.13.2. Produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* JP1

Na Figura 5.48 está apresentado o perfil de produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* linhagem JP1, utilizada para produção de etanol através da estratégia SSF. Observa-se que o crescimento celular em batelada alimentada foi bem eficiente atingindo concentração de células de 8,5 g/L (massa seca) em 15 h de crescimento, permitindo um aumento de 70% na concentração celular em relação a batelada simples inicial.

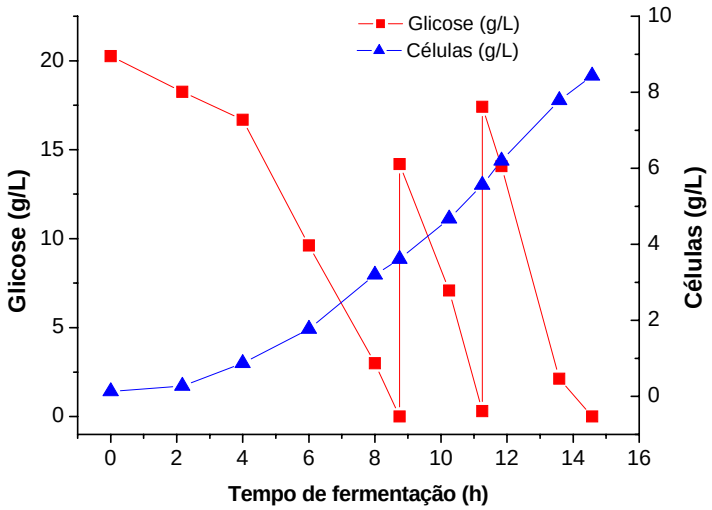


Figura 5.48. Produção de células de *Sacharomyces cerevisiae* JP1 por processo em batelada alimentada. S_o = 20 g/L, temperatura = 37 °C, DO_2 = 60%.

A melhor produção de células em biorreator se dá pelos melhores controles das condições de aeração, agitação, pH, nível de oxigênio dissolvido e alimentação do meio com fontes de carbono e outros nutrientes. Na batelada alimentada por pulso a glicose foi fornecida sempre que esta atingia baixos níveis. Esta forma de condução permite estender a fase exponencial de crescimento e manter baixos os níveis de substrato, evitando assim, o efeito repressor da glicose sobre o metabolismo da levedura, sendo esta estratégia altamente recomendada quando o produto do bioprocesso forem células microbianas, exemplo típico é a produção de levedura de panificação.

5.13.3. Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado de celulignina de bagaço de cana utilizando o preparado celulásico LADEBIO/BR

Em experimentos anteriores foi mostrado que o preparado celulásico LADEBIO/BR apresentou bom rendimento de hidrólise de celulignina quando comparado a um preparado comercial. Nesta etapa, foi avaliada a fermentabilidade dos açúcares liberados pela hidrólise realizada pelo preparado celulásico obtido *in situ*. Na Figura 5.49 está apresentado o perfil cinético da produção de etanol equivalente produzido em fermentômetro (estimado estequiometricamente pela liberação de CO_2).

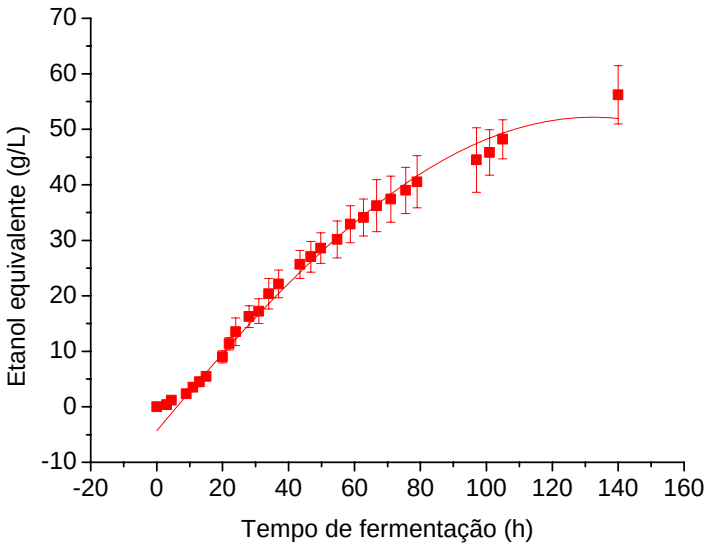


Figura 5.49. Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado de celulignina de bagaço de cana, em fermentômetro.

Observa-se que a concentração de etanol equivalente atingiu o valor de 55 g/L. Considerando que o meio continha 200 g/L de celulignina, com 68% de celulose em sua composição, e considerando também que na conversão de celulose a glicose a concentração de celulose deve ser multiplicada pelo fator 1,1, decorrente da incorporação de água, atinge-se uma concentração teórica de glicose de 150 g/L. Desta forma, o valor da concentração de etanol máxima obtenível seria de 76,6 g/L. Logo, o valor de etanol equivalente alcançado neste ensaio pode ser considerado satisfatório (eficiência de fermentação de 72%), tendo em vista se tratar de uma avaliação ainda preliminar da fermentabilidade do hidrolisado enzimático gerado pelo preparado LADEBIO/BR.

5.13.4. Produção de etanol de segunda geração por processo SSF alimentado em biorreator

Estudos realizados no LADEBIO já apontavam que em processos SSF, a concentração de etanol era limitada pela concentração de sólidos (VÁSQUEZ, 2007) devido a limitações difusionais, relacionadas à transferência de massa. Reduzindo, assim, o rendimento de hidrólise de materiais lignocelulósicos e, em alguns casos, o seu próprio impedimento. A fim de se buscar por uma solução para este problema, incorporou-se uma inovação ao processo, alimentando o biorreator com sólidos, em momentos nos quais o meio se tornava liquefeito. Dessa forma, a relação sólido:líquido se manteve baixa o suficiente para minimizar os clássicos problemas de transferência de massa.

Na Figura 5.50 estão apresentados os perfis de produção de etanol e consumo de glicose e celobiose durante o processo SSF em batelada alimentada. A faixa vertical em cinza indica a fase de pré-hidrólise enzimática (12 h) e a partir do ponto zero (0), a fase de sacarificação e fermentação simultâneas. As setas indicam o ponto de perturbação do sistema com alimentação com carga de celulignina (massa seca). Ao final da fase de pré-hidrólise, a glicose atingiu valores de 64 g/L e o meio apresentava-se liquefeito, sendo possível a inoculação com a levedura JP1 e a primeira alimentação com celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada. Ao longo do processo pode ser observada a redução da produtividade volumétrica em etanol (Q_P). Este comportamento reflete a redução progressiva da taxa de formação de produto. De acordo com Vásquez (2007) a hidrólise enzimática é etapa limitante do processo SSF, particularmente quando o

meio a ser fermentado é inoculado com altas concentrações celulares, levando a levedura a consumir a glicose em elevadas taxas. Se observarmos a produtividade nas primeiras 8 horas de fermentação, fase em que a glicose está prontamente disponível, o valor deste parâmetro variou de 5 a 9 g/L.h, ou seja, os mesmos verificados em fermentações de etanol a partir do caldo de cana no Brasil, 5–8 g/L.h. Logo, a taxa de formação de etanol passou a ser limitada pela taxa de hidrólise enzimática a partir 8 h de fermentação, quando a concentração de glicose foi mantida em níveis baixos.

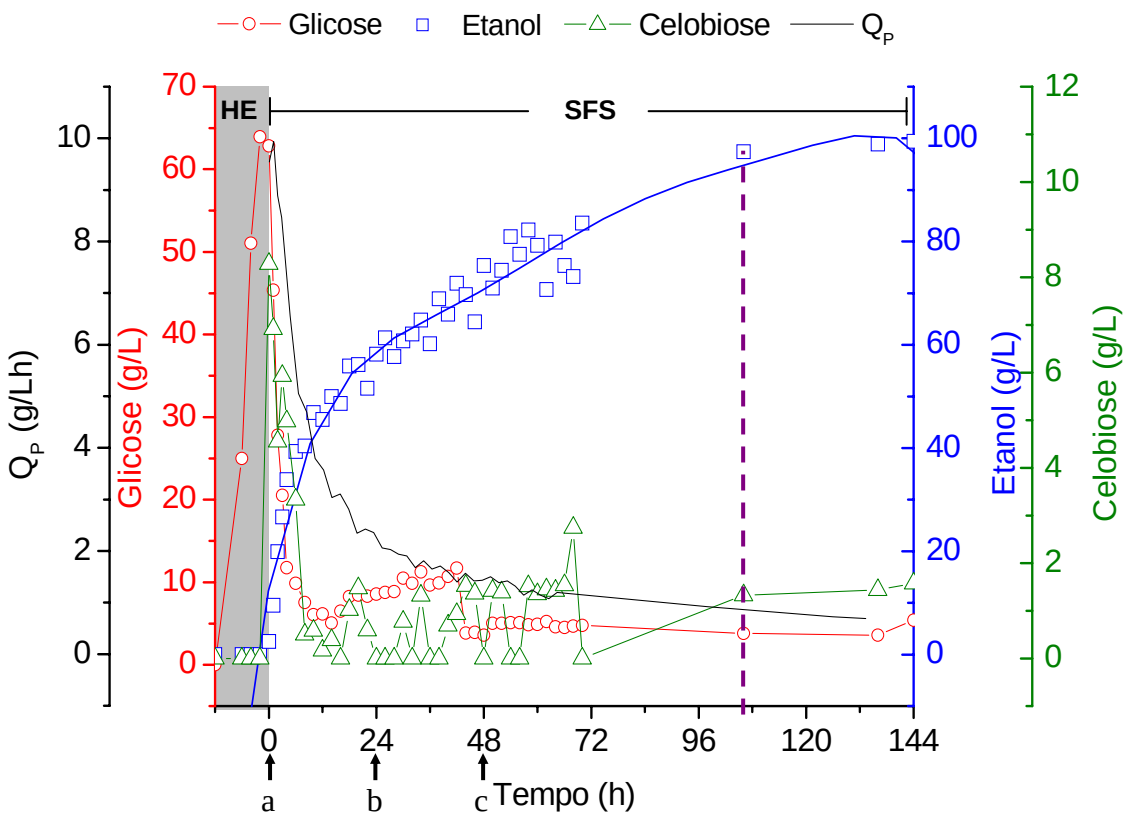


Figura 5.50. Cinética de produção de etanol por processo **SSF** utilizando celulases de *P. funiculosum* (Preparado Celulásico LADEBIO/BR) em batelada alimentada. As setas indicam os tempos nos quais o sistema foi alimentado com celulignina parcialmente deslignificada. (**a**) alimentação com 50 g; (**b**) alimentação com 25 g; e, (**c**) alimentação com 25 g de celulignina. A faixa em cinza indica a fase de pré-hidrólise enzimática (**HE**) de 12 h. A linha pontilhada em roxo indica o tempo de 106 h quando se atingiu a maior produção de etanol.

De acordo com Rudolf *et al*. (2005), Sassner *et al*. (2006), Sassner *et al*. (2007) a taxa de hidrólise enzimática em muitos casos reportados sobre processos SSF, é a taxa que governa um processo SSF, então, a concentração de células pode ser reduzida. Olofsson *et al*. (2008) reportaram que não há uma forte correlação positiva entre o tamanho do inóculo e a produção de etanol, em processos com concentrações de células acima de 1 a 2 g/L para condições típicas de SSF (10 % de sólidos e 30 FPU/g). Sendo assim, o tamanho de inóculo poderia ser reduzido neste processo.

As elevadas concentrações de etanol atingidas no presente estudo, além da boa atuação do preparado celulásico sobre a celulignina de bagaço de cana, sinalizam para uma possível utilização deste produto enzimático para produção de etanol de segunda geração em escala produtiva. Considerando os resultados obtidos, estima-se que para cada tonelada de celulignina de bagaço de cana, obtêm-se 380 L de etanol. Para esta estimativa, considerou-se a concentração inicial de sólidos de 33,3 % m/v, o etanol produzido de 100 g/L e a densidade do etanol de 0,789 kg/L.

Os resultados obtidos neste estudo, utilizando processo SSF alimentado, são bastante promissores quando comparados aos estudos recentes reportados na literatura, conforme se observa nas Tabela 5.26 e 2.11 (item 2.4.8). Nota-se que a maioria dos trabalhos realizados com o processo SSF utilizaram baixas concentrações de sólidos iniciais (menor ou igual a 10%). No presente estudo, optou-se por utilizar altas concentrações de sólidos que assegurassem altas concentrações de etanol, já que esta é uma condição *sine qua non* para a viabilidade técnico-econômica de processos químicos e bioquímicos, particularmente quando a tecnologia de produção envolve produtos de baixo valor agregado. Não conseguimos localizar trabalhos publicados na literatura com descrição de processos reportando concentrações de etanol tão elevadas quanto as obtidas no presente trabalho de pesquisa.

Tabela 5.26. Condições empregadas no SSF para produção de etanol encontradas na literatura (HE: Hidrólise Enzimática).

Material	Pré-tratamento	Pré-HE	Carga enzimática		Teor de sólido (%)	Microrganismo	Células (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo (h)	Q*p* (g/L.h)	Referência
			FPase (FPU/g)	β-glucosidase (UI/g)							
Bagaço de cana	H_2SO_4 e NaOH	12h	12,5	28,0	33	*S. cerevisiae* JP1	15,0	97,5	106	0,92	Presente estudo
Rejeito da indústria de celulose	Não	16 h	17,5	-	20	*S. cerevisiae* JP1	8,0	74,6	48	1,55	Silva (2010)
Cavaco de *Pinus*	H_2SO_4 e $NaHSO_4$	12 h	15,0	22,5	8	*S. cerevisiae*	2,0	41,8	_	_	Zhu *et al.* (2010)
Palmiste	Não	48 h	6,0	_	30	*S. cerevisiae* panificação	7,0	70,0	216	0,32	Jorgensen *et al.* (2010)
Madeira de oliva	Explosão com vapor (SO_2) e deslignific. peróxido alcalino	Não	15,0	12,6	10	*S. cerevisiae*	_	29,4	72	0,41	Ruiz *et al.* (2006)
Caule de girassol	Explosão com vapor (SO_2) e deslignific. peróxido alcalino	Não	15,0	12,6	10	*S. cerevisiae*	_	20,9	72	0,29	Ruiz *et al.* (2006)

Tabela 5.26. Condições empregadas no SSF para produção de etanol encontradas na literatura (HE: Hidrólise Enzimática). Cont.

