



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G: UM ESTUDO  
SOBRE CAPACIDADE DE ADSORÇÃO ENTRE LIGNOCRESOL E CELULASES.**

MARIANA TERESA BARDUCO FERREIRA

Botucatu

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G: UM ESTUDO  
SOBRE CAPACIDADE DE ADSORÇÃO ENTRE LIGNOCRESOL E CELULASES.**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Campus de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista,  
para obtenção do título de Doutora  
no Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia.

Mariana Teresa Barduco Ferreira

Doutoranda

Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto

Orientador

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Ferreira, Mariana Teresa Barduco.

Recuperação enzimática na produção de etanol 2g : um estudo sobre capacidade de adsorção entre lignocresol e celulases / Mariana Teresa Barduco Ferreira. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Mario de Oliveira Neto  
Capes: 90400003

1. Enzimas. 2. Lignina. 3. Energia - Fontes alternativas.

Palavras-chave: Enzimas; Lignina; Lignocresol; Recuperação enzimática.

MARIANA TERESA BARDUKO FERREIRA

**RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G: UM ESTUDO  
SOBRE CAPACIDADE DE ADSORÇÃO ENTRE LIGNOCRESOL E CELULASES.**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Campus de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista,  
para obtenção do título de Doutora  
no Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto

UNESP- Botucatu

Orientador

Prof. Dra. Carla dos Santos Riccardi

UNESP-Botucatu

Prof. Dra. Sarita Cândida Rabelo

UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

UNESP-Botucatu

Dra. Daniele Fernanda Chiarelli Gonçalves

Botucatu

2019

**Dedico este trabalho:**

*Aos meus pais, Neusa e José Marcio e a minha sobrinha, Maria Luíza.*

## **Agradecimentos**

À Deus, sem Ele eu nada seria obrigada por me amparar e por me permitir chegar até aqui;

Aos meus pais, Neusa e José Marcio, por estarem sempre ao meu lado, me inspirando, orientando e pelo apoio incondicional em todas as decisões da minha vida;

Ao meu irmão Marcio por todo apoio, incentivo e carinho;

À minha sobrinha Maria Luiza por alegrar os meus dias mesmo distante;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto pela oportunidade, confiança e orientação;

À minha família, tios e primos que me acolheram e me apoiaram ao longo dessa caminhada;

Aos amigos, que mesmo distantes, sempre me ouviram, aconselharam e apoiaram;

Aos amigos que Botucatu me deu, que foram uma verdadeira família, sou muito grata por ter encontrado vocês, obrigada por toda a ajuda e bons momentos compartilhados;

À amiga Karine Kettener, por todo o apoio e amizade;

Aos colegas de laboratório, Mariana, Lucas, Manoel e Guto;

Ao Thiago Zuccari por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade;

Ao técnico Alex Basseto por todo suporte e amizade;

Aos membros da banca, os Profs Dr. Joel Hormaza, Dra. Daniele Chiarelli, Dra. Sarita Rabelo e Dra. Carla dos Santos Riccardi pela atenção e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos;

To Dr. Michael Ladisch and Dr. Eduardo Ximenes for opportunity and all support.

To LORRE team. A special thank you to David Orrego, Daehwan Kim, Vanessa Molina, Jonathan Overton, and Pablo Vega;

Ao Dr. Antonio Santos por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho e pela amizade;

À Raquel Peron pela ajuda no dia a dia em um país estrangeiro e pela amizade que construímos;

Aos amigos brasileiros de Purdue, Talita, Victor Hugo, Allyne, Pedro, Renato e Doug pela amizade e pelos momentos compartilhados;

Aos amigos da Pós-Graduação;

A todos os professores da Pós-Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos compartilhados;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento PDSE –Processo 88881.135961/2016-01);

A todos dos Departamento de Física e Biofísica;

À Seção de Pós-Graduação pela dedicação no atendimento;

A todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

**Muito Obrigada!**

## Lista de Figuras

### Capítulo 1: Considerações Gerais

<b>Figura 1:</b> Esquema da composição do material lignocelulósico.....	19
<b>Figura 2:</b> Monômeros fenólicos (unidades de fenilpropeno) precursores da lignina.....	21
<b>Figura 3:</b> Ação das celulases.....	25
<b>Figura 4:</b> Modelo esquemático do Sistema de Separação de fases.....	32
<b>Figura 5:</b> Fluxograma do processo de recuperação enzimática utilizando lignocresol.....	33

### Capítulo 2: Capacidade de adsorção de $\beta$ -glicosidases em lignocresol visando a reciclagem enzimática em bioprocessos.

<b>Figura 1:</b> Modelos tridimensionais das $\beta$ -glucosidases.....	54
<b>Figura 2:</b> Esquema do processo de obtenção do lignocresol.....	56
<b>Figura 3:</b> Fluxograma do processo de adsorção.....	56
<b>Figura 4:</b> Ajuste linear aos pontos de absorbância encontrados para concentrações de BSA ( $R^2$ ajustado de 0,99962) .....	59
<b>Figura 5:</b> Curva padrão baseada na relação entre concentração de p-nitrophenol (mM) e absorbância.....	60
<b>Figura 6:</b> Início da separação de fases após adição de ácido sulfúrico.....	62
<b>Figura 7:</b> Resultado da primeira centrifugação da síntese de lignocresol.....	62
<b>Figura 8:</b> Pipetagem gota a gota da fase orgânica (1ª centrifugação) em éter etílico.....	63
<b>Figura 9:</b> Resultado da segunda centrifugação da síntese de lignocresol.....	63
<b>Figura 10:</b> Redução da amostra por Rotaevaporador em banho maria.....	64
<b>Figura 11:</b> Lignocresol após secagem em estufa.....	64
<b>Figura 12:</b> Porcentagem de TpBgl1 (GH1) e TpBgl3 (GH3) adsorvida para diferentes concentrações iniciais de lignocresol e lignina não modificada.....	66
<b>Figura 13:</b> Potencial Zeta do lignocresol (LC) e lignina (LG) em função do pH.....	68
<b>Figura 14:</b> Modelo esquemático da interação entre o lignocresol e lignina com as $\beta$ -glicosidases.....	69

**Figura 15:** Avaliação a capacidade de adsorção de TpBgl1 e TpBgl3 em lignocresol na presença de glicose + CMC.....69

**Figura 16:** Efeito do efeito de adsorção na atividade enzimática das  $\beta$ -glicosidasases.....70

### **Capítulo 3: Capacidade de Adsorção e Funcionalidade de Celulases adsorvidas em Lignocresol**

**Figura 1:** Adsorção de celulases pelo lignocresol.....83

**Figura 2:** Estabilidade do complexo lignocresol-celulase.....84

**Figura 3:** Sacarificação por papel de filtro.....85

### **Capítulo 4: Avaliação da capacidade de adsorção de lignocresol proveniente de bagaço de cana-de-açúcar**

**Figura 1:** Adsorção de celulases em lignocresol proveniente de cana-de-açúcar.....96

### **Lista de Tabelas**

#### **Capítulo 1. Considerações gerais**

**Tabela 1.** Vantagens e desvantagens dos métodos de reciclagem enzimática .....29

#### **Capítulo 2: Capacidade de adsorção de $\beta$ -glicosidasases em lignocresol visando a reciclagem enzimática em bioprocessos.**

**Tabela 1:** Absorbâncias para concentrações de BSA (mg/mL) .....58

**Tabela 2:** Diluições para o prepararo da curva padrão.....60

#### **Capítulo 4: Avaliação da capacidade de adsorção de lignocresol proveniente de bagaço de cana-de-açúcar**

**Tabela 1:**Resultado Hidrólise Enzimática.....97

## **Lista de abreviações**

BSA: Soro albumina Bovina

CBM: Módulo de ligação ao carboidrato

FES: Fermentação em estado sólido

FSeq: Fermentação sequencial

FSm: Fermentação submersa

LC: Lignocresol

LG: Lignina

pI: Ponto Isóeletrico

*TpBgl1*:  $\beta$ -glucosidades da família GH1

*TpBgl3*:  $\beta$ -glucosidades da família GH3

## Resumo

A busca por fontes de energias renováveis vêm ganhando cada vez mais importância, pois, com a eminente escassez dos combustíveis fósseis, que são as principais fontes energéticas utilizadas mundialmente e ao mesmo tempo com os problemas ambientais causados por esses combustíveis, o etanol de segunda geração (2G) surge como uma alternativa de energia renovável já que é obtido a partir de biomassa lignocelulósica. Entretanto, as tecnologias para a conversão desta biomassa em açúcares fermentáveis ainda possuem fatores limitantes. Um dos grandes problemas do processo de obtenção do etanol 2G está relacionado ao custo das enzimas celulolíticas. Sendo assim, desenvolver estratégias para a recuperação dessas enzimas é necessário para assegurar a viabilidade econômica do processo de conversão de biomassa. Diversas técnicas estão sendo estudadas e colocadas em prática para promover a recuperação, reciclagem e imobilização enzimática. Entretanto, nenhuma das metodologias utilizadas demonstram, de maneira geral, alta eficiência, custo baixo, rapidez e manutenção da atividade enzimática. A partir da lignina, subproduto da indústria de papel e celulose, pode-se sintetizar o lignocresol. Este, apresenta grandes expectativas de interação enzimática uma vez que apresenta características físico-químicas favoráveis à adsorção. Frente a isto, propusemos a produção deste composto para promover a interação com enzimas para promover recuperação enzimática. A síntese de lignocresol, oriundo da lignina Kraft de *Pinus spp.*, foi feita pela adaptação à metodologia do sistema de separação de fases. Nesse processo, mais especificamente na primeira fase, a madeira é solvatada com o p-cresol (derivado do fenol) para evitar o ataque do ácido concentrado a lignina e assim ela não se dissolve. Desse modo, apenas os carboidratos são dissolvidos pelo ácido concentrado na segunda fase. Para obtenção do complexo, foram realizadas duas suspensões de lignocresol em tampão citrato de sódio (50 mM), ambas com concentração fixa 10 mg/mL. Ensaio de adsorção foram realizados entre o lignocresol e  $\beta$ -glicosidases (*TpBgl1* e *TpBgl3*), e o coquetel enzimático Cellic Ctec 3 (Novozymes). Em relação a adsorção das  $\beta$ -glicosidases, os resultados encontrados demonstram grande adsorção (100-90%) do lignocresol para com *TpBgl1* e *TpBgl3*, em concentrações inferiores à 0,25 e 0,40 mg/mL, respectivamente. Ensaio de adsorção utilizando somente a lignina apresentaram resultados muito inferiores aos de lignocresol, comparados também em concentrações inferiores como demonstradas anteriormente, sendo ausente adsorção de lignina à *TpBgl1* e adsorção de lignina à *TpBgl3* de 70-50%. Os ensaios de ELS, demonstraram que lignocresol e lignina apresentam

potencial-zeta (mV) negativo entre a faixa de pH 4-7. Vale ressaltar que, entre o pH 5-7, o lignocresol apresenta valores maiores negativamente se comparado à lignina. A adsorção do lignocresol proveniente da lignina Kraft com o coquetel Cellic Ctec 3 foi eficiente, a celulase foi efetivamente imobilizada pelo lignocresol. O desempenho da hidrólise enzimática de celulases imobilizadas em lignocresol é de aproximadamente 33% em relação ao da celulase livre na conversão de açúcares. A celulase manteve uma atividade residual após a adsorção em lignocresol. A estabilidade do complexo celulase de lignocresol também foi testada e a atividade foi mantida a partir da formação do complexo. Portanto, todos estes resultados mostram boa adsorção do lignocresol às enzimas, demonstrando que o lignocresol pode ser utilizado como suporte para recuperação enzimática, sendo uma alternativa para redução dos custos na produção de etanol 2G.

Palavras-Chave: Recuperação enzimática. Lignina.Lignocresol. Enzimas.