Material	Pré-tratamento	Pré-HE	Carga enzimática		Teor de sólido (%)	Microrganismo	Células (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo (h)	Q*p* (g/L.h)	Referência
			FPase (FPU/g)	β-glucosidase (UI/g)							
Bagaço de cana	Ácido e deslignific. com NaOH	12 h	26,0	17	30	*S. cerevisiae* panificação	6,0	70,0	50	1,21	Vásquez (2007)
Bagaço de cana	Ácido e deslignific. com NaOH	12 h	25,0	–	23	*Z. mobilis*	4,0	60,0	36	1,66	Santos *et al.* (2010)
Sabugo de milho	Ácido (H_2SO_4)	48 h	8,0	–	12,5	*K. marxianus*	10,0	5,68	48	0,12	Zhang *et al.* (2009)
Silagem de milho	Hidrotémico	24 h	30,0	–	13	*S. cerevisiae* panificação	0,2	20,0	194	0,10	Xu *et al.* (2009)
Palha de milho	Explosão com vapor (SO_2)	16 h	10,0	16,7	10	*S. cerevisiae* panificação	1,0	26,7	96	0,28	Öhgren *et al.* (2007)
Palha de trigo	Explosão com vapor (H_2SO_4)	Não	15,0	12,6	10	*K. marxianus*	0,2	0,6	72	0,01	Ballesteros *et al.* (2006)
Palha de cevada	Explosão com vapor (H_2SO_4)	Não	20,0	25,0	10	*S. cerevisiae*	5,0	25,0	120	0,21	Linde *et al.* (2006)

Dadas as condições de rendimentos e etanol produzido, realizou-se um balanço de massa do processo SSF, tendo sido considerados:

- Massa de celulignina adicionada: 200 g;
- Volume total de meio: 600 mL;
- Concentração de etanol: 100 g/L;
- Eficiência de fermentação: 95%;
- $Y_{P/S}$: 0,485 g_P/g_S (valor aproximado normalmente observado no LADEBIO em fermentações de glicose);
- Fator de conversão de glicose à celulose: 0,90 (coeficiente que resulta da relação entre a massa molecular do polímero e do monômero de glicose);
- Rendimento de hidrólise: 85% (dados experimentais, Tabela 5.21);
- Conteúdo de celulose na celulignina: 68%.

Verificou-se que até o final do processo, foram consumidos 81,87% (163,74 g) de celulignina, ou seja, ainda restaram 36,26 g de celulignina, o que corresponde a 18,13 % da celulignina adicionada integralmente.

Uma vez que as primeiras horas de fermentação apresentaram Q_P dentro do observado em fermentações industriais convencionais, o processo foi limitado exclusivamente pela hidrólise enzimática, o que levou à sobra de cerca de 20% da carga de celulignina. Sendo assim, devem-se envidar esforços para melhoria desta etapa. Sabe-se que a cinética enzimática de reações *Michaelianas* é de primeira ordem até se atingir a velocidade máxima de reação. Em outras palavras, a velocidade da reação é influenciada pela concentração de substrato, logo, no decorrer do processo, como o substrato é consumido, é natural que a velocidade de hidrólise da celulignina diminua consideravelmente.

Outro fator para redução da velocidade de reação, a qual limita as taxas do processo SSF, é a liberação da lignina com o consumo de substrato, provocando ligações improdutivas entre este composto polifenólico e as enzimas, como já discutido anteriormente.

Uma solução que pode ser proposta é a alimentação do sistema com uma carga extra de enzima após observação da redução da taxa da fermentação (reflexo da redução da taxa de hidrólise). Esta estratégia é baseada também na cinética enzimática, já que a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração de enzima, em uma reação uni-uni *Michaeliana*. Porém, esta

estratégia deve ser cuidadosamente estudada, especialmente quanto ao aspecto econômico, já que implica no aumento da carga enzimática. Outra estratégia que pode ser investigada, apesar de os resultados do uso de BSA na hidrólise enzimática de celulignina não terem sido significativos, é o uso de outras substâncias adsorventes à lignina. Assim, os locais de reação da lignina já estariam ocupados com estas substâncias adsorventes, concorrendo diretamente com a enzima, podendo-se ser reduzidos os locais nos quais as enzimas se ligariam à lignina.

Capítulo 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com os resultados obtidos na presente tese de doutorado, pode-se concluir que:

- O pré-tratamento ácido e alcalino do bagaço foi eficiente, com aumento da concentração de celulose de 34 para 68 %;
- Para o pré-tratamento alcalino, a concentração da solução de NaOH pode ser reduzida para 1% (m/v);
- A celulose, tanto comercial quanto a de origem lignocelulósica, tem papel indutor na produção de enzimas com atividades FPásica e CMCásica;
- As β-glucosidases de *P. funiculosum* são, em parte, constitutivas, porém sua maior produção é obtida quando induzidas somente por celulose;
- Dentre as fontes de nitrogênio avaliadas, a uréia e o extrato de levedura são as de maior importância para produção de celulases;
- As condições ótimas de concentração das fontes de nitrogênio foram de 0,97 g/L de uréia e 0,36 g/L de extrato de levedura;

- A melhor produção de celulases em reator é obtida com pré-inóculo crescido em celulignina com concentração inicial de células de 10 %v/v;
- A otimização das fontes de nitrogênio, através do uso da metodologia de planejamento experimental foi bem sucedida, visto que se obtiveram as concentrações ótimas de nitrogênio para as três atividades celulolíticas simultaneamente. Pode-se afirmar que o uso desta metodologia, com sensibilidade e exatidão adequadas, possibilitou eliminar a peptona, o que pode trazer como conseqüência a redução dos custos relacionados com o preparo do meio de produção;
- A tecnologia de concentração por ultrafiltração tangencial em membranas de fibras ocas com *cut-off* de 5 kDa foi a mais eficiente entre os métodos estudados, com perda máxima de 3% na atividade CMCásica e nulas em relação às atividades FPásica e β-glucosidásica.
- *Penicillium funiculosum* secreta no meio um sistema celulásico composto por quatro enzimas majoritárias, sendo CBH I, CBH II, β-glucosidase e endoglucanase;
- A enzima CBH I de *Penicillium funiculosum* foi capaz de hidrolisar celobiose, o que explica em parte a boa atividade β-glucosidásica;
- No sistema enzimático secretado por *P. funiculosum* são encontradas enzimas capazes hidrolisar a xilana e celulose simultaneamente;
- As enzimas de *P. funiculosum* são capazes de hidrolisar a celulignina, com rendimento de hidrólise de, aproximadamente, 85%, nas condições experimentais empregadas;
- A albumina de soro bovino não apresentou resultado significativo na melhoria da hidrólise enzimática de celulignina de bagaço de cana, nas condições experimentais estudadas;
- O preparado celulásico LADEBIO/BR apresenta estabilidade de no mínimo 300 h a 37 e 50°C e no mínimo 32 meses sob refrigeração;
- O preparado celulásico LADEBIO/BR foi eficiente no processo de sacarificação e fermentação simultânea para produção de etanol de segunda geração, tendo sido gerado etanol em concentração de 100 g/L.

SUGESTÕES

- Otimizar o meio mineral e avaliar a produção de celulases em biorreator, modificando a relação C/N, pH e fonte de carbono, com o fim de aumentar a produção e produtividade;
- Buscar por meios nutritivos de menor custo em substituição às fontes minerais e nitrogenadas utilizadas neste estudo, sem prejudicar a produção e produtividade das celulases por *P. funiculosum*;
- Estudar mais profundamente o uso de outras substâncias como surfactantes a fim de se reduzir o efeito adsortivo das enzimas à lignina durante a hidrólise de material lignocelulósico;
- Avaliar o efeito da concentração de etanol nas atividades das celulases;
- Estudar processo SSF com alimentação com carga enzimática extra após início da fermentação para, dessa forma, reduzir o tempo de processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahão Neto, J. Purificação de enzimas. In: Lima, U. A., Aquarone, E. A., Borzani, W.; Schmidell, W., Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v.3, Edgard Blücher Ltda, São Paulo (2001).

- Adsul, M.G., Ghule, J.E., Singh, R., Shaikh, H., Bastawde, K.B., Gokhale D.V., Varma A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. Carbohyd. **Polym**. v. 57, n. 1, p. 67-72, 2004.

- Aguiar, C.L.; Menezes, T.J.B. Produção de celulases e xilanases por Aspergillus niger IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B.CEPPA**. v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

- Aiello, C.; Ferrer, A.; Ledesma, A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioresource Technology**, v.57, p.13-18, 1996.

- Alfenas, A. C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresour Technol**. v. 101, p. 4851–4861, 2010.

- Arantes, V., Saddler, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**. v. 3, p. 1-11, 2010.

- Arato, C,; Pye, E.K.; Gjennestad, G. The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 121, p. 871–882, 2005.

- Archer, D. B., and J. F. Peberdy. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. **Crit. Rev. Biotechnol**. v. 17, p.273-306, 1997.

- Atalla, R.H.; Vanderhart, D.L. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. **Science**. v. 223, p. 283–285, 1984.

- Awafo V.S., Chahal D.S., Simpson Bk, Le G.B.B. Production of cellulase systems by selected mutants of Trichoderma reesei in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 57/58, p. 461-470, 1996.

- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochem**. v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 2004.

- Ballesteros, I.; Negro, M.J.; Oliva, J.M.; Cabañas, A.; Manzanares, P.; Ballestores, M. Ethanol production from steam-explosion pretrated wheat straw. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 129-132, p.496-508, 2006.

- Barr, B.K.; Holewinski R.J. 4-Methyl-7-thioumbelliferyl-beta-D-cellobioside: a fluorescent, *nonhydrolyzable* substrate analogue for cellulases. **Biochemistry**. v. 41, p. 4447–4452, 2002.

- Baskin, T.I.; Meekes, H.T.H.M.; Liang, B.M., Sharp, R.E. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils. **Plant Physiol**. v. 119, p. 681–692, 1999.

- Beguin, P.; Albert, J.P. The microbial degradation of cellulose. FEMS **Microbiol**. Rev., v. 13, p. 25-58. 1993

- Betancur, G.J.V. **Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Pichia stipits***. 2005, 123 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

- Bhat, K.M.; Hay, A.J. Claeyssens M, Wood TM. Study of the mode of action and site-specificity of the endo-(1-4)-beta-D-glucanases of the fungus *Penicillium pinophilum* with normal, 1-3H-labelled, reduced and chromogenic cello-oligosaccharides. **Biochem J**. v. 266, p. 371–378, 1990.

- Bhat, M.K.; Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotecnology Advances**, v. 15, n. 3/4, p. 583-620, 1997.

- Boisset, C.; Chanzy, H.; Henrissat, B.; Lamed, R.L. Shoham, Y.; Bayer, E.A. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum cellulosome*: structural and morphological aspects. **Biochem** J. v. 340, p. 829–835, 1999.

- Bollók, M.; Réczey K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. **Acta Alimentaria**, v. 29, n. 2, p. 155-168, 2000.

- Bourne, Y.; Henrissat, B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. **Curr Opin Struct Biol**. v. 11, n. 5, p. 593-600, 2001.

- Bower, B.S. Fusion proteins of an exocellobiohydrolase and an endoglucanase for use in the saccharification of cellulose and hemicellulose. US patent 2005093073. 2005.

- Bragatto, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene ugdh de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**.2007.73 f. Dissertação. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP 2007.

- Buckeridge, M. **Parede celular**. <http://felix.ib.usp.br/pessoal/ marcos/fisio2008/PDF/PDF%20TEORICA/Parede%20celular.pdf> Departamento de Botânica/Instituto de Biociências – USP. Acesso em 05/10/2008.

- Bueno, R. Etanol de Celulose nos EUA - Resultados do investimento do governo norte-americano em P&D para barateamento de biocombustível começam a aparecer. **Boletim Eletrônico Inovação Unicamp**. 2007. Disponível em http://www.inovacao.unicamp.br/ etanol/report/news-etanol_celuloseEUA.php acessado em 10/06/2010.

- Bura R.; Mansfield S.D.; Saddler J.N.; Bothast R.J. SO_2-catalyzed steam explosion of corn fiber for ethanol production. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 98/100, p. 59–72, 2002.

- Bura, R.; Bothast, R.J.; Mansfield, S.D.; Saddler, J.N. Optimization of SO2-catalyzed steam pretreatment of corn fiber for ethanol production. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 105/108, p. 319–35, 2003.

- Carpita, N. G.; Gilbeaut, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Physiology**. v. 3, p. 1-3, 1993.

- Carvalho, M. L. A. **Otimização da produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa**. 2007, 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

- Castro, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2006, 212 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

- CAZY - **Carbohydrate-Active Enzymes Data Base**. <http://www.cazy.org/> acesso em 14/10/2008.

- Chanzy, H., Henrissat, B., Vuong, R., and Schulein, M. The Action of 1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase on *valonia* cellulose microcrystals. **An Electron Microscope Study. FEBS Lett**. V. 153, p. 113-118, 1983.

- Chaudhary, K.; Tauro, P. Sequential release of cellulose enzymes during germination of *Trichoderma reesei* spores. **Biosci**., v. 4, n 3, p. 281-286, 1982.

- Claeyssens, M.; Aerts, G. Characterisation of cellulolytic activities in commercial Trichoderma reesei preparations: an approach using small, chromogenic substrates. **Bioresour Technol**. v. 39, n. 143–146, 1992.

- Coelho, M.A.Z.; Leite, S.G.F.; Rosa, M.F.; Furtado, A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B. CEPPA**. v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

- Conessa, A.; Punt, P.; van Luijk, N.; van den Hondel, C. The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. **Fungal Genet. Biol**. v. 33, p. 155-171, 2001

- Corbett, W.M. Determination of the alpha-cellulose content of cotton and wood cellulose. **Methods Carbohydr Chem**. .v. 3, p. 27–8, 1963a.

- Corbett, W.M. Purification of cotton cellulose. **Methods Carbohydr Chem**. v. 3, p.3–4, 1963b.

- Coughlan, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**. v. 3, p. 39-109, 1985.

- Coutinho, P.M., Henrissat, B. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. **In** "Recent Advances in carbohydrate bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12. 1999.

- De-Paula, E.J., Pereira, R.T.L.; Ohno, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. alvarezii (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. **J. Appl. Phycol**. v. 11, p. 111–121, 1999.

- Domingues, F.C., Queiroz, J.A., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microbial Technol**. v. 26, p. 394–401, 2000.

- Domingues, F.C.; Queiroz, J.A.; Cabral, J.M.S.; Fonseca, L.P. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnology Letters**. v. 23, p. 771-775. 2001

- Dong XM, Revol J-F, Gray DG. Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. **Cellulose**. v. 5, p. 19–32, 1998.

- Emons, A.M.C.; Mulder, M. How the deposition of celulose microfibrils builds cell wall archtecture. **Trendes in Plants Science**. v. 5, p. 35-40, 2000.

- Eklund, R., Zacchi, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. **Enzyme Microb Technol**. v. 17, n. 3, p. 255-259, 1995.

- El-Nawwi, S.A.; El-Kader, A.A. Production of single cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. **Biomass and Bioenergy**. v. 11, n. 4, p. 361-364. 1996.

- Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, n. 3, p 353-364, 2002.

- Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A., Hayn, M. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and Pilot Scale. **Bioresource Technol**. v 36, p. 51–65, 1991.

- European Commission. Final Report: **Collection of Information on Enzymes**. Contract No B4-3040/2000/278245/MAR/E2. co-operation between the Federal Environment Agency Áustria and the Inter-University Research Center for Technology, Work and Culture (IFF/IFZ). Disponível em http://www.agronavigator.cz/attachments/enzymerepcomplete.pdf. 2002.

- Fengel, D. Wegener, G. **Woody chemistry, ultraestruture, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 613 p. 1989.

- Fierobe, H.P.; Bayer E.A.; Tardif C.; Czjzek M.; Mechaly A.; Belaich A. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. **J Biol Chem**. v. 277, p. 621–30, 2002.

- Fry, S.C. **The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis**. London: Longman Scientific and Technical. 246 p, 1988.

- Galbe M, Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 59, p. 618–28, 2002.

- García-Aparicio, M.P., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J.,. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v. 136–140, p. 353–365, 2007.

- Gerhartz, W. (Ed) **Enzymes in industry** – Production and applications. VCH Publishers, New York, NY USA, 1990.

- Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

- Gomes, A.C. **Aplicação de surfactants no pré-tratamento ácido e na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol**. 2009, 115 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

- Gong, C. S.; Tsao, G. T.: Cellulase and biosynthesis regulation. **Annu. Rep. Ferment. Processes.** v. 3, p. 111-140, 1979.

- Gow, L.A.; Wood, T.M. Breakdown of crystalline cellulose by synergistic action between cellulase components from *Clostridium thermocellum* and *Trichoderma koningii*. FEMS **Microbial Lett**. v. 50, p. 247–252, 1988.

- Green J.W. Wood cellulose. **Methods Carbohydr Chem**. v.3, p. 9–21, 1963.

- Gritzali, M.; Brown, R. D. The cellulase system of *Trichoderma*: relationship between purified extracellular enzymes from induced and cellulose grown cells. **Advances in Chemistry Series**. v. 181, p. 237-260, 1979.

- Gutirresz-correa, M. Portal, L.; Moreno, P.; Tengerdy, R.P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 68, p. 173-178, 1999.

- Habert, A.C.; Borges, C.P.; Nobrega, R. Processos de separação com membranas. Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.

- Hari Krishna, S., Janardhan Reddy, T., Chowdary, G.V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresour Technol**. v. 77, n. 2, p. 193-196, 2001.

- Hayashi, T. Xiloglucans in the primary cell wall. **Ann. Rev. Plant Physiol**. v. 40, p. 139-168. 1989.

- Hayashi, T.; Maclachlan, G. Pea Xyloglucan and Cellulose : I. Macromolecular Organization. **Plant Physiol**. v. 75, n. 3, p. 596–604, 1984.

- Hayashi, T.; Read, S.M., Bussell, J., Thelen M.T.; Lin F.C.; Brown Jr, R.M., Delmer, D.P. UDP-glucose: (1-3)-P-glucan synthases from mung bean and cotton. Differential effects of CaZ+ and Mg'+ on enzyme properties and on macromolecular structure of the glucan product. **Plant Physiol**. v. 83, p. 1054-1062, 1987.

- Hayashida, S.; Ohta, K. Mo, K. Cellulases from *Humicola insolens* and Humicola grisea. **Methods in Enzymology**. v. 10, p. 323-332, 1988.

- Hayashida, S.; Yoshioka, H. The role of carbohydrate moity on thermostability of cellulases from *Humicola insolens* YH-8. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 44, p. 481-487. 1980a.

- Hayashida, S.; Yoshioka, H. Production and purification of thermostable cellulases from *Humicola insolens* YH-8. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 44, p. 1721-1728. 1980b.

- Hayward, T.K.; Hamilton, J.; Tholudur, A.; Mc Millan, J.D. Improvements in titre, productivity, and yield using solka-floc for cellulase production. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 84-86, n. 1-9, p. 859-874, 2000.

- Henrissat B, Driguez H, Viet C, Shulein M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. **BioTechnology**. v. 3, p.722–726, 1985.

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

- Henrissat B. Cellulases and their interaction with cellulose. **Cellulose.** v. 1, p.169–196; 1994.

- Henrissat, B.; Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino- acid sequence similarities. **Biochem. J**. v. 293, p. 781-788. 1993.

- Henrissat, B.; Bairoch, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J**. v. 316, p. 695-696. 1996.

- Himmel, M. **Cellulase Animation**. National Renewable Energy Laboratory, 2000.

- Holtzapple, M.T. Lignin. In: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. (Eds.), **Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition**. Academic Press, London, UK. v. 4 p. 758–767 1993.

- Hoshino, E.; Shiroishi, M. Amano, Y.; Nomura, M.; Kanda, T. Synergistic action of exo-type cellulases in the hydrolisis of cellulose with differente cristallineties. **Journal of fermentation and Bioengineering**. v. 84, n. 4, p. 300-306, 1997.

- Jacobsen, S.E., Wyman, C.E. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 8, p. 1-96, 2000.

- Jarvis, M. Cellulose stacks up. **Science**. v. 426, p. 611–612. 2003.

- Jeihanipour, A.; Taherzadeh, M.J. Ethanol production from cotton-based waste textiles. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 1007–1010, 2009.

- Jorgensen, H. A.; Morkeberg, A. Krogh, K.B.R.; Olsson, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microb. Technol**. v. 36, p. 42–48, 2005.

- Jorgensen, H.; Morkeberg, A.; Krogh, K.B.R.; Olsson, L. Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. **Journal Biotechnology**. v. 109, p. 295-299, 2004.

- Jorgensen, H; Sanadi, A.R.; Felby, C.; Lange, N.E.K; Fischer, M.; ERNST, S.. Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 161, p. 318-332, 2010.

- Jorgesen, H.; Olsson, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT20888-Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 381-390, 2006.

- Juhász, T. Szengyel, Z.; Réczey, K.; Siika-Aho, M.; Viikari, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3519-3525, 2005a.

- Juhász, T.; Szengyel, Z.; Szijártó, N.; Réczey, K. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 113/116, p.201-211, 2005b.

- Kaar, W.E.; Cool, L.G.; Merriman, M.M.; Brink, D.L. The Complete Analysis of Wood Polysaccharides Using HPLC. **Journal of Wood Chemistry Technology**. v. 11, p. 447, 1991.

- Kádár, Z., Szengyel, Z., Ráczey, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Ind Crop Prod**. v. 20, n.1, p. 103-111, 2004.

- Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Christakopoulos, P.; Kekos D.; Macris, B.J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**. v. 86, p. 207-213. 2003.

- Kantham, L.; Vartak, H. G.; Jagannathan, V. β-Glucosidase of *Penicillium funiculosum*. I. Purification. **J Biol Chem**. v.179, n. 2, p.569-75, 1985.

- Karlsson J, Momcilovic D, Wittgren B, Schulein M, Tjerneld F, Brinkmalm G. Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from Humicola insolens and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. **Biopolymers**. v. 63, p. 32–40, 2001.

- Kim, S.W.; Kang, S.W.; Lee, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 63-67, 1997.

- Kirihata, J. **Novozymes prepara nova fábrica no Br**asil. Disponível em: <http://economia.ig.com.br/empresas/agronegocio/novozymes+prepara+nova+fabrica+no+brasil/n1237718319958.html> acesso em: 21/07/2010. 2010.

- Klein GL, Snodgrass WR. Cellulose. **In**: Macrae R, Robinson RK, Saddler MJ, editors. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. London: Academic Press. 758–767 p. 1993.

- Klemm D, Philipp B, Heinze T, Heinze U, Wagenknecht W. Comprehensive cellulose chemistry: **I. Fundementals and analytical methods**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 1998.

- Klyosov, A. A.; Mitkevich, O. V.; Sinitsyn, A. P. Role of the activity and adsorption of cellulases in the efficiency of the enzymatic hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose. **Biochemistry**. v. 25, p. 540-542, 1986a.

- Klyosov, A.A. Principles of the Enzymatic Degradation of Cellulose. **In**: Industrial enzyme engineering. Disponível em: http://aklyosov.home.comcast.net/~aklyosov/. Acessado em: 20 jun 2010. 2010.

- Klyosov, A.A.; Chernoglazov, V.M.; Rabinovich, M.L.; Sinitsyn, A. P.. The role of endoglucanase adsorptivity in degradation of crystalline or amorphous cellulose. **Bioorgan. Khimiya**. v. 8, 643-651, 1982a.

- Klyosov, A.A.; Rabinovich, M.L.; Nuzubidze, N.N.; Todorov, P. T.; Ermolova, O.V.; Chernoglazov, V.M.; Melnick, M.S.; Kude, E.; Dzhafarova, A.N.; Kornilova, I.G.; Kvesitadze, E.G. Molecular screening of cellulases: catalytic activity, thermostability, product inhibition, and adsorption capacity. **Biotechnologia**. v. 3, p. 152-168, 1987.

- Knowles, J.; Lehtovaara, P.; Teeri. T. Cellulase families and their genes. **Trends Biotechnol**. v. 5, p. 255–261, 1987.

- Kotchoni, O.S.; Shonukan, O.O.; Gachomo, W.E. Bacillus pumilus BpPRI 6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. **African Journal of Biotechnology**. v. 2, n. 6, p. 140-146, 2003.

- Krassig H.A. Cellulose: structure, accessibility, and reactivity. Yverdon, Switzerland: Gordon and Breach Sci. Publishers; 1993.

- Krstić, D.M.; Antov, M.G.; Peričin, D.M. Höflinger, WTekić, M.N. The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. **Biochemical Engineering Journal**. V. 33, n. 1, p. 10-15, 2007.

- Kruszewska, J.; Butterweck, A.H.; Kurzatkowski, W.; Migdalski,A.; Kubicek, C.P.; Palamarczyk, G. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* mannosyl-phosphodolichol synthase encoding gene in *Trichoderma reesei* results in the increased protein secretion and abnormal cell ultrastructure. **Appl. Env. Microbiol**. v. 65, p. 2382–2387, 1999.

- Kuhicek, C. P.: Involvement of a conidial endoglucanase and a plasma-membrane-bound β-glucosidase in the induction of endoglucanase synthesis by cellulose in *Trichoderma reesei.* **J. Gen. Microbial**., v. 133, p. 1481-1487, 1987.

- Lamed, R.L. ; Bayer, E.A. The cellulosome concept: exocellular/ extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis. **In**: Aubert, J.P. Béguin, P.; Millet, J. (Ed), Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, Academic Press, London, FEMS Symposium. n. 43, p. 101–116. 1988.

- Levy, S.; Maclachlan, G.; Staehelin, L.A. Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during *in vitro* binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. **Plant J**. v. 11, p. 373–386, 1997.

- Li, Z.; Wirote Youravong, W.;H-Kittikun, A. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. **Bioresource Technology**. V. 97, n. 18, p. 2364-2370, 2006.

- Li, X.L.; Ljungdahl, L.G.; Ximenes, E.A.; Chen, H.; Felix, C.R.; Cotta, M.A.; Dien, B.S. Properties a recombinat ß-glucosidase from polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and its application for cellulose hydrolysis. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 113-116, p. 233-250, 2005.

- Lima, D.U. **Interação molecular entre celulose e hemiceluloses e suas implicações biológicas e tecnológicas**. 2002, 101 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2002.

- Liming, X.; Xueliang, S. High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 corn cob residue. **Bioresource Technology**. v. 91, p. 259-262, 2004.

- Linde, M., Galbe, M., Zacchi, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme Microb Technol**. v. 40, n. 5, p. 1100-1107, 2007.

- Ljungdahl, L.G.; Erikson, K.E. Ecology of microbial cellulose degradation. **Adv. Microb. Ecology**. v. 8, p. 237-299, 1985.

- Lucarini, A.C.; Kilikian, B.V.; Pessoa Jr. A. Precipitação. **In**: Pessoa Jr., A.; Kilikian, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri,SP. Manole. 2005. 444p.

- Lynd, L.R.; Wemer, P.J.; Zyl, W.H.V.; Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p.506-577, 2002.

- MacGregor, E.A. An overview of clan GH-H and distantly-related families. **Biologia**. 60/Suppl. v.16, p. 5-12, 2005.

- Mandels, M. Aplications of cellulases. **Biochem. Soc. Trans**., v. 13, p. 414-415, 1985.

- Mandels, M. Weber, J. The production of cellulases. **Adv Chem *Ser.*** v. 95, p. 391–414, 1969.

- Mandels, M.; Reese, E. T. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fibers. **Dev. Indust. Microbiol**. v. 5, p. 5-12, 1964.

- Mandels, M.; Sternberg, D. Recent advances in cellulase technology. **J. Ferment. Technol***.* v. 54, p. 267–286, 1976.

- MAPA - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** – Secretaria de Produção e Comercialização (SPC). Disponível em: http://www.agricultura.gov.br. acessado em 20 julho. 2010.

- Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. Comparition of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity agaist various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 1417-1424, 2008.

- Martins, R.E. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana. Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 97 p. 2007.

- Marzluf, G. Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the Fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 61, n. 1, p. 17–32, 1997.

- Massadeh, M.I.; Yusoff, W.M.W.; Omar, O.; Kader, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1771-1774, 2001.

- McCann, M.C.; Roberts, K. Architecture of the primary cell wall. **In**: Lloyd, C.W., (ed.). The Cytoskeleta/ Basis of Plant Growth and Form London: Academic Press. 109-129 p. 1991.

- McCarter, J.D.; Withers, S.G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Curr. Opin. Struct. Biol**. v. 4, p. 885-892, 1994.

- McMillan, J., Newman, M., Templeton, D., Mohagheghi A: Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*. **Appl Biochem Biotechnol**. v.79, n. 1, p. 649-665, 1999.

- MDIC - **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/> acessado em: 20/07/2010.

- Menezes, T.J.B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

- Merino, S.T., Cherry, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol**. v. 108, p. 95–120, 2007.

- Messner, R.; Kubicek-Pranz, E.M.; Gsur, A.; Kubicek, C. P. Cellobiohydrolase II is the main conidialbound cellulase in *Trichoderma reesei* and other *Trichoderma* strains. **Arch. Microbial**., v. 155, p. 601-606, 1991.

- Miettinen-Oinonen, A. ***Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry**. Department of Biological and Environmental Science. Division of Genetics. University of Helsink. 153 p. 2004.

- Miller GL. Cellodextrins. **Methods Carbohydr Chem**. v. 3, p. 134–139, 1963.
- Miller GL. Micro column chromatographic method for analysis of oligosaccharides. **Anal Biochem**. v. 2, p. 133–140, 1960.
- Miller, G.L. use of dinitrosalicilic acid reagente for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959.
- Miyamoto, K. Cellulase production. **Renewable biological systems for alternative sustainable energy production**. FAO, Agricultural Services Bulletin,1997, 128 f. Osaka University, Osaka, Japan, 1997.
- Mo, H.; Zhang, X.; Li, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1293-1297, 2004.
- Moloney, A.P.; McCrae, S.I.; Wood, T.M.; Coughlan, M.P. Isolation and characterization of 1,4-β-glucan glucanohydrolase of Talaromyces emersonii. **Biochemical Journal**. V. 225, n. 2, p. 365-374, 1985.
- Montgomery, D.C. **Design and analysis of experiments**. Jhon Wiley & Sons, INC. 5th edtion. 684 p. 2001.
- Morikawa, Y.; Ohashi, T.; Mantani, O.; Okada, H. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 44, p. 106-111, 1995.
- Mosier N.; Wyman C.E.; Dale B.E.; Elander R.T.; Lee Y.Y.; Holtzapple M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour Technol**. v. 96, p. 673–686, 2005.
- NC-IUBMB - **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. Disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Aecesso 20/10/2008. 2008.

- NREL - NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. **What Is a Biorefinery?** Disponível em: http://www.nrel.gov/biomass/ biorefinery.html. Acesso em: 05 de ago. de 2005.

- Nevalainen, H. Strain improvement in filamentous fungi – an overview. **In**: Kchachatourians, G.; Arora, D. (ed) Applied mycology and biotechnology, Agriculture and food production. Elsevier, Amsterdam, v. 1, p. 289-304, 2001.

- Nevalainen, H. Suominen, P.; Taimisto, K. On the safety of Trichoderma reesei. **J. Biotechnol**. v. 37, p. 193-200, 1994.

- Nevalainen, H.; Neethling, D. The safety os Trichoderma and Gliocadium. **In**: Kubcek, C.; Harman, G. (ed) *Trichoderma* & *Gliocadium*, Basic biology, taxonomi and genetics. v. 1, p. 193-205, 1998.