## **Abstract**

The search for renewable energy sources is gaining increasing importance because, with the imminent shortage of fossil fuels, which are the main energy sources used worldwide and at the same time with the environmental problems caused by these fuels, second-generation ethanol (2G) arises as a renewable energy alternative since it is obtained from lignocellulosic biomass. However, the technologies for the conversion of this biomass to fermentable sugars still have limiting factors. One of the major problems in the process of obtaining 2G ethanol is related to the cost of cellulolytic enzymes. Thus, developing strategies for the recovery of these enzymes is necessary to ensure the economic viability of the biomass conversion process. Several techniques are being studied and put into practice to promote recovery, recycling, and enzymatic immobilization. However, none of the methodologies used shows, in general, high efficiency, low cost, fastness and maintenance of the enzymatic activity. From lignin, a byproduct of the pulp and paper industry, lignocresol can be synthesized. This one presents high expectations of enzymatic interaction since it presents physicochemical characteristics favorable to the adsorption. In view of this, we proposed the production of this compound to promote interaction with enzymes to promote enzymatic recovery. The lignocresol synthesis from *Pinus* spp. Kraft lignin was made by adapting to the phase separation system methodology. In this process, more specifically in the first step, the wood is solvated with the p-cresol (phenol derivative) to avoid the attack of the concentrated acid on the lignin and so it does not dissolve. Thus, only the carbohydrates are dissolved by the acid concentration in the second phase. To obtain the complex, two lignocresol suspensions were made in sodium citrate buffer (50 mM), both with fixed concentration 10 mg / mL. Adsorption assays were performed between lignocresol and  $\beta$ -glycosidases (TpBgl1 and TpBgl3), and the enzymatic cocktail Cellic Ctec 3 (Novozymes). Regarding the adsorption of the  $\beta$ -glycosidases, the results showed high adsorption (100-90%) of lignocresol to TpBgl1 and TpBgl3, at concentrations below 0.25 and 0.40 mg / mL, respectively. Adsorption tests using lignin alone showed much lower results than lignocresol, also compared at lower concentrations as demonstrated previously, absent adsorption of lignin to TpBgl1 and adsorption of lignin to TpBgl3 of 70-50%. The ELS tests showed that lignocresol and lignin present negative zeta potential (mV) between pH range 4-7.

It is worth mentioning that, between pH 5-7, lignocresol presents higher values negatively when compared to lignin. The adsorption of lignocresol from Kraft lignin with Cellic Ctec 3 cocktail was efficient, cellulase was effectively immobilized by lignocresol. The performance of the enzymatic hydrolysis of immobilized cellulases in lignocresol is approximately 33% in relation to that of free cellulase in the conversion of sugars. Cellulase was active even after adsorption on lignocresol. The stability of the lignocresol cellulase complex was also tested and activity was maintained from the complex formation. Therefore, all these results show good adsorption of lignocresol to the enzymes, demonstrating that lignocresol can be used as support for enzymatic recovery, being an alternative to reduce costs in the production of 2G ethanol.

Keywords: Enzymatic Recycling:Lignin:Lignocresol; Enzymes

## Sumário

Capítulo 1 .....	15
Considerações Gerais.....	15
1.Introdução.....	16
2. Objetivos .....	18
3. Revisão de Literatura .....	19
3.1. Material lignocelulósico.....	19
3.2. Lignina .....	20
3.3 Enzimas .....	23
3. 4 Reciclagem enzimática.....	28
3.5 Lignocresol.....	31
4. Referências Bibliográficas .....	34
Capítulo 2 .....	51
Capacidade de adsorção de $\beta$ -glicosidases em lignocresol visando reciclagem enzimática.51	
1. Introdução.....	53
2.Métodologia .....	55
3.Resultados e Discussão .....	61
4.Conclusão .....	71
5. Referências Bibliográficas .....	72
Capítulo 3 .....	76
Capacidade de Adsorção e Funcionalidade de Celulases adsorvidas em Lignocresol .....	76
1.Introdução.....	78
2. Metodologia .....	79
3.Resultados e Discussão .....	81
4.Conclusão .....	86
5. Referências Bibliograficas .....	87

Capítulo 4 .....	91
Avaliação da capacidade de adsorção de lignocresol proveniente de bagaço de cana-de-açúcar. ....	91
<u>1</u> .Introdução.....	92
<u>2</u> .Metodologia .....	94
3.Resultados e Discussão.....	94
4.Conclusões.....	
5.Referencias Bibliográficas.....	
Capítulo 5 .....	100

## Estrutura da Tese

A tese foi dividida em cinco capítulos, sendo:

- **Capítulo 1 - Considerações Gerais:** Contendo a revisão bibliográfica, a introdução e os objetivos gerais e específicos de todo o trabalho;
- **Capítulo 2 – Capacidade de adsorção de  $\beta$ -glicosidases em lignocresol visando a reciclagem enzimática em etanol 2G:** Teve como objetivo a síntese de lignocresol a partir da lignina obtida do licor negro proveniente de *Pinus* spp, para promoção da adsorção enzimática entre o lignocresol e  $\beta$ -glucosidases da família GH1(*TpBgl1* e *TpBgl3*), para a formação de um complexo lignocresol-enzima, visando a reciclagem enzimática na produção de etanol 2G.
- **Capítulo 3 - Capacidade de Adsorção e Funcionalidade de Celulases adsorvidas em Lignocresol:** Teve como objetivo o estudo entre a adsorção do lignocresol com o complexo enzimático Cellic Ctec 3. Verificamos a adsorção das enzimas ao lignocresol e atividade enzimática do complexo lignocresol-celulases.
- **Capítulo 4- Avaliação da capacidade de adsorção de lignocresol proveniente de bagaço de cana-de-açúcar.** Referente ao período sanduíche realizado no Laboratory of Renewable Resources Engineering (LORRE) – Purdue University, sob a orientação do Prof. Dr. Michael Ladisch e Prof. Dr. Eduardo Ximenes.
- **Capítulo 5 – Conclusões Finais.**

# Capítulo 1

## Considerações Gerais

## 1.Introdução

Com os avanços industriais e aumento da população, o consumo de energia no mundo vem aumentando continuamente. Sendo assim, o uso indiscriminado de combustíveis fósseis, como petróleo e carvão, poderá futuramente se esgotar. Com isso, existe uma necessidade de utilização de fontes de energia sustentáveis. Os produtos lignocelulósicos, como biomassa de plantas, são recursos potenciais para a substituição desses combustíveis. Nos últimos anos, observa-se um crescente interesse na utilização de material lignocelulósico como fonte de energia renovável, como o etanol de segunda geração (2G), por exemplo (NAGAMATSU; FUNOAKA, 2003). Os materiais lignocelulósicos são predominantemente compostos por lignina, celulose e hemiceluloses.

O material lignocelulósico é bastante vantajoso pois além de ser uma fonte de energia renovável, e favorável para o meio ambiente, não é utilizado para a alimentação humana, ou seja, não compete com a agricultura voltada para esta finalidade, e pode ser encontrado em grandes quantidades, como em resíduos agrícolas e florestais e a baixo custo (SANTIAGO & RODRIGUES, 2017; GHATAK, 2011).

Porém esse material tem uma estrutura complexa e compacta e precisa de pré-tratamentos que auxiliam principalmente na retirada da lignina e hemicelulose, permitindo a diminuição da cristalinidade e aumento da porosidade do material, permitindo que a celulose se torne apta à hidrólise enzimática (UNICA, 2017).