- Niranjane, A.P.; Madhou, P.; Stevenson, T.W. The effect of carbohydrate sources on the production of cellulase by Phlebea gigantea. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1464-1468, 2007.

- NORDISK S/A. **Biotimes**. [S.l.], 1996.

- Ohgren K, Galbe M, Zacchi G. Optimization of steam pretreatment of SO2-impregnated corn stover for fuel ethanol production. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 121/124, p. 1055–67, 2005.

- Öhgren, K.; Bengtsson, O.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Galbe, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Zacchi, G. (2006). Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae TMB3400.* **Journal of Biotechnology**. v. 126, n. 4, p. 488-498.

- Olofsson, K, Bertilsson, M, Lidén. G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol Biofuels**. v. n. 1, p. 1-14. 2008.

- Olsson, L.; Christensen, T.M.I.E.; Hansen, K.P.; Palmqvist, E.A. Influence of the carbon source on production of celullases, hemicellulases and pectinases by

Trichoderma reesei RUT C-30. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33, p. 612-619, 2003.

- Onsori, H.; Zamani, M.R.; Motallebi, M.; Zarghami, N. Identification of over producer strain of endo-β-1,4-glucanase in *Aspergillus Species*: Characterization of crude carboxymethyl cellulase. **African Journal of Biotechnology**. v. 4, n. 1, p. 26-30, 2005.

- O'Sullivan AC. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**. v. 4, p. 173–207, 1997.

- Pan, X.; Arato, C.; Gilkes, N.R.; Gregg, D.; Mabee, W.; Pye, K. Biorefining of softwood using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnol Bioeng**. v 90, p. 473–81. 2005a

- Pan, X.; Xie, D.; Gilkes, N.; Gregg, D.J.; Saddler, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 124, p. 1069–1080, 2005b.

- Pandey, A.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Soccol, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 69-80, 2000.

- Penttilä, M. Heterologous protein production in *Trichoderma*. **In**: Harman, G.; Kubicek, C. (ed) *Trichoderma* and *Gliocardium*, Enzimes, biological control and commercial applications. v. 2, p. 365-381. 1998.

- Pereira A.N.; Mobedshahi, M.; Ladisch M.R. Preparation of cellodextrins. **Methods Enzymol**. v. 160, v. 26–43, 1988.

- Pereira Jr, N.; Couto, M.A.P.G.; Anna, L.M.M.S.B. **Biomass of lignocellulosic compostion for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Series on Biotechnology. Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.

- Pereira Jr., N.. **Investigation of D-xylose fermenting yeast**. Ph.D. Thesis. Deparment of Chemistry. The University of Manchester, U.K. 1991.

- Pereira, R. E. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para produção de etanol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

- Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hagerdahl, B. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. **Process Biochem**. v. 26, p. 65–74, 1991.

- Prasertsan, P.; Kittikul, A.H.; Kunghae, A.; Maneesri, J.; Oi, S. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 13, n. 5, p. 555-559, 1997.

- Pye EK, Lora JH. The Alcell process: a proven alternative to kraft pulping. **Tappi J**. v. 74, n. 3, p. 113–118. 1991.

- Rabinovich, M.L.; Nguen V.V.; Klyosov, A.A. Synergism under concerted action of endoglucanases with low and high affinity for cellulose. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol**. v. 22, p. 70-79. 1986.

- Radzio, R.; Küch, U. Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi. **Process Biochemistry**. v. 32, p. 529-539, 1997.

- Rajarathnam, S.; Shashireka, M.N.; Bano, Z. Biopotentialites of the basidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**. v.37, p. 223-361, 1992.

- Rao, M.; Gaikwad, S.; Mishra, C.; Deshpande, V. Induction and catabolite repression of cellulase in *Penicillium funiculosum*. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 19, n. 2, p. 129-137, 1988.

- Reczey, K.; Szengyel, Z.; Eklund, R.; Zacchi, G. Cellulase production by *T. reesei.* **Bioresource Technology**. v. 57, p. 25-30, 1996.

- Reis, D; Vian, B; Roland, JC. Cellulose-glucuronoxylans and plant cell wall structure. **Micron**. v. 25, p. 171–187, 1994.

- Riou, C., Salmon, J., Valier, M., Günata, Z.; Barre, P. Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β-glucosidase from *Aspergillus oryza* . **Appl. Environ. Microbiol**. v.64, p. 3607-3614. 1998.

- Rosgaard, L.; Pedersen, S.; Cherry, J. R.; Harris, P. ; Anne S. Meyer, A.S. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. **Biotechnol**. Prog. v. 22, p. 493-498, 2006.

- Rudolf, A., Alkasrawi, M., Zacchi, G., Lidén, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme Microb Technol**. v. 37, n. 2, p. 195-205, 2005.

- Ruiz, E.; Cara, C.; Ballesteros, M.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; CASTRO, E. (2006). Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 631-643.

- Ryu, D. Mandels, M. Cellulases: biosysnthesis and applications. **Enzyme Microbial Technol**. v. 2, p. 91-102, 1980.

- Said, S., Pietro, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. **Ed. Eventos**. 121 p. 2002.

- Saloheino, M.; Lund, M.; Penttilä, M. The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. **Mol Gen. Genet**. v. 262, p. 35-45, 1999.

- Saloheino, M.; Pakula, T.; Arvas, M.; Valkonen, M.; Penttilä, M. Cellular responses to secretion stress in *Trichoderma reesei*. **XXII Fungal Genetics Conference, Abstract**. v. 422, p.18-23, 2003.

- Saloheino, M.; Wang, H.; Valkonen, M.; Vasara, T.; Huuskonen, A.; Riikonen, M.; Pakula, T.; Ward, M.; Penttilä, M. Characterization of secretory genes ypt1/yptA and nsf1/nsfA from two filamentous fungi: induction of secretory pathway genes of *Trichoderma reesei* under secretion stress conditions. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 70, p. 459-467, 2004.

- Santos, D.S.; Camelo, A.C.; Rodrigues, K.C.; Carlos, L.C.; Pereira Jr., N. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 161, p. 93-105.

- Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Steam pretreatment of Salix with and without SO2 impregnation for production of bioethanol. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 121/124, p.1101–1117, 2005.

- Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated Salix at high dry-matter content. **Enzyme Microb Technol**. v. 39, n. 4, p. 756-762, 2006.

- Sastry, M. Entrapment of proteins and DNA in thermally evaporated lipid films. **Trends in Biotechnology**. v. 20, n. 5, p. 185-188, 2002.

- Schell, D., C. Riley, P. Bergeron, and P. Walter, **"Technical and economic analysis of an enzymatic hydrolysis based ethanol plant – draft"**, Solar Energy Research Institute, Golden, CO, SERI Report. TP-232-4295, 1991.

- Schlitter, L.A.F. **Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de bagaço de cana-de-açúcar**, 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

- Schülein, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**: **Protein Structure and Molecular Enzymology**. V. 1543, n. 2, p. 239-252, 2000.

- Shutte, H.; Kula, M.R. Cell disruption and isolation of non-secreted products. In: Rhem, J.J.; Reed, G. **Biotecnology**. v. 3, 2ª ed., Verlag Chemie. 1993.

- Scopes, R.K. Protein purification. Principles and pratice. **Second edition**. p 302-303. 1993

- Segel, I.H. **Bioquímica: teoria e problemas**. Livros Técnicos e Científicos, 1ª ed, 1979.

- Seibotb, B., Hakola, S., Mach, R. L., Suominen, P. L., and Kubicek, C. P. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei.* **J. Bacterial**. v. 179, p. 5318 5320, 1997.

- Sestak, S.; Farkas, V. Metabolic regulation of endoglucanase synthesis in *Trichoderma reesei*: participation of cyclic AMP and glucose-6-fosfato. **Canadian Journal Microbiology**. v. 33, p. 342-347, 1993.

- Shin, C.S.; Lee, J.P.; Lee, J. S.; Park, S.C. Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 84-86, p. 237-245, 2000.

- Silva, N.L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010, 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

- Simpson, A.J.G.; Reinach, F.C.; Arruda, P.; Abreu, F.A.; et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-157, 2000.

- Sinnott, M.L. Catalytic mechanisms of enzymic glycoside transfer. **Chem. Rev**. v. 90, p.1170-1202, 1990.

- Sjöström, E. **Wood chemistry**. Nova York: Academic Press. 223 p. 1981.

- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. NREL, 14 p. 2005.

- Soderstrom, J.; Pilcher, L.; Galbe, M.; Zacchi, G. Combined use of H2SO4 and SO2 impregnation for steam pretreatment of spruce in ethanol production. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 105/108, p.127–40, 2003.

- Spindler, D.D., Wyman, C.E., Grohmann, K. The simultaneous saccharification and fermentation of pretreated woody crops to ethanol. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 28-29, p. 773-786, 1991.

- Sternberg, D.; Mandels, G.R. Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: induction of cellulase and repression of b-glucosidase. **J. Bacteriol**. v. 144, p. 1197–1199, 1980.

- Sukumaran, R.K.; Singhania, R.R.; Mathew, G.M.; Pandey, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**. v. 34, p. 421–424, 2009.

- Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Tecnology**. v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

- Suominen, P.; Mäntylä, A.; Karhunen, T.; Hakola, S.; Nevalainen, H. High frequency one-step gene replacement in Trichoderma reesei. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. **Mol. Gen. Genet**. v. 241, p. 523-30, 1993.

- Sutcliffe, R.; Saddler, J.N. The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic material. **Biotechnol Bioeng**. v. 17, p. 749–62, 1986.

- Suto, M.; Tomita, F. Induction and catabolic repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 92, n. 4, p. 305-311, 2001.

- Svergun, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**. v.76, n.6, p.2879-2866, 1999.

- Swings, J.; De Ley, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriol Rev**. v. 41, n. 1, p.1-46, 1977.

- Tatsumoto, K.; Baker, J.O.; Tucker, M.P.; Oh, K.K. Mohagheghi, A.; Grohmann, K.; Himmel, M.E. Digestion of pretreated aspen substrates. Hydrolysis rates and adsorptive loss of cellulase enzymes. **Appl Biochem Biotechnol**. v 18, p. 159–74, 1988.

- Teeri, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends Biotechnol**. v. 15, p. 160–167, 1997.

- Teter, S.; Cherry, J.; Ward, C.; Jones, A.; Harris, P.; YI, J. Variants of cellobiohidrolase I from *Trichoderma reesei* with improved properties. Novozyme Biotecnology IU, EU patent n° 2005048619, 2004.

- Thom, C. **Cultural studies of species of penicillium**. Washington, 120 p., 1910.

- Tomme, P.; Kwan, E.; Gilkes, N.R.; Kilburn, D.G.; Warren, R.A. Characterization of CenC, an enzyme from Cellulomonas fimi with both endo-and exoglucanase activities. **J. Bacteriol**. v. 178, p. 4216–4223. 1996.

- Tuohy, M.G.; Walsh, D.J.; Murray, P.G.; Claeyssens, M.; Cuffe, M.M.; Savage, A.V.; Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1596, p. 366–380, 2002.

- Umikalsom, M.S.; Ariff, A.B.; Hassan, M.A.; Karim, M.I.A. Kinetics of cellulase production by Chaetomium globosum at different levels of dissolved oxygen tension using oil palm empty fruit bunch fibre as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 14, p. 491-498, 1998.

- Urbánszki, K.; Szakács, G.; Tengerdy, R.P. Standartization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 22, p. 65-69, 2000.

- Van Tilbeurgh H, Claeyssens M, de Bruyne CK. The use of 4-methylumbelliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulolytic enzymes. **FEBS Lett**. v. 149, p. 152–16, 1982.

- Van Tilbeurgh H, Claeyssens M. Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. **FEBS Lett**. v. 187, p. 283–288, 1985.

- Van Tilbeurgh, H.; Pettersson, G.; Bhikabhai, R.; De Boeck, H.; Claeyssens, M. Studies of the cellulolytic system of Trichoderma reesei QM 9414. Reaction specificity and thermodynamics of interactions of small substrates and ligands

with the 1,4-beta-glucan cellobiohydrolase II. **Eur J Biochem**. v. 148, p.329–334, 1985.

- Vasquez, M. P.; Silva, J. N. C.; Souza Jr, M. B.; Pereira Jr, N. Estudos prévios sobre a hidrólise enzimática da *celulignina* ao serem empregados diferentes métodos de deslignificação. **In**: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, CD-ROM, 2006.

- Vasquez, M. P.; Silva, J. N. C.; Souza Jr, M. B.; Pereira Jr, N. Enzimatic hidrolisi optimization to ethanol production by Simultaneous saccharification and fermentation. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 137/140, n. 12, p. 141-154, 2007.

- Vasquez, M.P. **Desenvolvimento de bioprocesso de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007, 190 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

- Vautard-Mey, G.; Fèvre, M. Mutation of a putative AMPK phosphorylation site abolishes the repressor activity but not the nuclear targeting og the fungal glucose regulator CRE1. **Curr. Gent**. v. 37, p. 328-332, 2000.

- Veldhuisen, G.; Saloheimo, M. Fiers, M.; Punt, P.; Contreras, R.; Penttilä, M.; van den Hondel, C. Isolation and analysis of functional homologues of the secretion-related SARI gene of Saccharomyces cerevisiae from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **Mol. Gen. Genet**. v. 256, p. 446-455, 1997.

- Velkovska, S.; Marten, M.R.; Ollis, D.F. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. **Journal of Biotechnology**. v. 54, p. 83-94. 1997.

- Ververis, C.; Georghiou, K.; Danielidis, D.; Hatzinikolaou, D.G.; Santas, P.; Santas, R.; Corleti, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 296–301, 2007.

- Vincken, J. P.; Keizer, A.; Beldman, C.; Voragen, A.G.J. Fractionation of xyloglucan fragments and their Interaction with cellulose. **Plant Physiol**. v. 108, p. 1579-1585, 1995.

- Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. Production of cellulase/β-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 121-124, p. 93-104, 2005.

- Whitney, SEC; Brigham, JE; Darke, AH; Reid, JSG; Gidley, MJ. *In vitro* assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. **Plant J**. v. 8, p.491–504, 1995.

- Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol Prog**. v.19, p. 1109–1117, 2003.

- Wolfgang, D.E., Wilson, D.B. Mechanistic studies of active site mutants of Thermomonospora fusca endocellulase E2. **Biochemistry**. v. 38, p. 9746–9751, 1999.

- Wood, T.M.; Bhat, K.M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods Enzymol**. v. 160, p. 87–117. 1988.

- Wood, T.M.; Garica-Campayo, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**. v. 1, p. 147–161. 1990.

- Wood, T.M.; McCrae, S.I. The cellulase of *Penicillium pinophilum*. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases**. Biochem. J**. v. 234, p. 93-99. 1986.

- Wooley, R.; Ruth, M. ; Sheehan, J.; Ibsen, K.; Majdeski, H.; Galvez, A. **Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis current and futuristic scenarios**. National Renewable Energy Lab Golden Co. Technical rept. 23-31 p. 1999.

- Wyman, C.E., Spindler, D.D., Grohmann, K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. **Biomass Bioenergy**. v. 3, n. 5, p. 301-307, 1992.

- Wyman, C.E.; Dale, B.E.; Elander, R.T.; Holtzapple, M.; Ladisch, M.R.; Lee, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresour Technol**. v. 96, p.1959–1966, 2005a.

- Wyman, C.E.; Dale, B.E.; Elander, R.T.; Holtzapple, M.; Ladisch, M.R.; Lee, Y.Y. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresour Technol**. v. 96, p. 2026–2032. 2005b.

- Xia, L.; Cen, P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic wast from the xylose industry. **Process Biochemistry**. v. 34, p. 909-912, 1999.

- Xu, J.; Thomsen, M.H.; Thomsen, A.B. Feasibility of hydrothermal pretreatment on maize silage for bioethanol production. **Appl Biochem Biotechnol**. *in press*. 2009.

- Yang B, Wyman CE. BSA Treatment to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignin Containing Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 94, n. 4, p. 611-17, 2006.

- Yun, S.I.; Jeong, C.S.; Chung, D.K.; Choi, H.S. Purification and some properties of a β-glucosidase from T. harzianum type C-4. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.

- Zhang, M.; Shukla, P.; Ayyachamy, M; Permaul, K; Singh, S. Improved bioethanol production through Simultaneous Saccharification and Fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by *Kluyveromyces marxianus* 6556. **Applied Microbiology and Biotechnology**. *in press*, 2009.

- Zhang, Y.H.P., Lynd L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol Bioeng**. v. 88, p. 797–824, 2004.

- Zhang, C.; XING, X.H.; LIU, M.S. Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. **Biochemical Engineering Journal**. v. 19, p. 181-187, 2004.

- Zhang, Y.H.P.; Cui, J.B., Lynd, L.R.; Kuang, L.R. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidences from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. **Biomacromolecules**. v.7, n. 2, p. 644–648, 2006.

- Zhang, Y.H.P.; Lynd, L.R. Cellodextrin preparation by mixed-acid hydrolysis and chromatographic separation. **Anal Biochem**. v. 322, p. 225–232, 2003.

- Zhang, Y.H.P.; Lynd, L.R. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with appliation to enzymatic hydrolysis. **Biomacromolecules**. v. 6, p. 1510–1505, 2005.

- Zhu, J.Y; Zhu, W.; Bryan, O.P.; Dien, B.S; Tian, S.; Gleisner, R.; Pan, X.J. Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, *in press*, 2010.

- Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A.; Schwarz, W.H. A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose. **Microbiology**. v. 148, p. 247–255, 2002.

ANEXOS

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0805560-2 A2**

(22) Data de Depósito: 29/12/2008
(43) Data da Publicação: 08/09/2010
(RPI 2070)

(51) Int.Cl.:
C12N 9/42
C12R 1/80
C13K 1/02

(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM PREPARADO ENZIMÁTICO PARA HIDRÓLISE DE CELULOSE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL**

(73) Titular(es): Petroleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

(72) Inventor(es): Absai da Conceição Gomes, Aline Machado de Castro, Claudia Julia Groposo Silveira, Danuza Nogueira Moyses, Emerson Pires Menezes, Luiz Fernando Martins Bandeira, Lídia Maria Melo Santa Anna, Nei Pereira Junior, Roberto Nobuyuki Maeda

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM PREPARADO ENZIMÁTICO PARA HIDRÓLISE DE CELULOSE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL O processo da presente invenção baseia-se na produção microbiana de enzimas realizada a partir do crescimento do fungo Penicilllum funiculosum em meio de cultivo adaptado com substrato celulósico. O processo da invenção compreende especialmente o tratamento fermentativo de um substrato lignocelulósico por meio de um fungo especialmente adaptado, visando à obtenção de um preparado enzimático capaz de hidrolisar a celulose e a hemicelulose para a produção de etanol.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 July 2010 (08.07.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/076552 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 9/24 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01) *C12P 7/10* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2009/002929

(22) International Filing Date:
22 December 2009 (22.12.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PI0805560-2 29 December 2008 (29.12.2008) BR

(71) Applicant *(for all designated States except MW, US)*: **PETRÓLEO BRASILEIRO S A -PETROBRAS** [BR/BR]; Av. República do Chile N° 65, Rio de Janeiro, RJ (BR).

(71) Applicant *(for MW only)*: **BENSON, John Everett** [GB/GB]; 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DE CASTRO, Aline Machado** [BR/BR]; Rua Dias da Cruz N°827, Ap. 404 Méier, CEP-20720-011 Rio de Janeiro, RJ (BR). **SANT'ANNA, Lídia Maria Melo** [BR/BR]; Rua Condominio Vale de Itaipu, Rua 03, Casa 332, Itaipu, CEP-24340-240 Niterói, RJ (BR). **JUNIOR, Nei Pereira** [BR/BR]; Rua Humberto de Campos, N°410, Ap 503, Leblon, CEP-22430-190 Rio de Janeiro, RJ (BR). **GOMES, Absai da Conceição** [BR/BR]; Rua Himalaia N°396, Anchietta, CEP-21655-330 Rio de Janeiro, RJ (BR). **MENEZES, Emerson Pires** [BR/BR]; Rua Juquerí, N°185-F, Irajá, CEP-21371-021 Rio de Janeiro, RJ (BR). **SILVEIRA, Claudia Julia Groposo** [UY/BR]; Rua Nononha Torrezao N°181, Ap. 1307, Bl.03, CEP-24240-185 Santa Rosa Niterói, RJ (BR). **MOYSES, Danuza Nogueira** [BR/BR]; Av. Sete de Setembro N°85, Ap. 1601 Icaraí, CEP-24230-250 Niterói, RJ (BR). **BANDEIRA, Luiz Fernando Martins** [BR/BR]; Rua Afonso Pena N°132, Ap. 401 Tijuca, CEP-20270 245 Rio de Janeiro, RJ (BR). **MAEDA, Roberto Nobuyuki** [BR/BR]; Av. Nossa Senhora de Copacabana N° 245, Ap. 1008 Copacabana, CEP-20270 245 Rio de Janeiro, RJ (BR).

(74) Agent: **BENSON, John Everett**; J.A. Kemp & CO., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF AN ENZYMATIC PREPARATION FOR HYDROLYSIS OF CELLULOSE FROM LIGNOCELLULOSIC RESIDUES AND APPLICATION THEREOF IN THE PRODUCTION OF ETHANOL

(57) Abstract: The process of the present invention is based on the microbial production of enzymes from the growth of the fungus *Penicillium funiculosum* in a suitable culture medium with a cellulosic substrate. The process of the invention comprises in particular the fermentative treatment of a lignocellulosic substrate by means of a specially adapted fungus, for obtaining an enzymatic preparation capable of hydrolysing cellulose and hemicellulose for the production of ethanol.

WO 2010/076552 A1

Appl Biochem Biotechnol (2010) 161:411–422
DOI 10.1007/s12010-009-8875-6

Nitrogen Source Optimization for Cellulase Production by *Penicillium funiculosum*, using a Sequential Experimental Design Methodology and the Desirability Function

Roberto Nobuyuki Maeda · Mariana Mello Pereira da Silva · Lídia Maria Melo Santa Anna · Nei Pereira Jr.

Received: 15 May 2009 / Accepted: 25 November 2009 /
Published online: 15 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract The present study aimed at maximizing cellulase production by *Penicillium funiculosum* using sequential experimental design methodology for optimizing the concentrations of nitrogen sources. Three sequential experimental designs were performed. The first and the second series of experiments consisted of a 2^4 and a 2^3 factorial designs, respectively, and in the third one, a central composite rotational design was used for better visualizing the optimum conditions. The following nitrogen sources were evaluated: urea, ammonium sulfate, peptone, and yeast extract. Peptone and ammonium sulfate were removed from the medium optimization since they did not present significant statistical effect on cellulase production. The optimal concentrations of urea and yeast extract predicted by the model were 0.97 and 0.36 g/L, respectively, which were validated experimentally. By the use of the desirability function, it was possible to maximize the three main enzyme activities simultaneously, which resulted in values for FPase of 227 U/L, for CMCase of 6,917 U/L, and for β-glucosidase of 1,375 U/L. These values corresponded to increases of 3.3-, 3.2-, and 6.7-folds, respectively, when compared to those obtained in the first experimental design. The results showed that the use of sequential experimental designs associated to the use of the desirability function can be used satisfactorily to maximize cellulase production by *P. funiculosum*.

Keywords Cellulase · Sugar cane bagasse · *Penicillium funiculosum* · Response surface methodology · Nitrogen sources

Introduction

Studies indicate that the projected demand for ethanol by the year 2013 in Brazil will be 32 billion liters [1], which correspond to an additional production of 33% than the current

R. N. Maeda · M. M. P. da Silva · L. M. M. Santa Anna · N. Pereira Jr. (✉)
Center of Technology, School of Chemistry, Laboratories of Bioprocess Development,
Federal University of Rio de Janeiro, 21949-900 Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: nei@eq.ufrj.br

production level. Several factors contribute to this, including the increase of bifuelled car selling (flex fuel); worldwide ethanol demand and, consequently, of the Brazilian exports; as well as the increasing gasoline demand, which in Brazil is mixed with 20–25% of anhydrous ethanol. However, it is forecasted that the harvested sugar cane in the same period will not be sufficient to supply such a demand, ratifying the need of producing ethanol based on other feedstocks. In this context, research and development have been intensified targeting the utilization of renewable feedstocks other than the traditional crops in substitution of fossil sources. Emphasis has been placed on the utilization of abundant agricultural and agro-industrial residues, both of lignocellulosic composition [2].

For the production of ethanol, using lignocellulosic biomass (second-generation ethanol), the *simultaneous saccharification and fermentation* process has been an interesting option since the enzyme inhibition of the cellulolytic complex can be circumvented by associating enzyme hydrolysis with ethanol fermentation [3]. However, the economical feasibility of this process is primarily dependent on the costs of the enzymes, which is considered one of the bottlenecks for the industrial implementation of this technology [4].

The biorefinery context can be incorporated by in-plant production of cellulases, which will avoid expenditures with their imports. The main challenge, however, is the development of sustainable technologies for the production of these enzymes with low cost in Brazil. For this reason, significant amount of research has been focused on the production of cellulases. For the production of theses enzymes, part of the sugarcane bagasse can be used as feedstock; nonetheless, sugarcane bagasse is a poor source in terms of nitrogen, whose main function is the synthesis of plastic and catalytic proteins, affecting significantly microbial physiology [5]. It is known that several nitrogen sources are available in different forms, i.e., ammonium, amines, amides, and nitrates [6, 7]. They can cause many effects to the microorganisms, when presented in repressive or inductive concentrations. Therefore, this work aimed at optimizing the nitrogen source concentration for the production of cellulases by a strain of *Penicillium funiculosum* using sequential experimental design methodology.

Materials and Methods

Microorganism

P. funiculosum ATCC 11797 was maintained on potato dextrose agar (PDA), and its conidia were stored in glycerol 20% at 4 °C in microtubes. This condition allows the preservation of the conidia for more than 1 year. In each experiment, the stored conidia were activated in PDA solid medium to obtain a homogeneous inoculum for the production of cellulases.

Bagasse Pretreatment

To enhance the microorganism accessibility to the substrate, a pretreatment was carried out with diluted sulfuric acid (1% *v*/*v*) with a solid:liquid ratio of 1:2 at 121 °C for 45 min, as reported by Betancur [8]. After acid pretreatment, two fractions were obtained: a hemicellulose hydrolysate liquid phase and a solid fraction, composed mainly by cellulose and lignin, which was named as cellulignin. These two fractions were separated by pressing filtration, and the cellulignin was even washed repeatedly with water until pH 5. The cellulignin was subjected to an alkaline pretreatment with sodium hydroxide (4% *w*/*v*) with a solid:liquid ratio of 1:20 at 121 °C for 30 min as established by Vasquez et al. [3]. The resulting solid material was called *cellulignin partially delignified*. For the bagasse and

cellulignin partially delignified composition determination, a chemical hydrolysis was carried out with H_2SO_4 in two steps, according to National Renewable Energy Laboratory, NREL [9] and Ververis et al. [10].

Enzyme Production

The enzyme production medium was composed of varying concentrations of urea, ammonium sulfate, peptone, and yeast extract as nitrogen sources. *Cellulignin partially delignified* was used as carbon source and inducer in a concentration of 15 g/L. The experiments were performed in 500 mL conical flasks containing 200 mL of the production medium which was inoculated with a suspension of spores (10^6 conidia/mL). The flasks were stirred in a rotary shaker (200 rpm) at a temperature of 30 °C. After 72 h of fermentation, the medium was centrifuged at 2,500×g for 10 min, and the crude enzymatic extract was used for quantifying cellulase activities (FPase, CMCase, and β-glucosidase).

Cellulase Assays

FPase, CMCase, and β-glucosidase activities were measured using filter paper, carboxymethylcellulose, and cellobiose as substrates, respectively [11]. Test tubes containing substrate and crude extract were incubated at 50 °C for 1 h for filter paper activity and 15 min for CMCase and β-glucosidase activities. The reaction systems were shaken throughout the assays. Cellulase activity was expressed in international unit (U) in which an activity unit is the amount of crude enzymatic extract that releases 1 μmol of sugars (glucose equivalent) per minute.

Optimization of Nitrogen Sources for Cellulase Production

For the optimization of the nitrogen sources, the strategy of sequential experimental design was adopted. In the first experimental design, a complete 2^4 factorial experiment was performed with four nitrogen sources (urea, ammonium sulfate, peptone, and yeast extract) in two levels, minimum and maximum, coded as "−1" and "+1", respectively, and three replicates of the center point, coded as "0" (Table 1). The center points for each nitrogen source were the same used by Mandels and Weber [12]. A second experimental 2^3 factorial design with two levels and three replicates of the center point (Table 2) was performed, eliminating peptone, since it did not present a significative effect as it is going to be shown further on. Finally, a third experimental central composite rotational design (CCRD) was carried out (Table 3). For this sequence, the concentration of ammonium sulfate was kept constant (4 g/L), since it presented significant effect only for CMCase activity, remaining urea, and yeast extract as the only factors to be analyzed. The response variables in all experimental designs were FPase, CMCases, and β-glucosidase activities.

To maximize the three response variables simultaneously, an optimization using the *global desirability function* (D) was performed, which consists in converting each response into a single *desirability function* (d_i), that ranges from 0 to 1 $(0 \leq d_i \leq 1)$ [13]. For a function with three independent variables, the *global desirability function* is expressed as follows:

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_3)^{1/3} \tag{1}$$

The predicted values were validated experimentally in batchwise submerged fermentation (four replicates), carried out in 500 mL conical flasks, containing 200 mL of the

Table 1 Factors and levels used in the experimental 2^4 factorial design for nitrogen source optimization.

Factor	Min −1	CP 0	Max +1
Urea (g/L)	0.15	0.30	0.45
Ammonium sulfate (g/L)	0.70	1.40	2.10
Peptone (g/L)	0.40	0.75	1.10
Yeast extract (g/L)	0.13	0.26	0.38

Min minimum value, *CP* center point, *Max* maximum value.

production medium, at 30 °C and 200 rpm for 72 h. The activity measurements were assayed in triplicates. The statistical treatment of the results was performed by the software STATISTICA version 6.0 (StatSoft, Inc).

Results and Discussion

Sugar Cane Bagasse and Cellulignin Composition

Table 4 shows the composition of sugar cane bagasse and cellulignin partially delignified. Acid and alkaline pretreatments were efficient in reducing both hemicellulose (29.6% to 12.2%) and lignin (19.4% to 9.3%) contents and simultaneously resulted in an increase in cellulose content (34.1% to 68.0%). It is widely known that lignin hinders the direct utilization of lignocellulosic materials. This polyphenolic macromolecule offers a physical barrier for the use of native cellulose [14]. Besides disorganizing the lignocellulosic complex, the aim of the acid and alkaline pretreatments is to remove part of hemicellulose and lignin, reducing the cellulose crystallinity and enhancing the remaining solid fraction porosity [15]. Pretreatments of lignocellulosic materials are essential as for making easier the accessibility to the cellulosic substrate by microorganisms or enzymes. Additionally, if cellulose enzymatic hydrolysis is aimed, lignin can adsorb cellulases, and thus, making them unproductive requiring higher enzyme load when high lignin-containing feedstocks are used [16].