Existem duas principais vias pelas quais é possível quebrar as ligações da celulose, são hidrólise ácida e a enzimática. Os processos ácidos são eficientes e mais baratos mas geram vários subprodutos indesejáveis. Essa desvantagem ocorre pela degradação de uma parte da glicose, da fração hemicelulósica e da lignina, além disso, em alguns casos, é necessário o uso de altas temperaturas e/ou pressões (RABELO, 2007; PEREIRA, 2019).

Sendo assim, hidrólise enzimática é um processo promissor para a bioconversão do material lignocelulósico pois proporciona maiores rendimentos e é feita a pressão ambiente, sem formação de subprodutos inibidores da fermentação (RABELO, 2007).

No entanto, mesmo com esse processo sendo favorável economicamente ainda existem algumas limitações econômicas e tecnológicas, como o alto custo das enzimas utilizadas na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis (FLORENCIO et al., 2017).

As enzimas chamadas de celulasas ou enzimas celulolíticas, que são, Endo-1,4-beta-D-glucanase (E.C.3.2.1.4), Exo-1,4-beta-D-glucanase (E.C.3.2.1.176), Exo-1,4-beta-D-glucanase (E.C.3.2.1.91) e  $\beta$ -glucosidase (E.C.3.2.1.21) hidrolisam o material lignocelulósico agindo sinergicamente no polímero de celulose e são produzidas geralmente por uma grande

variedade de bactérias, fungos, anaeróbios e aeróbios, mesófilos e termófilos via fermentação submersa (SmF) (FLORENCIO et al., 2017; JUTURU, WU et al., 2014). Porém, alguns parâmetros devem ser considerados. Como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade e temperatura pois representam variáveis operacionais determinantes no processo de fermentação (SINGHANIA et al., 2010). Recentemente, empresas estão desenvolvendo processos de obtenção de celulases a partir de organismos geneticamente modificados (OGMs), mas o processo de desenvolvimento ainda está em escala de bancada devido ao alto custo de produção (BHALLA et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2018).

Assim, diversos estudos têm buscado alternativas para diminuir os custos desses biocatalizadores. O uso de técnicas para a reutilização das celulases é interessante porque possibilita o reuso das enzimas, e como consequência diminui os custos do processo de obtenção dos açúcares fermentescíveis. Existem várias técnicas sendo propostas, uma das mais utilizadas industrialmente para este fim consiste, de modo geral, em separação de membrana, cujo processo pode ser por micro-filtração, ultra-filtração, nano-filtração e osmose reversa (SZÉPÁL et al., 2013). Entretanto, segundo Echavarría et al. (2012), um dos principais problemas nas aplicações práticas da filtração por membrana é a redução do fluxo de permeado ao longo do tempo, causada pelo acúmulo de componentes na estrutura porosa da membrana, interação química entre solutos e material de membrana e crescimento bacteriano. Estes empecilhos levam a uma queda no fluxo através da membrana, tornando o processo de recuperação ineficiente em certos momentos. A aplicação de metodologias por HPLC também consiste em práticas para promover a recuperação enzimática, mas, notoriamente, representam um processo custoso e demorado (HEROLD et al., 1991).

Sendo assim, uma alternativa proposta para solucionar esse problema consiste no desenvolvimento de uma metodologia a partir do material lignocelulósico. Esse material é um recurso importante para a biorrefinaria de combustíveis, produtos químicos e materiais de base biológica (GANDLA et al., 2018). As matérias-primas do material lignocelulósico incluem culturas energéticas, madeira e resíduos agrícolas (palha de cana, palha de milho, bagaço de cana, mandioca, etc.) (MENG & RAGAUSKAS, 2014).

Dos três macrocomponentes lignocelulósicos, celulose, hemiceluloses, a lignina é um ponto limitante na sacarificação enzimática da celulose, pois diminui a acessibilidade das enzimas hidrolíticas às fibras celulósicas (PALONEN et al., 2004; AKIMKULOVA et al., 2016; QIN et al., 2016). Esse processo chamado adsorção improdutiva, ocorre por

hidrofobicidade, ligação eletrostática ou ligação de hidrogênio (NAKAGAME et al., 2011; LOU et al., 2013).

Entretanto, podemos utilizar a adsorção improdutiva como um ponto positivo, principalmente, pela elevada afinidade com biopolímeros, devido ao seu caráter hidrofóbico, que consegue se ligar a essas enzimas (NAGAMATSU; FUNAOKA, 2003). A partir de lignina, pode-se obter o lignocresol, que é composto por unidades de 1,1-bis(aril)propano, que preserva características da lignina (MIKAME; FUNAOKA, 2006). Este composto é sintetizado utilizando o sistema de separação de fases, que consiste basicamente na utilização de um ácido concentrado e um derivado de fenol (FUNAOKA; ABE, 1989; FUNAOKA et al., 1995; FUNAOKA, 1998; NAGAMATSU e FUNAOKA, 2003; FUNAOKA, 2013).

O lignocresol se torna uma alternativa para contornar tais problemáticas, pois possui alta capacidade de adsorver enzimas, se tornando um método promissor para a diminuição dos custos na produção de etanol 2G (FUNAOKA; ABE, 1989; FUNAOKA, 1998).

Dessa forma este trabalho procurou estudar a adsorção do lignocresol proveniente da lignina Kraft sobre  $\beta$ -glicosidases purificadas e celulasas de um dos principais coquetéis enzimáticos comerciais utilizados no processo de hidrólise do material lignocelulósico e verificar a capacidade de adsorção e funcionalidade dessas enzimas após a interação com o lignocresol.

## 2. Objetivos

Sintetizar uma solução de lignocresol, que possui alta afinidade com enzimas, a partir do liquor negro proveniente de *Pinus spp.* e promover uma adsorção enzimática entre o lignocresol e celulasas, visando a recuperação enzimática na produção de etanol 2G.

### 2.2 Objetivos específicos

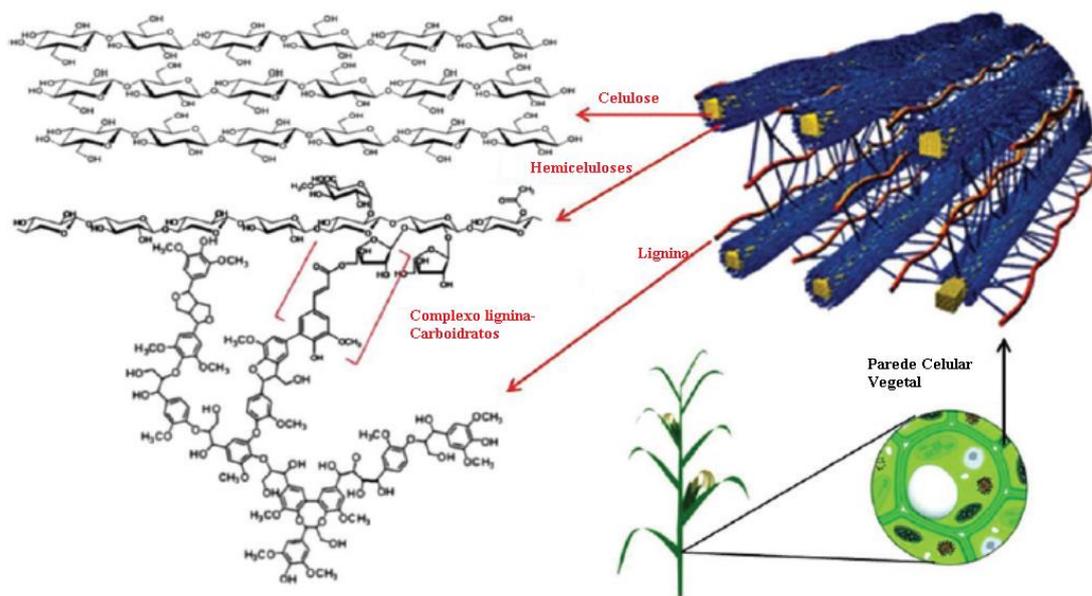
- Obter lignocresol através do método de separação de fases;
- Avaliar a interação entre o lignocresol e  $\beta$ -glicosidases (*TpBgl1* e *TpBgl3*) de *Thermotoga petrophila*;
- Avaliar a interação entre o lignocresol e do coquetel enzimático Cellic CTec3;
- Verificar possíveis diferenças na adsorção do lignocresol e de lignina não modificada com as  $\beta$ -glicosidases (*TpBgl1* e *TpBgl3*);
- Pesquisar possíveis diferenças na adsorção do lignocresol e de lignina não modificada e do coquetel enzimático Cellic CTec3;

- Avaliar possíveis efeitos inibitórios de glicose no meio reacional sobre a adsorção das  $\beta$ -glicosidases (*TpBgl1* e *TpBgl3*) no lignocresol;
- Avaliar a atividade enzimática do complexo lignocresol-  $\beta$ -glicosidases;
- Investigar a estabilidade do complexo lignocresol-celulases;
- Avaliar a sacarificação enzimática do complexo lignocresol-celulases.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1. Material lignocelulósico

Todo recurso renovável proveniente da matéria orgânica, vegetal ou animal é definido como biomassa, e é utilizada para produção de energia e produtos químicos.. A biomassa lignocelulósica consiste principalmente de celulose, hemiceluloses, lignina e algumas quantidades menores de pectina, cinzas, proteínas e extrativos (Figura 1). Porém a composição não é exata, já que depende do material botânico de origem, das condições de crescimento, da parte da planta escolhida, da idade de colheita, entre outras circunstâncias (RAGAUSKAS et al., 2014; SCHELLER; ULVSKOV,2010; SANTOS et al., 2012).



**Figura 1.** Esquema da composição do material lignocelulósico (Adaptado de Volynets et al.,2017)

A celulose é o principal constituinte do material lignocelulósico, é um polissacarídeo que consiste em uma cadeia linear de D-glicose ligada por ligações  $\beta$ - (1,4) -glicosídicas entre si. Fibras de celulose são ligadas umas às outras por de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (FENGEL; WEGENER,1989). Portanto, a celulose é insolúvel em água e a maioria dos solventes orgânicos (Figura 1) (CIOLACU et al.,2011).

Hemiceluloses, estão localizadas nas paredes celulares secundárias, são macromoléculas ramificadas heterogêneas contendo pentoses ( $\beta$ -D-xilose,  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose,  $\alpha$ -D galactose) e / ou ácidos urônicos (ácidos  $\alpha$ -D-glucurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e  $\alpha$ -D-galacturônico). Outros açúcares como ramnose e fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades, e, os grupos hidroxil dos açúcares podem ser substituídos por grupos acetil (XIAO et al., 2001), que são relativamente fáceis de hidrolisar por causa da sua estrutura amorfa e ramificada assim além de apresentar peso molecular mais baixo (Figura 1) (FENGEL& WEGENER,1989).

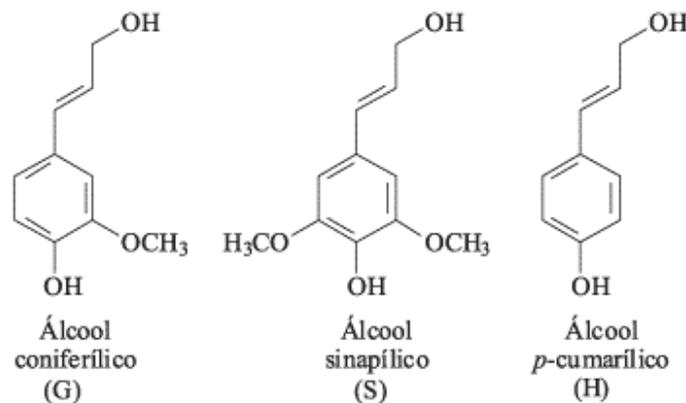
Lignina é uma macromolécula aromática sintetizada a partir de precursores fenilpropanóides (CHUNDAWAT et al.,2011). Geralmente, a lignina está distribuída junto com as hemiceluloses no espaço entre as microfibrilas de celulose em ambas as paredes celulares, primária e secundária, e na lamela média, para adesão celular (ERIKSSON & BERMEK, 2009). Essa estrutura aromática, muito estável, é um grande obstáculo para a hidrólise enzimática da lignocelulose (PRASAD et al., 2007; KO et al., 2009). A lignina forma um bloqueio de proteção em torno da celulose e da hemicelulose, protegendo esses polissacarídeos da degradação enzimática (DAWSON & BOOPATHY, 2007; LI et al., 2009).

Estudos recentes estão focando no uso de lignina para fins específicos. É possível ter uma variedade de produtos feitos com lignina, como por exemplo, na indústria de fertilizantes, na construção civil, que é utilizada como aditivos de concreto e na área médica. Essa macromolécula também é utilizada na indústria alimentícia. Sendo utilizada em embalagens de alimento de contato e nos tratamentos de couro, devido sua capacidade de retardar o crescimento bacteriano. (SANTOS, 2011; JOHNSON et al., 2005; TEN & VERMERRIS,2015).