Sequential Experimental Designs

Table 5 shows the results of the 2^4 factorial design. The enzymatic activities ranged from 41 to 170 U/L for FPase, from 1,200 to 2,260 U/L for CMCase, and from 71 to 510 U/L for β-

Table 2 Factors and levels used in the experimental 2^3 factorial design for nitrogen source optimization.

Factor	Min −1	CP 0	Max +1
Urea (g/L)	0.30	0.55	0.80
Ammonium sulfate (g/L)	1.20	2.60	4.00
Yeast extract (g/L)	0.08	0.16	0.25

Min minimum value, *CP* center point, *Max* maximum value.

Table 3 Factors and levels used in the experimental central composite rotational design (CCRD) for nitrogen source optimization.

Factor	Axial −1.41	Min −1	CP 0	Max +1	Axial +1.41
Urea (g/L)	0.07	0.40	1.20	2.00	2.33
Yeast extract (g/L)	0.00	0.09	0.29	0.50	0.59

Min minimum value, *CP* center point, *Max* maximum value.

glucosidase. These results allowed plotting the Pareto chart (Fig. 1), which provided important data about the statistical relevance of the factors as well as of their interactions. From these charts, one can see that urea had significant relevance to express enzymes with FPase and CMCase activities, and a negative effect on β-glucosidase activity. On the contrary, ammonium sulfate presented significant positive effect for β-glucosidase production, yet no significative effect was observed for the other activities. Yeast extract caused a significant effect only on the FPase activity. The correlation coefficient (R^2) showed a good fit to the experimental results with values higher than 83%. Peptone was eliminated from the medium composition since it did not present a significative effect for FPase and CMCase, and a negative effect of low importance for β-glucosidase activity.

According to the results of the second experimental design, an increase in cellulase activities, especially CMCase, was achieved, rising from a maximum of 2,260 (first experimental design) to 5,143 U/L (second experimental design), an increase of above 100%. Concerning FPase activity, the increase corresponded to 46% (172 to 250 U/L) related to the first experimental design (Table 6). Nonetheless, these enzymatic activities can still be enhanced, as the center points are still lower than the factorial points, showing an increasing tendency in the direction of the maximum point.

Based on the effects of parameters using the Pareto chart (Fig. 2), urea appears as the most important nitrogen source for all cellulase activities. Also, this nitrogen source showed a positive effect, indicating that in the next planning, its concentration should still be increased. The yeast extract indicated a significative effect for CMCase and β-glucosidase activities and of low importance for FPase activity. The concentration of this component was maintained for the third experimental design sequence.

The analysis of the Pareto chart also depicted significative curvature for FPase and β-glucosidase activities denoting that there exists a point of maximum activity. Moreover, the values of the center points are close to the maximum obtained in the studied range, indicating the need of adding axial points to the following experiment to optimize the cellulase production, as in the factorial design, only linear models can be evaluated. Thus,

Table 4 Composition of sugar cane bagasse and cellulignin partially delignified.

Components	Sugar cane bagasse (% *w*/*w*)	Cellulignin partially delignified (% *w*/*w*)
Cellulose	34.09±1.20	67.97±1.31
Hemicellulose	29.61±1.44	12.2±0.94
Lignin	19.41±0.44	9.30±0.62
Ash	7.94±1.05	3.50±0.42
Moisture	4.41±0.12	3.98±0.15

Table 5 Matrix of experimental 2^4 factorial design for nitrogen sources optimization and corresponding results of cellulase activities.

Run	Nitrogen sources				Activities (U/L)		
	Urea	Ammonium sulfate	Peptone	Yeast extract	FPase R^2=0.836	CMCase R^2=0.873	β-glucosidase R^2=0.910
1	−1	−1	−1	−1	39	1,328	170
2	+1	−1	−1	−1	87	1,699	122
3	−1	+1	−1	−1	48	1,332	473
4	+1	+1	−1	−1	71	1,979	511
5	−1	−1	+1	−1	43	1,458	156
6	+1	−1	+1	−1	84	2,189	204
7	−1	+1	+1	−1	45	1,343	385
8	+1	+1	+1	−1	112	1,707	288
9	−1	−1	−1	+1	19	1,257	114
10	+1	−1	−1	+1	146	2,148	116
11	−1	+1	−1	+1	50	1,592	244
12	+1	+1	−1	+1	92	1,726	126
13	−1	−1	+1	+1	107	1,203	72
14	+1	−1	+1	+1	172	2,261	210
15	−1	+1	+1	+1	62	1,434	234
16	+1	+1	+1	+1	82	1,848	154
17 (C)	0	0	0	0	75	1,726	223
18 (C)	0	0	0	0	70	1,782	219
19 (C)	0	0	0	0	89	1,753	226

the next step was to evaluate the enzyme production using the CCRD technique, since it allowed predicting response surface with curvature plots and visualizing the maximum values of the response variables.

The results of CCRD are presented in Table 7. Comparing the optimized results with those obtained by Mandels and Weber [12] media, there was an improvement in all enzymatic activities. Increases of 3.3-, 3.2-, and 6.7-folds were achieved for FPase, CMCase, and β-glucosidase activities, respectively, at the end of this study.

Using the analysis of variance (ANOVA; Tables 8, 9, and 10), significant linear effects ($p \leq 0.05$) of both nitrogen sources (i.e., urea and yeast extract) were observed. Also, no significant interactions between urea and yeast extract were verified for any group of cellulases produced. This means that each nitrogen source alone presented linear effect, without mutual interference. Since the first experimental design, interaction between urea and yeast extract has not been observed.

Corroborating with the second experimental design, which presented significant curvature, the CCRD showed quadratic effect for FPase and β-glucosidase ($p \leq 0.05$), thus denoting curvilinear plan, as can be observed in ANOVA tables (Tables 8, 9, and 10). The lack of fit was not significative ($p > 0.05$); this, combined with the F values of the parameters and the determination coefficient (R^2) values (91.98 to FPase and 88.85 to β-glucosidase), shows that the model adequately adjusts to the experimental points, representing the confidence of the results.

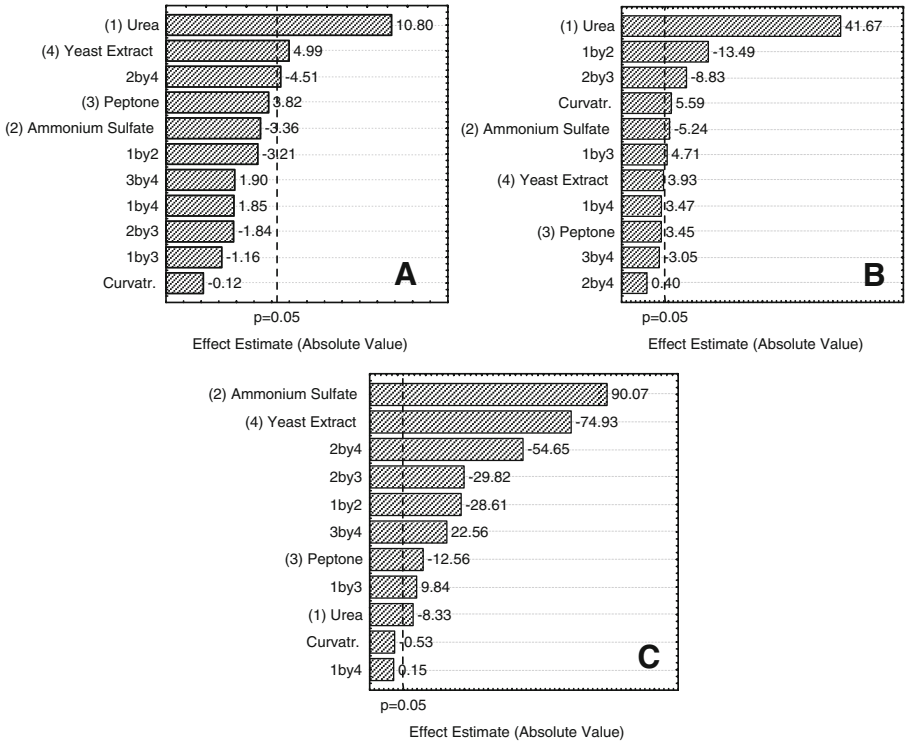


Fig. 1 Pareto chart for FPase (**a**), CMCase (**b**), and β-glucosidase (**c**) activities in 2^4 factorial design

Table 6 Matrix of experimental 2^3 factorial design for nitrogen sources optimization and their corresponding results of cellulase activities.

Run	Nitrogen sources			Activities (U/L)		
	Urea	Ammonium sulfate	Yeast extract	FPase	CMCase	β-glucosidase
1	−1	−1	−1	158	3,995	835
2	+1	−1	−1	202	4,291	1,540
3	−1	+1	−1	137	3,642	1,021
4	+1	+1	−1	240	4,895	1,702
5	−1	−1	+1	191	4,311	1,311
6	+1	−1	+1	221	4,520	1,717
7	−1	+1	+1	141	4,726	1,345
8	+1	+1	+1	175	5,144	1,728
9 (CP)	0	0	0	225	4,715	1,623
10 (CP)	0	0	0	234	4,565	1,687
11 (CP)	0	0	0	250	4,743	1,713

CP center point

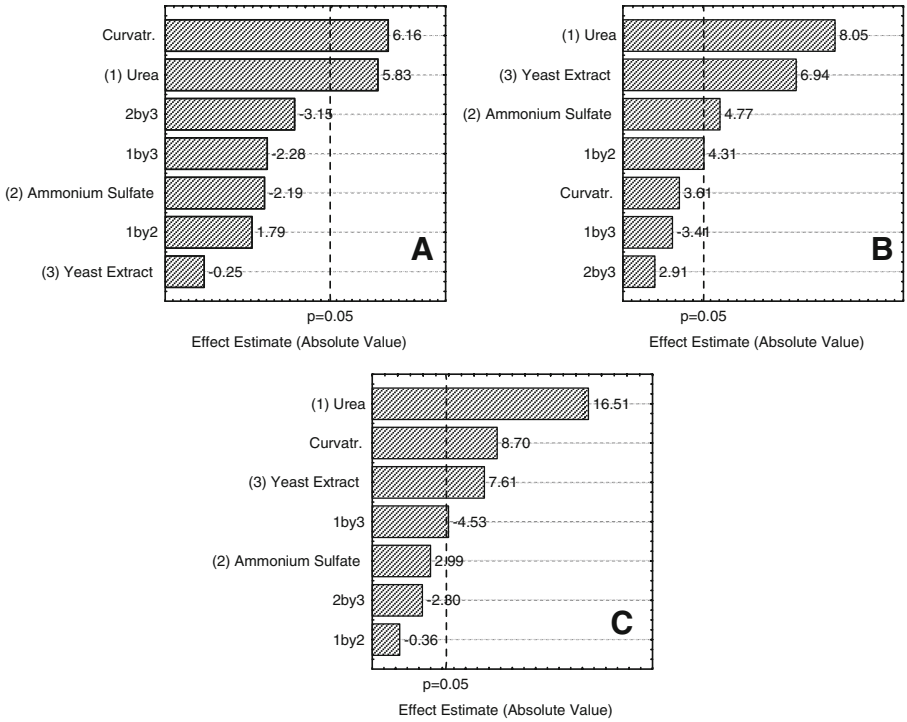


Fig. 2 Pareto chart for FPase (**a**), CMCase (**b**), and β-glucosidase (**c**) activities in the 2^3 factorial planning

Table 7 Matrix of experimental central composite rotational design (CCRD) for nitrogen sources optimization and their corresponding results of cellulase activities.

Experiment	Nitrogen sources		Activities (U/L)		
	Urea	Yeast extract	FPase	CMCase	β-glucosidase
1	−1	−1	158	4,029	727
2	−1	+1	171	4,354	1,119
3	+1	−1	166	5,302	1,080
4	+1	+1	244	5,513	1,101
5	−1.41	0	148	4,481	743
6	+1.41	0	263	6,529	1,213
7	0	−1.41	208	5,460	1,085
8	0	+1.41	255	7,105	1,435
9 (CP)	0	0	250	5,364	1,390
10 (CP)	0	0	269	5,524	1,499
11 (CP)	0	0	261	5,793	1,420

CP center point

Table 8 Analysis of variance (ANOVA) of nitrogen sources for FPase activities.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	p_{value}
Urea (L)	8,133	1	8,133	88	0.011
Urea (Q)	7,210	1	7,210	78	0.012
Yeast extract (L)	2,693	1	2,693	29	0.032
Yeast extract (Q)	2,899	1	2,899	32	0.030
Interaction 1×2 L	1,048	1	1,048	11	0.078
Lack of fit	2,962	3	987	11	0.086
Pure error	184	2	92		
Total	23,142	10			

The response surface plots of the third experimental design are presented in Fig. 3. FPase and β-glucosidase activities presented a point of maximum relatively similar. The analysis of Fig. 3b shows that CMCase activity could be increase. However, the increase of urea and yeast extract concentrations can act in an opposite way for FPase and β-glucosidases activities. By means of ANOVA, it was found that both nitrogen sources (i.e., urea and yeast extract) presented significant quadratic effect, except for CMCase activity, confirming that for this group of enzymes, the range of nitrogen source could be even higher, since the lack of quadratic effect and positive linear effect indicates a linear model, with a trend of increasing towards higher concentrations of the nitrogen sources investigated.