### **3.2. Lignina**

Lignina é uma macromolécula tridimensional amorfa não polissacarídica encontrada associada com fibras de celulose e hemiceluloses na parede celular das plantas. A estrutura da lignina é formada por compostos de unidades de p-propilfenol, com subunidades metoxila no

anel aromático e unidas por ligações tridimensionais C-O-C e C-C. É formada por três diferentes precursores de monômeros fenólicos tais como, álcoois cumarílico (p-hidroxifenil “H”), coniferílico (guaiacil “G”) e sinapílico (siringil “S”) (LEWIS ;YAMAMOTO, 1990; SUN et al., 2003), como demonstrados na Figura 2.



**Figura 2.** Monômeros fenólicos (unidades de fenilpropeno) precursores da lignina. (Barbosa et al.,2008).

As ligninas podem se diferenciar de acordo com sua estrutura. Em coníferas, por exemplo, contém quase em seu total derivados de álcool coniferílico. A lignina de folhosas tem estrutura a partir dos álcoois coniferílico e sinapílico, e a lignina de gramíneas, apresenta os três precursores em sua estrutura (BURANOV& MAZZA, 2008; HENRIKSSON, 2009). Cada espécie tem seu tipo de lignina ou até mesmo dentro de uma mesma espécie pode ocorrer variação. Em estudos feitos com eucaliptos cultivados na Europa e no Brasil foram encontradas diferenças na constituição de suas ligninas, que pode ser explicado pelas diferenças climáticas e de solo, e pode ocorrer diferenças também pelo método de extração isolado das paredes celulares (MORAIS 1987, 1992).

A lignina possui diversas funções nos vegetais, entre elas proporciona resistência e rigidez na parede celular, protege as células da ação de enzimas hidrolíticas advindas de patógenos e saprófitos e de várias outras condições de estresse ambiental. Devido ao caráter hidrofóbico, as ligninas atuam no transporte interno de água, nutrientes e metabólitos por evitar a permeabilidade de água dos tecidos condutores do xilema (CONESA et al., 2002; ZHAO et al.,2012; SHARMA et al.,2012).

A lignina, apresenta também a capacidade adsorptiva de enzimas, sendo assim durante a hidrólise enzimática faz com que as celulasas se liguem a ela, expondo o seu núcleo hidrofóbico e assim as inativando, levando a um efeito denominado adsorção improdutiva, que ocorre entre estas enzimas e a estrutura aromática da lignina (ECKARD et al., 2013).

### 3.2.1 Adsorção improdutiva

A adsorção improdutiva é considerada um importante mecanismo, que prejudica o processo da degradação enzimática da celulose (LIU et al., 2016;). Estudos mostram a adsorção de celulasas em lignina isolada a partir de vários tipos de biomassa, como a palha de milho, por exemplo, que adsorve menos celulasas que a lignina de madeiras, tanto de coníferas quanto de folhosas. Isso se deve ao fato de que as ligninas podem se diferenciar pelos conteúdos de unidades G (guaiacila), S (siringila) e H (hidroxifenila) e assim apresentam diferentes capacidades de adsorção (KO et al., 2014; GUO et al., 2014).

Os principais mecanismos que causam esse efeito são as interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio (SAMMOND et al., 2014; TU et al., 2009; LAN et al., 2013; YARBROUGH et al., 2015). No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que várias interações entre os diferentes grupos químicos na lignina e nas enzimas podem estar ocorrendo simultaneamente e promovendo a adsorção (LIU et al., 2016; NAKAGAME et al., 2011; RAHIKAINEN et al., 2013).

Trabalhos realizados com celulasas produzidas por *T. reesei* mostram que estas enzimas são capazes de interagir com a superfície hidrofóbica da lignina pois possuem resíduos de aminoácidos hidrofóbicos expostos em sua superfície causando adsorção improdutiva das celulasas (PALONEN et al., 2004; REINIKAINEN et al., 1995).

Ko e colaboradores (2015) mostraram que as enzimas produzidas por *T. reesei* e *A. niger* demonstram comportamentos diferentes na adsorção pela lignina. A  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* adsorve menos que a  $\beta$ -glicosidase produzida por *T. reesei*. Os domínios de ligação a carboidratos (CBMs – *carbohydrate binding modules*) encontrados em algumas dessas enzimas, influenciam na adsorção improdutiva, por meio de três resíduos de tirosina alinhados (Y5, Y31, Y32), que são fundamentais para o pareamento de anéis de interação CBM-celulose (RAHIKAINEN et al., 2013; LINDER et al., 1995).

Para poder minimizar o efeito da lignina no processo de sacarificação, processos de pré – tratamento são utilizados. Esses métodos podem ser por meio físico, químico e biológico (HU et al., 2018). O pré-tratamento da biomassa tem como objetivo quebrar a ligação da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose. A eficiência de um pré-tratamento é definida por

vários pontos como: a redução do tamanho das partículas da biomassa, limitar a formação dos produtos da degradação que inibem o crescimento dos microrganismos fermentativos, minimizar a demanda de energia (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1999).

Porém, existem limitações já que em alguns métodos, ocorre o aumento de hidroxilas fenólicas que podem aumentar a capacidade adsorptiva da lignina residual (RAHIKAINEN et al., 2013).

Além dos processos de pré-tratamentos, outras alternativas estão sendo feitas como o uso de aditivos e/ou agentes bloqueadores de lignina (proteínas não-catalíticas, surfactantes, polímeros) na hidrólise enzimática com a finalidade de melhorar o rendimento do processo (FLORENCIO et al., 2016). No entanto, algumas estratégias são economicamente inviáveis para serem utilizados nas indústrias.

A lignina é um farto recurso natural com estruturas aromáticas que pode servir como material para a síntese de produtos químicos de alto valor, por isso uma melhor compreensão da sua estrutura e de métodos para sua valorização são necessários, recursos renováveis como a lignina são importantes para a sustentabilidade ambiental.

### **3.3 Enzimas**

Enzimas são de grande importância aos sistemas biológicos uma vez que são utilizadas como catalisadores de reações químicas específicas aumentando a velocidade de reações químicas sem alterar o equilíbrio e sem serem consumidas, além da não formação de produtos secundários e operam em soluções aquosas diluídas (tampões), em condições muito características de temperatura e pH (MARZZOCO et al., 1999).

As reações catalisadas por enzimas se dão em dois passos, sendo que no primeiro, a enzima se liga de forma reversível ao substrato, formando um complexo enzima-substrato, enquanto que na segunda etapa, ocorre a liberação do produto e a enzima fica livre para se ligar à outra molécula de substrato. A velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração de substrato (MARZZOCO et al., 1999).