The mathematical models of cellulase production under the current conditions are represented by the following equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot \mathrm{Ur}^2 + \beta_2 \cdot \mathrm{El}^2 + \beta_3 \cdot \mathrm{Ur} + \beta_4 \cdot \mathrm{El} + \beta_5 \cdot \mathrm{Ur} \cdot \mathrm{El} + \varepsilon \quad (2)$$

where:

Ur = Urea
El = Yeast extract
ε = Pure error
β = Coefficients

Table 9 Analysis of variance (ANOVA) of nitrogen sources for CMCase activities.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	p_{value}
Urea (L)	1,473,886	1	1,473,886	31	0.030
Urea (Q)	512,272	1	512,272	11	0.081
Yeast extract (L)	2,831,711	1	2,831,711	60	0.016
Yeast extract (Q)	43,303	1	43,303	11	0.438
Interaction 1×2 L	3,186	1	3,186	0.1	0.819
Lack of fit	3,093,423	3	1,031,141	22	0.044
Pure error	93,986	2	46,993		
Total	8,200,284	10			

Table 10 Analysis of variance (ANOVA) of nitrogen sources for β-glucosidase activities.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	p_{value}
Urea (L)	145,154	1	145,154	46	0.021
Urea (Q)	373,623	1	373,623	118	0.008
Yeast extract (L)	86,185.8	1	86,186	27	0.035
Yeast extract (Q)	76,366.9	1	76,367	24	0.039
Interaction 1×2 L	34,504.9	1	34,505	11	0.080
Lack of fit	36,382.9	3	12,128	4	0.213
Pure error	6,306.2	2	3,153		
Total	692,365	10			

As it was noticed in the ANOVA table that there was no interaction between urea and yeast extract, the combined effect of both nitrogen sources was removed from the model. The equations representing each enzymatic group are provided as follows:

$$\text{FPase activity}(\text{U/L}) = 259.97 - 35.73\text{Ur}^2 - 22.66\text{El}^2 + 31.88\text{Ur} + 18.35\text{El} + 2.77 \quad (3)$$

$$\text{CMCase activities}(\text{U/L}) = 5560.19 - 301.19\text{Ur}^2 + 87.57\text{El}^2 + 429.23\text{Ur} + 594.95\text{El} + 62.58 \quad (4)$$

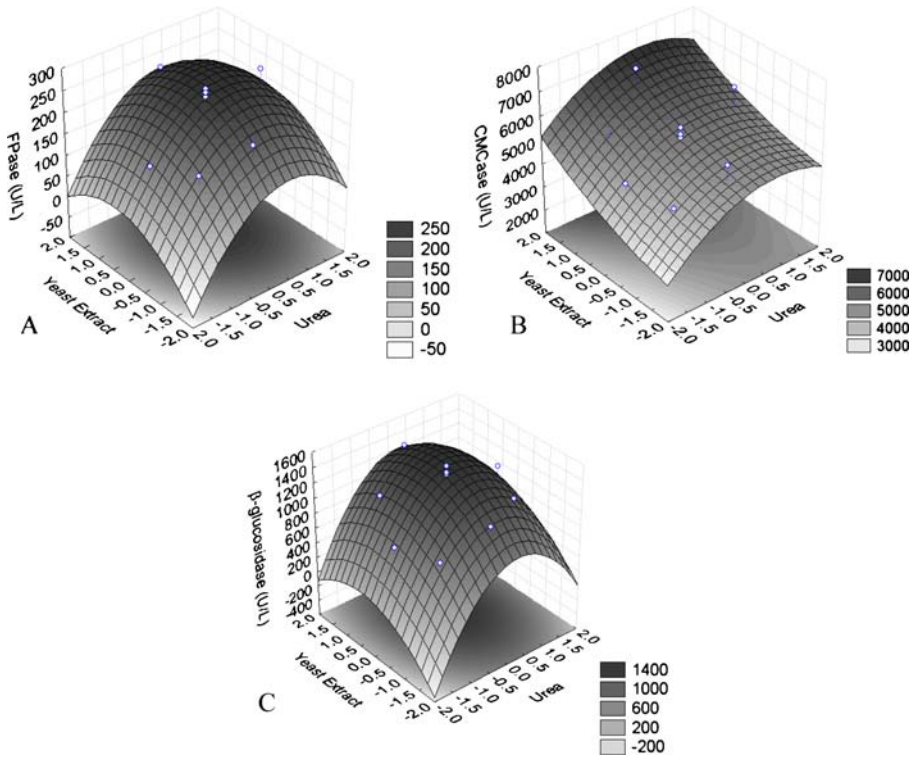


Fig. 3 Response surface of nitrogen source optimization for FPase (**a**), CMCase (**b**), and β-glucosidase (**c**) activities

Table 11 Validation of the nitrogen sources optimization.

Activities (U/L)	Limits		Predicted value	Experimental result
	−95%	+95%		
FPase (U/L)	220	287	254	227±6
CMCase (U/L)	5,805	6,959	6,382	6,917±241
β-glucosidase (U/L)	1,325	1,572	1,448	1,375±59

Predicted and experimental values of cellulase activities.

$$\beta\text{−Gase activity(U/L)} = 1436.47 - 257.22\text{Ur}^2 - 116.29\text{El}^2 + 134.70\text{Ur} + 103.79\text{El} + 16.21 \quad (5)$$

where:

β-Gase:β-glucosidase

Optimization of Nitrogen Sources using Desirability Function and Experimental Validation

The global desirability value to reach the optimum for the three enzymatic activities simultaneously was 0.872, meaning that the optimization by this function fulfills 87.2% of the maximum obtainable for each dependent variable (response variable). The optimum concentration for urea was 0.97 g/L and for yeast extract was 0.36 g/L.

The predicted values for cellulase activities determined by using the global desirability function and cellulase activities from the experimental validation of the results in optimized conditions are presented in Table 11.

It is observed that the experimental values are within the confidence limits −95% and +95%, showing that the optimized values of urea and yeast extract were experimentally validated. The deviations of experimental and predicted values were 18.6, 377.8, and 52.0 U/L for FPase, CMCase, and β-glucosidase activities, respectively, corresponding to values of the coefficient of variation of only 7.4%, 5.9%, and 3.6%.

Conclusions

The sequential experimental design strategy combined with the use of the desirability function for the optimization of nitrogen source showed to be an important tool for maximizing cellulase production by *P. funiculosum*. Apart from maximizing the three cellulase activities separately, an optimum condition was successfully found considering all of them simultaneously, which resulted in an increase of 3.3-, 3.2-, and 6.7-folds to FPase, CMCase, and β-glucosidase activities, respectively, compared with the initial condition (first experimental design). Among the evaluated nitrogen sources, urea and yeast extract are of greater importance to cellulase production by this filamentous fungus.

Acknowledgements The authors acknowledge the Brazilian Council for Research (CNPq), the Rio de Janeiro State Foundation for Science and Technology (FAPERJ), and the Brazilian Petroleum Company (PETROBRAS) for scholarship and other financial supports.

References

1. Pereira, R. E. (2006). MSc Thesis. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro
2. Pereira, N., Jr., Couto, M. A. P. G., & Anna, L. M. M. S. (2008). *Series on biotechnology* (2nd ed., p. 45). Rio de Janeiro: Biblioteca Nacional.
3. Vasquez, M. P., Silva, J. N. C., Souza, M. B., Jr., & Pereira, N., Jr. (2007). *Applied Biochemistry and Biotechnology, 137/140*(12), 141–154.
4. Schlitter, L. A. F. (2006). Msc Thesis. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro
5. Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (1992). *Wood microbiology, decay and its prevention*. San Diego: Academic. 476p.
6. Marzluf, G. (1997). *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61*(1), 17–32.
7. Merrick, M. J., & Edwards, R. A. (1995). *Microbiological Reviews, 59*, 604–622.
8. Betancur, G. J. V. (2005). Msc Thesis. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro
9. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). NREL, 14 p.
10. Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D. G., Santas, P., Santas, R., et al. (2007). *Bioresource Technology, 98*, 296–301.
11. Ghose, T. K. (1987). *Pure and Applied Chemistry, 59*(2), 257–268.
12. Mandels, M., & Weber, J. (1969). *Advances in Chemistry Series, 95*, 391–414.
13. Derringer, G., & Suich, R. (1980). *Journal of Quality Technology, 12*, 214–219.
14. Reyes, J., Peralta-Zamora, P., & Duran, N. (1998). *Química Nova, 21*(2), 140–143.
15. Sun, Y., & Cheng, J. (2002). *Bioresource Technology, 83*(1), 1–11.
16. Jorgensen, H., & Olsson, L. (2006). *Enzyme and Microbial Technology, 38*, 381–390.

electronic reprint

Acta Crystallographica Section F
Structural Biology and Crystallization Communications
ISSN 1744-3091
Editors: **H. M. Einspahr and M. S. Weiss**

Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the catalytic domain of the extracellular cellulase CBHI from *Trichoderma harzianum*

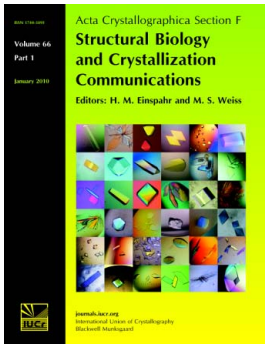
Francieli Colussi, Larissa C. Textor, Viviane Serpa, Roberto Nobuyuki Maeda, Nei Pereira and Igor Polikarpov

Acta Cryst. (2010). F**66**, 1041–1044

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see http://journals.iucr.org/services/authorrights.html



Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. It includes four categories of publication: protein structure communications; nucleic acid structure communications; structural genomics communications; and crystallization communications. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. *Section F* is essential for all those interested in structural biology including molecular biologists, biochemists, crystallization specialists, structural biologists, biophysicists, pharmacologists and other life scientists.

Crystallography Journals Online is available from **journals.iucr.org**

Acta Crystallographica Section F
Structural Biology and Crystallization Communications
ISSN 1744-3091

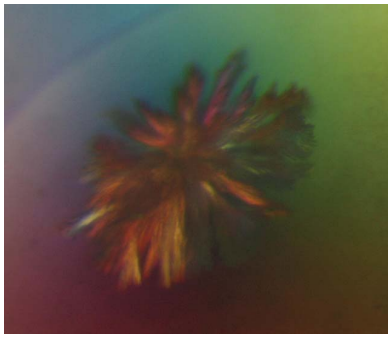
Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the catalytic domain of the extracellular cellulase CBHI from *Trichoderma harzianum*

Francieli Colussi,[a] Larissa C. Textor,[a] Viviane Serpa,[a] Roberto Nobuyuki Maeda,[b] Nei Pereira Jr[b] and Igor Polikarpov[a]*

[a]Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador Saocarlense 400, 13560-970 São Carlos-SP, Brazil, and [b]Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Escola de Química, Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LaDeBio), 21949-900 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

Correspondence e-mail: ipolikarpov@ifsc.usp.br

Received 28 April 2010
Accepted 7 July 2010



© 2010 International Union of Crystallography
All rights reserved

The filamentous fungus *Trichoderma harzianum* has a considerable cellulolytic activity that is mediated by a complex of enzymes which are essential for the hydrolysis of microcrystalline cellulose. These enzymes were produced by the induction of *T. harzianum* with microcrystalline cellulose (Avicel) under submerged fermentation in a bioreactor. The catalytic core domain (CCD) of cellobiohydrolase I (CBHI) was purified from the extracellular extracts and submitted to robotic crystallization. Diffraction-quality CBHI CCD crystals were grown and an X-ray diffraction data set was collected under cryogenic conditions using a synchrotron-radiation source.

1. Introduction

A variety of microorganisms degrade cellulose in nature. The enzymatic process that is involved in the hydrolysis of cellulosic materials has been studied in depth for several filamentous fungi, such as, for example, *Trichoderma reesei*. It is widely accepted that this hydrolytic process is accomplished by several cellulases through a series of reactions that are mediated by exoglucanases (cellobiohydrolases I and II), endoglucanases and β-glucosidases (Kubicek *et al.*, 1993). These enzymes are of considerable biotechnological interest, while the reaction conditions and the production costs of these enzymes significantly influence their range of application (Zhou *et al.*, 2008). Cellulases have been used in waste recycling and in the processing of cellulose-rich raw materials in the food, detergent, paper and textile industries (Bhat, 2000). Recently, the application of cellulases that have potential in the production of biofuels has gained significant importance.

Of the cellulases secreted by *T. reesei*, cellobiohydrolases (CBHs) are the most abundant enzymes, comprising roughly 60% of the cellulases produced by this fungus. These are key enzymes for the degradation of crystalline cellulose and the absence of CBHs reduces the rate of cellulose hydrolysis by as much as 70% (Lynd *et al.*, 2002). In general, the isoforms CBHI and CBHII act on the reducing and nonreducing ends of the cellulose chain, respectively, cleaving the internal glycoside bonds to release the disaccharide cellobiose (Hui *et al.*, 2002). These enzymes are known to be glycosylated proteins with acidic pIs (Medve *et al.*, 1998). Structurally, CBHI is a two-domain enzyme with a tertiary structure arrangement that is characteristic of glycosyl hydrolases (GHs) of family 7 (Coutinho & Henrissat, 1999). CBHs consist of a carbohydrate-binding module (CBM) and a catalytic core domain (CCD) separated by a heavily glycosylated peptide linker that is rich in prolines, serines and threonines (Gruno *et al.*, 2004). Cellulose-binding modules (CBMs) are found in most cellulases (Linder & Teeri, 1996) and play an important role in the interaction of GHs with the insoluble cellulose (Palonen *et al.*, 1999), which is crucial for the initiation and processivity of exoglucanases (Teeri *et al.*, 1998). The activity of the enzyme towards insoluble polymeric substrate in the absence of the CBM is frequently considerably lower than that of the full-length protein (Mattinen *et al.*, 1997). Structural studies have demonstrated that the active site of the CBHI from *T. reesei* is centrally located and is formed mainly by a

electronic reprint

large antiparallel β-sandwich followed by a 50 Å long cellulose-binding tunnel composed of four surface loops. As the cellulose chain passes through the tunnel the hydrolytic product cellobiose is formed (Divne *et al.*, 1994).

T. harzianum is a filamentous fungus that secrets a cellulolytic complex that is able to efficiently hydrolyze a range of substrates to their reducing sugars (Saddler *et al.*, 1985). With respect to the three major groups of cellulases, *T. harzianum* displays well balanced β-glucosidase, endoglucanase and exoglucanase activities, efficiently hydrolyzing cellulolytic substrates into monomeric glucose (de Castro *et al.*, 2010). Sequencing of the gene for *T. harzianum* exoglucanase type I (CBHI) has shown that the enzyme is closely related to *T. reesei* CBHI (81% sequence identity; Guilfoile *et al.*, 1999). To date, little is known about the three-dimensional structure of CBHI from *T. harzianum*. In order to structurally characterize orthologues of *T. reesei* CBHI and to better understand possible differences in the mechanisms of action of cellobiohydrolases, we have purified and crystallized the catalytic domain of CBHI from *T. harzianum* for X-ray diffraction analysis.

2. Experimental methods

2.1. Protein production

The enzymes of the cellulolytic complex were produced by submerged fermentation of *T. harzianum* in a 7.5 l BioFlo 110 bioreactor (New Brunswick Scientific) with an operating volume of 5 l. The culture was maintained under 50% oxygen saturation by aeration and agitation at a temperature of 298 K for 120 h. The fermentation medium was prepared as described previously (Mandels *et al.*, 1976), with microcrystalline cellulose (Avicel) as the carbon source to induce the expression of cellulases.

2.2. Protein isolation and purification

Full-length CBHI (amino acids 1–505, with a theoretical molecular weight of 53 kDa) was purified from a 5 l culture of *T. harzianum*. On the fifth day the culture was harvested for 20 min at 8000*g* and 277 K and the clarified extract was submitted to filtration and concentration using hollow-fibre technology. The extract was then applied onto a Q-Sepharose (GE Healthcare) column equilibrated with 50 m*M* Tris buffer pH 7.0 and eluted with a linear gradient of 0–1 *M* sodium chloride in the same buffer. The CBHI-containing fractions were concentrated with a Vivaspin concentrator and further purified by hydrophobic interaction chromatography on a Phenyl Sepharose column (GE Healthcare) equilibrated with 50 m*M* Tris buffer pH 7.0 and eluted with a linear gradient of 0–1 *M* ammonium sulfate in the same buffer. The protein fractions were monitored for exoglucanase activity using 1%(*w*/*v*) Avicel in 50 m*M* sodium citrate pH 5.0 as a substrate (Ghose, 1987) and the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method for quantification of the produced reducing sugars (Tomme *et al.*, 1988). Finally, the fractions containing CBHI activity were pooled and concentrated. The Avicelase activity of pure CBHI was determined according to the procedures of the IUPAC Commission on Biotechnology (Ghose, 1987) using cellobiose as a standard curve.