As enzimas são de grande importância em usos industriais comerciais e possuem uma série de características que as tornam mais vantajosas quando comparadas a catálise química convencional. Dessa forma, vale ressaltar o alto grau de eficiência catalítica de uma enzima, a alta especificidade e seletividade. Essas características evitam formação de subprodutos indesejados gerando um aumento no grau de pureza do produto final. As enzimas, atuam em condições brandas de temperatura e pressão, e sua atividade pode ser regulada de acordo com as condições operacionais, enquanto os catalisadores químicos operam em condições críticas

(RODRIGUES, 2009). Além disso, enzimas podem ser selecionadas geneticamente e quimicamente modificadas para a melhoria de suas propriedades-chave: estabilidade, especificidade do substrato e atividade específica (ADRIO; DEMAIN, 2008; ADRIO; DEMAIN, 2005; LI et al., 2012).

As enzimas são utilizadas na fabricação de alimentos, nutrição animal, cosméticos, medicamentos, indústria têxtil, indústria de papel, produção de etanol 2G, entre outros (ADRIO; DEMAIN, 2005; LI et al., 2012).

### 3.3.1 *Celulases*

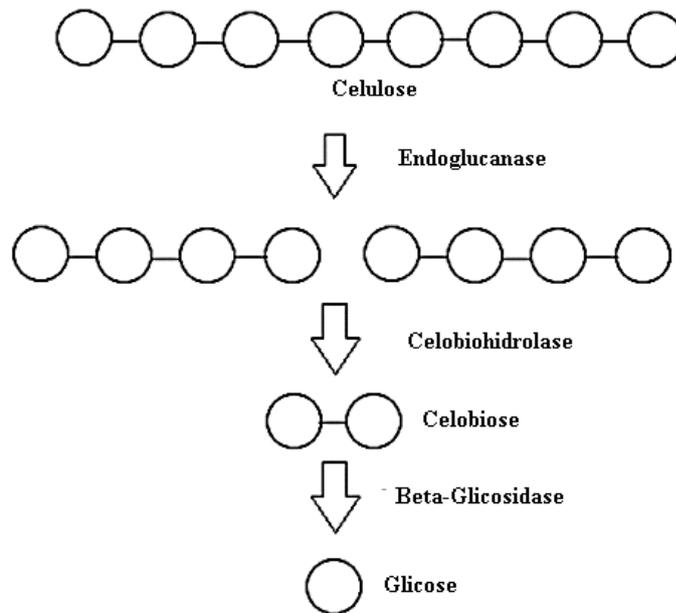
Celulases ou enzimas celulolíticas catalisam reações de forma específica e que agem em conjunto para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é a molécula de maior interesse industrial, devido à possibilidade de conversão em etanol (CASTRO & PEREIRA, 2010). O uso desses biocatalizadores é uma alternativa importante aos processos químicos convencionais, pois como possuem reações específicas, minimizam a geração de subprodutos indesejáveis, e como conseguem atividade catalítica em temperaturas amenas, reduzem os custos energéticos do processo (FLORENCIO et al., 2017).

A hidrólise da celulose ocorre pela ação das celulases que hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4-d-glucosídica na estrutura da celulose para liberar glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. O complexo enzimático mais estudado, inclui as endo-glucanases (EG; EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (CBH; EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidases (BGL; EC 3.2.1.21) (SRIVASTAVA, et al., 2018; RAWAT et al., 2014).

Endoglucanases hidrolisam ligações glicosídicas nas regiões amorfas da celulose gerando oligômeros de cadeia longa (extremidades não redutoras) para a ação de exoglucanases ou celobiohidrolases, que clivam a longa cadeia de oligossacarídeos resultantes da ação das endoglucanases em oligossacarídeos de cadeia curta. Existem dois tipos de exoglucanases, agindo unidirecionalmente nos oligômeros de cadeia longa das extremidades redutoras (E.C.3.2.1.176) ou não redutoras (E.C.3.2.1.91) liberando a celobiose, que posteriormente é hidrolisada pelas  $\beta$ -glicosidases em glicose (JUTURU; WU, 2014; FLORENCIO et al., 2017; SRIVASTAVA, et al., 2018). A ação dessas enzimas foi demonstrada na Figura 3.

Outro tipo de celulases chamado tipo oxidativo de celulases foi identificado, recentemente. Essa enzima despolimeriza a celulose por meio de reações de radicais livres (JUTURU; WU, 2014). Juntamente com as três principais celulases, algumas enzimas

acessórias, como as oxidases líticas, atuam juntamente com as endoglucanases liberando extremidades reductoras, a proteína Cbp21, por exemplo, produzida por *Streptomyces coelicolor*, age como uma enzima oxidativa e auxilia na despolimerização de celulose recalcitrante (JUTURU;WU, 2014;SARANRAJ et al.,2012 ; MEDIE et al.,2012).



**Figura 3.** Ação das celulases. A endoglucanase cliva aleatoriamente as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 no interior da celulose. Celobiohidrolases (exoglucanases) clivam tanto da extremidade redutora quanto da extremidade não redutora das cadeias de celulose, liberando celobiose que posteriormente será convertida em glicose pelas  $\beta$ -glicosidases (Adaptado de Akram, et al., 2018).

As celulases são classificadas como hidrolases glicosídicas (GHs) com base nas semelhanças de sequência de aminoácidos, estrutura e função da enzima do núcleo catalítico. Essas enzimas hidrolisam a ligação glicosídica entre 2 carboidratos ou entre 1 carboidrato e uma porção não-carboidrato (HENRISSAT et al., 1998). De acordo com a descrição do banco de dados de enzimas ativas em carboidratos (CAZy), endoglucanases pertencem às famílias GH (5–8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71,74, 81, 87, 124 e 128), as exoglucanases ou celobiohidrolases estão relacionadas às famílias GH (5-7 e 48) e  $\beta$ -glucosidases são encontradas nas famílias GH (1, 3, 4, 17, 30 e 116) (JUTURU;WU, 2014).

Geralmente, as celulases (endoglucanases e exoglucanases) são formadas por dois domínios diferentes, domínio catalítico e domínio de ligação à celulose (CBM -*carbohydrate-binding modules*). O CBM tem ligação com a adsorção, facilitando a hidrólise da celulose, aproximando o domínio catalítico do substrato insolúvel, permitindo o aumento da

concentração de enzima sobre a superfície do substrato sólido por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas. (GILKES et al., 1991; TOMME et al., 1995; LYND et al., 2002).

As endoglucanases aceleram o processo celulolítico atuando sinergicamente com a exoglucanase. A desconstrução de celulose é iniciada pelo ataque de endoglucanases no polímero de celulose de forma aleatória (DASHTBAN et al. 2010). Essas enzimas estão relacionadas com a família GH-5. Geralmente, seu sítio ativo consiste em um sulco aberto, ou em forma de fenda, que permite a arranjo da cadeia linear de celulose de forma aleatória (TOMAS-PEJÓ et al., 2009). A molécula do substrato, para se ligar de forma ativa ao sítio ativo da enzima, interage com vários subsítios (aproximadamente 7) por interações de hidrogênio ou empilhamento dos resíduos aromáticos com aminoácidos do sítio ativo (VLASENKO, et al., 2010).

Celobiohidrolases ou  $\beta$ -1,4-exoglucanase atuam de forma processual nas extremidades reductoras ou não reductoras de micro fibrilas de celulose. A cadeia de celulose terminal liga-se ao sítio ativo semelhante a um túnel da exoglucanase e processado convertido em cadeia mais curta. As exoglucanases facilitam a produção de glicose (glucano-hidrolases) ou celobiose (celobio-hidrolase) (RAMESHWAR, et al.,2017).

As  $\beta$ - glicosidades são responsáveis na regulação de todo o processo de hidrólise da celulose (SINGHANIA et al. 2013). Entre as enzimas que degradam a celulose, as  $\beta$ -glucosidases são essenciais para uma eficiente hidrólise da biomassa celulósica, uma vez que diminui a inibição das celobiohidrolases e endoglucanases pela redução da acumulação da celobiose (SØRENSEN, et al.,2013). Essas enzimas agem quebrando a ligação  $\beta$ 1,4, quando o grupo carboxil do resíduo conservado do sítio ativo, geralmente um ácido glutâmico, doa um próton para a ligação e o íon carbônio formado é estabilizado pelo resíduo do ácido aspártico. Essas enzimas agem nos resíduos de celodextrina e celobiose hidrolisando-os a glicose (LYND, et al,2002).

As celulases podem ser produzidas utilizando principalmente dois métodos: a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSm) (SINGHANIA et al.,2010).

Os dois processos apresentam vantagens e desvantagens, e a escolha de um dos dois depende do produto final desejado e o microrganismo utilizado. Das duas técnicas, a FSm é utilizada em grande parte dos processos industriais para produção de enzimas microbianas. Nessa técnica, os microrganismos são inoculados diretamente em meio nutriente líquido, o caldo de fermentação, que é uma mistura que favorece o desenvolvimento dos microrganismos.

Esse caldo contém água, que equivale de 90 a 99% da massa total, com nutrientes dissolvidos. As vantagens desse processo são relacionadas à instrumentação e controle dos parâmetros físico-químicos, como controle de temperatura, aeração, agitação e pH (RENGE et al.,2012). A *Novozymes*, empresa líder mundial em produção de enzimas, utiliza esse método para a obtenção de celulases. A *Dyadic*, é um exemplo, produz celulases pelos cultivos de *Myceliophthora thermophila* e *Trichoderma longibrachiatum* por este processo (HANSEN et al., 2015).

Já no processo de FES, o crescimento do microrganismo ocorre em substrato sólido, não possui água na forma livre, porém há umidade suficiente somente para conservação do metabolismo e desenvolvimento microbiano (PANDEY,1992;1996). As vantagens da FES, consistem em maior produtividade dos coquetéis enzimáticos, obtenção de enzimas com maior estabilidade de pH e temperatura e menor risco de inibição pelo produto e substrato (BARRIOS-GONZÁLEZ,2015; HOLKER; LENZ, 2005). Outra grande vantagem da FES é ser capaz de utilizar resíduos agroindustriais com o substratos sólidos, que garantem energia para o crescimento do microrganismo e a produção de enzima por servirem como fontes de carbono, sendo assim favorável ao meio ambiente (FARINAS, 2015).O bagaço de cana, por exemplo, está sendo utilizado como matéria-prima em diversos trabalhos que aplicam essa técnica (DELABONA et al.,2012; DELABONA et al.,2013; RODRIGUEZ-ZUNIGA et al.,2014).

Recentemente, foi desenvolvido um novo método de cultivo, chamado de fermentação sequencial (FSeq). Esse novo processo é a junção das vantagens dos processos de cultivo convencionais citados anteriormente. O processo da FSeq consiste no pré-cultivo, feito no estado sólido e posteriormente uma mudança para o estado submerso (CUNHA et al.,2012; CUNHA et al.,2015; FLORENCIO et al.,2015).

As celulases podem ser utilizadas em uma grande variedade de atividades industriais, sendo assim considerada de grande importância biotecnológica, essas enzimas subsidiam cerca de 20% do mercado global (CUNHA et al., 2012 ).As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente e cervejarias, indústria de polpa de papel entre outras (VILELA, 2013). Uma área de grande importância é o processo de produção de etanol 2G. A produção de etanol 2G consiste na hidrólise da celulose e da hemiceluloses (polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica) através da atividade enzimática de celulases, gerando assim açúcares como bioproduto final (LUCARINI et al.,2017).

Cada vez mais as empresas que desenvolvem tais enzimas tentam o máximo a redução de custos envolvendo a produção destas. Cellic CTec2 é um biocatalisador concentrado produzido

pela empresa *Novozymes* que na sua formulação contém um coquetel de enzimas com o objetivo de melhorar o desempenho e diminuir a dosagem requerida para a conversão da celulose em açúcares, entretanto, nem todas medidas são eficientes na redução de gastos (LUCARINI, et al., 2017).

Portanto, o que se busca principalmente pelas indústrias são estratégias para o aumento da produção das enzimas com substratos mais baratos e a produção com mais estabilidade para cada processo específico e maior atividade específica sobre substratos sólidos e também tecnologias de imobilização (MOREIRA, 2005; ADRIO e DEMAINE, 2005).

### **3. 4 Reciclagem enzimática**

Reciclagem enzimática na produção de etanol 2G tem sido testada há mais de 30 anos. Essa tecnologia visa à recuperação das atividades de enzimas adsorvidas na biomassa lignocelulósica para diminuir a quantidade utilizada durante o processo de hidrólise enzimática (MESA, et al.,2016).

Humbird e colaboradores (2011) relataram em seu estudo que o custo da enzima a partir de 2012 representa mais de 15% do preço mínimo de venda do etanol. Em trabalhos mais recentes mostram que uma enzima, produzida fora do local de produção, custa até 28% do preço do etanol. Porém a junção da produção da enzima na planta diminui os custos para menos de 10% (JOHNSON,2016).

Existem tecnologias com o objetivo de recuperação e reciclagem enzimática em bioprocessos. Inúmeras técnicas estão