As the next step, the CBHI was submitted to photolytic cleavage by the addition of papain at a protein:enzyme ratio of 50:1(*w*:*w*). The reaction was carried out in 40 m*M* potassium phosphate buffer pH 6.0 at room temperature for 30 min. Size-exclusion chromatography was applied for further purification of the catalytic core domain using a Superdex 75 10/30 column (GE Healthcare) equilibrated with 50 m*M* Tris–HCl pH 7.0 and 300 m*M* sodium chloride. The eluted protein was dialyzed overnight against 50 m*M* Tris–HCl pH 7.0 and concentrated prior to crystallization. Protein quantification was carried out by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.3. Crystallization

The purified catalytic core domain of CBHI (46 kDa; amino acids 18–449) at a concentration of 8 mg ml^{-1} was submitted to crystallization screening using the sitting-drop vapour-diffusion technique. Drops of 2 µl final volume (1:1 ratio of protein and screen solutions) were set up automatically with a Honeybee 931 crystallization robot (Genomic Solutions Inc.) using a variety of commercially available screens (Qiagen) and maintained at a temperature of 291 K. Needles grew using 35% PEG 4000 as a precipitant. Crystal-growth optimization trials were carried out in both hanging-drop and sitting-drop plates (24-well Linbro plates).

2.4. Data collection and processing

The cluster of needle-like CBHI CCD crystals was manipulated using an acupuncture needle and transferred to a cryosolution containing a mixture of 35% PEG 4000 and 20% PEG 400. One single needle-like protein crystal was mounted in a cryoloop and directly flash-frozen in a nitrogen stream prior to X-ray data analysis. The diffraction data were collected on beamline MX2 at the Synchrotron Light Source Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil using a MAR charge-coupled device detector (Guimarães *et al.*, 2009). Data covering 180° were collected using the oscillation method at a wavelength of 1.46 Å. Data integration was carried out using the program *XDS* (Kabsch, 2010) and data were scaled with the program *SCALA* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

3. Results and discussion

3.1. Enzyme purification and crystallization

As expected, CBHI comprised the majority of the protein that was produced in the extracellular extract of *T. harzianum* (Fig. 1, lane 1). Highly pure full-length CBHI could be obtained after the second purification step *via* hydrophobic interaction chromatography (Fig. 1, lane 3). Its enzymatic activity was determined to be 0.3 U mg^{-1} on Avicel substrate at pH 5.0 and 323 K. This value is at the upper limit or just slightly above the reported Avicelase activity values obtained for *T. reesei* CBHI, which range from 0.014 to 0.26 U mg^{-1} depending

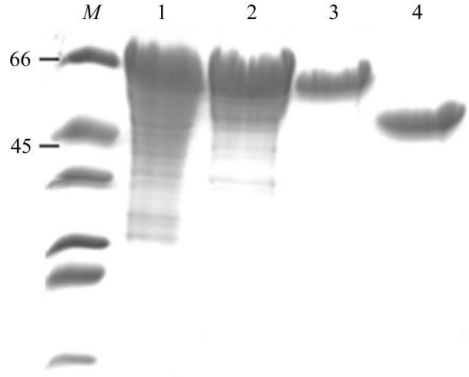


Figure 1
SDS–PAGE gel. Lane 1, supernatant of *T. harzianum* culture broth; lane 2, full-length CBH1 eluted from the anion-exchange column; lane 3, full-length CBH1 eluted from the hydrophobic interaction column; lane 4, CBHI CCD after cleavage with papain and size-exclusion chromatography purification. Lane *M* contains protein markers (labelled in kDa).

electronic reprint

Table 1
Data-collection and processing statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Beamline	MX2, LNLS
Wavelength (Å)	1.46
Space group	$P2_12_12_1$
Unit-cell parameters (Å)	a = 56.9, b = 69.3, c = 90.7
Resolution range (Å)	55.1–2.9 (3.0–2.9)
No. of unique reflections	8493 (1176)
Mosaicity (°)	0.5
Redundancy	7.0 (6.7)
Completeness (%)	99.6 (99.6)
$R_{\rm merge}$† (%)	11.9 (29.5)
$\langle I/\sigma(I)\rangle$	6.5 (2.8)

† $R_{\rm merge} = \sum_{hkl}\sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl)\rangle| / \sum_{hkl}\sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the observed intensity of an individual reflection and $\langle I(hkl)\rangle$ is the average intensity of that reflection.

on the initial substrate concentration and the experimental conditions (Tomme *et al.*, 1988; Elgogary *et al.*, 1989; Vehmaanpera *et al.*, 2009). Following protein cleavage with papain, the CCD of CBHI was successfully separated from the CBM by size-exclusion chromatography (Fig. 1, lane 4). According to the size-exclusion chromatography elution volume and SDS–PAGE, the CBHI CCD exhibits a molecular weight of about 50 kDa, which is close to the sequence-based theoretical molecular weight of the CBHI CCD (46 kDa).

The CBHI CCD was crystallized using a crystallization robot and several commercial crystallizations kits covering more than 650 different conditions. Crystals only grew in only one condition, which contained 35% PEG 4000 as a precipitant. Small needles appeared very rapidly using this crystallization condition, so that the needle cluster was completely formed after 10 h of incubation time (Fig. 2). Various attempts were carried out to attempt to reduce the number of nuclei being formed and to favour single-crystal growth. Variations in the pH and the protein and precipitant concentrations and tests of different additives were ineffective, resulting exclusively in a shower of microcrystals or clusters of needles. Needles grown in clusters were tested for X-ray diffraction quality. Surprisingly, a small single needle-like crystal of approximate dimensions 10 × 5 × 5 µm showed a diffraction pattern that extended to a resolution of about 2.9 Å (Fig. 3). A complete native data set was collected on the dedicated wiggler beamline MX2 (LNLS, Brazil; Guimarães *et al.*, 2009). The data set was reduced in the orthorhombic space group $P222$, with unit-cell parameters a = 56.9, b = 69.3, c = 90.7 Å. Analysis of the systematic absences revealed the presence of twofold screw symmetry along all three unit-cell axes. According to the Matthews coefficient of 1.77 $Å^3\,Da^{-1}$ (Matthews, 1968), there is only one molecule in the asymmetric unit and the solvent content of the crystal is 31%. Data-collection and processing statistics are shown in Table 1.

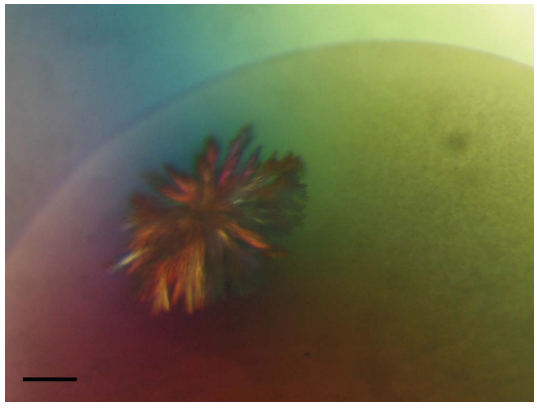
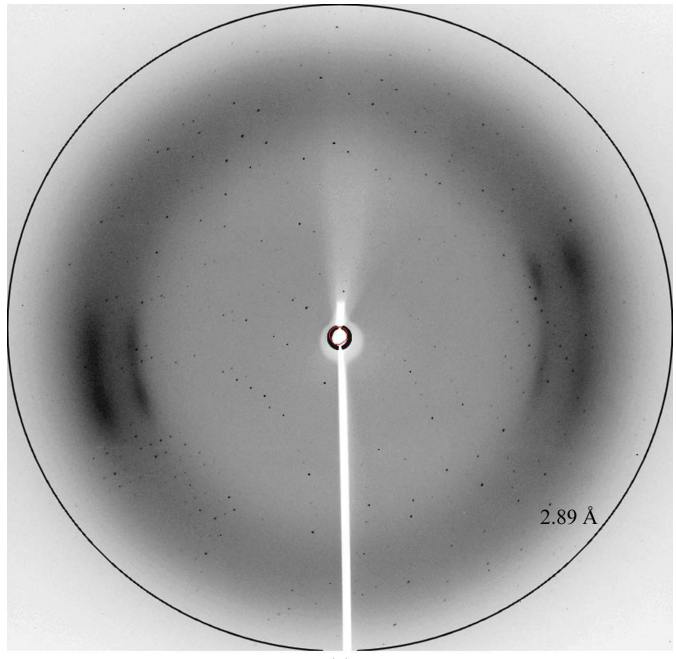


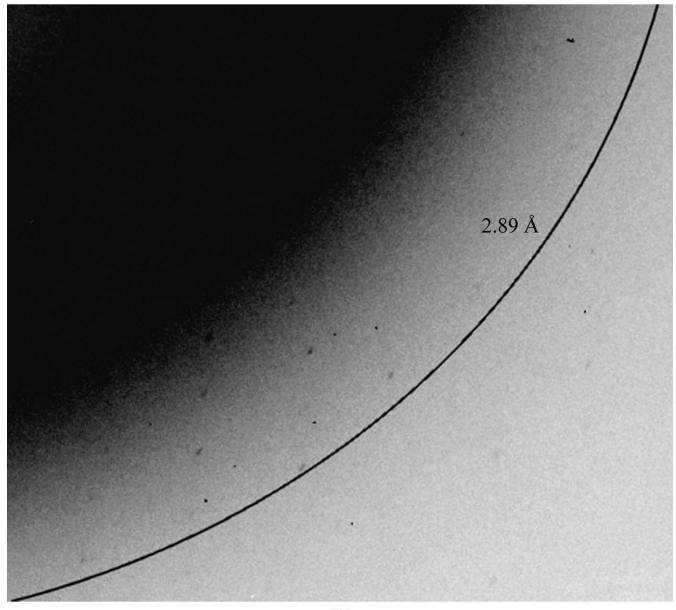
Figure 2
Crystals of CBHI CCD grew as clusters in hanging drops using 35%(*w*/*v*) PEG 4000 as precipitant. The black bar corresponds to 10 µm.

4. Conclusions

The cellulase CBHI was successfully purified from the soluble extracellular fraction of *T. harzianum* cultured in a bioreactor. The catalytic core domain of the enzyme was submitted to crystallization and diffraction-quality crystals were obtained. An X-ray diffraction data set from a single needle-like CBHI catalytic core domain crystal was collected using a synchrotron source.



(*a*)



(*b*)

Figure 3
(*a*) Diffraction pattern collected from one single needle-shaped crystal extending to a resolution of 2.9 Å. (*b*) Close-up view of the diffraction image with enhanced contrast.

electronic reprint

We are grateful to the MX2 staff members for beamline support and to the Brazilian Synchrotron Light Source (LNLS). This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) *via* research grant Nos. 08/56255-9, 2007/08706-9 and 2009/05349-6, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) *via* INCT do Bioetanol and grant No. 471834/2009-2.

References

Bhat, M. K. (2000). *Biotechnol. Adv.* **18**, 355–383.
Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
Castro, A. M. de, Pedro, K. C., Cruz, J. C., Ferreira, M. C., Leite, S. G. & Pereira, N. Jr (2010). *Appl. Biochem. Biotechnol.* doi:10.1007/s12010-010-8986-0.
Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* D**50**, 760–763.
Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (1999). *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, edited by H. J. Gilbert, G. J. Davies, B. Henrissat & B. Svensson, pp. 3–12. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
Divne, C., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T. & Jones, T. A. (1994). *Science*, **265**, 524–528.
Elgogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D. E. & Eldorry, H. (1989). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 6138–6141.
Ghose, T. K. (1987). *Pure Appl. Chem.* **59**, 257–268.
Gruno, M., Valjamae, P., Pettersson, G. & Johansson, G. (2004). *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 503–511.
Guilfoile, P., Burns, R. G., Zu-Yi, Amundson, M. & Chang, F.-H. (1999). *J. Minn. Acad. Sci.* **64**, 18–22.
Guimarães, B. G., Sanfelici, L., Neuenschwander, R. T., Rodrigues, F., Grizolli, W. C., Raulik, M. A., Piton, J. R., Meyer, B. C., Nascimento, A. S. & Polikarpov, I. (2009). *J. Synchrotron Rad.* **16**, 69–75.
Hui, J. P. M., White, T. C. & Thibault, P. (2002). *Glycobiology*, **12**, 837–849.
Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* D**66**, 125–132.
Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R. L. & Kubicekpranz, E. M. (1993). *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 90–99.
Linder, M. & Teeri, T. T. (1996). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 12251–12255.
Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. (2002). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 506–577.
Mandels, M., Andreotti, R. & Roche, C. (1976). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 21–33.
Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
Mattinen, M. L., Kontteli, M., Kerovuo, J., Linder, M., Annila, A., Lindeberg, G., Reinikainen, T. & Drakenberg, T. (1997). *Protein Sci.* **6**, 294–303.
Medve, J., Lee, D. & Tjerneld, F. (1998). *J. Chromatogr. A*, **808**, 153–165.
Palonen, H., Tenkanen, M. & Linder, M. (1999). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5229–5233.
Saddler, J. N., Hogan, C. M. & Louisseize, G. (1985). *Appl. Environ. Microbiol.* **22**, 139–145.
Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C. & Jones, T. A. (1998). *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 173–178.
Tomme, P., Vantilbeurgh, H., Pettersson, G., Vandamme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T. & Claeyssens, M. (1988). *Eur. J. Biochem.* **170**, 575–581.
Vehmaanpera, J., Alapuranen, M., Puranen, T., Siika-aho, M., Kallio, J., Hooman, S., Voutilainen, S., Halonen, T. & Viikari, L. (2009). US Patent 20090042266.
Zhou, J., Wang, Y.-H., Chu, J., Zhuang, Y.-P., Zhang, S.-L. & Yin, P. (2008). *Bioresour. Technol.* **99**, 6826–6833.

electronic reprint

Elsevier Editorial System(tm) for Biomass and Bioenergy
Manuscript Draft

Manuscript Number: JBB-D-10-00751

Title: THE ESSENTIALNESS OF DELIGNIFICATION ON ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGAR CANE BAGASSE CELLULIGNIN FOR SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION

Article Type: Research Paper

Keywords: Alkali Delignification, Enzymatic Hydrolysis, Glucose, Lignocellulosic, Sugar Cane Bagasse

Corresponding Author: Mrs. Carolina Barcelos,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio de Janeiro

First Author: Carolina Barcelos

Order of Authors: Carolina Barcelos; Roberto Maeda; Gabriel Betancur; Nei Pereira Jr.

Abstract: The enzymatic saccharification of partially delignified cellulignin of sugar cane bagasse was studied to verify how hydrolysis yield and hydrolysis rate were affected by the lignin content. Sodium hydroxide in concentrations ranging from 0.025-1 M was used to partially remove lignin. The remaining solids were subjected to enzymatic hydrolysis using commercial cellulases. The maximum glucose concentration was 40.4 g/L, corresponding to a cellulose conversion efficiency of 50%; this concentration was achieved with 1 M NaOH. Subsequently, the enzymatic hydrolysis of alkaline non-pretreated samples was performed with different enzyme loads (25-150 FPU/g solids) to evaluate if an increase in enzyme load was necessary to reach the same glucose concentration when using partially delignified cellulignin. We found that all yields of enzymatic hydrolysis of non-pretreated cellulignin were lower when compared with alkaline pretreated samples because of the lignin content.

Suggested Reviewers: Ashok Pandey
Regional Research Laboratory
pandey@csrrltrd.ren.nic.in
Have some works related to this topic.

Jiayang Cheng
North Carolina State University
jay_cheng@ncsu.edu
Have some works related to this topic.

Carlos Cardona
National University of Colombia at Manizales
ccardonaal@unal.edu.co
Have some works related to this topic.

Opposed Reviewers: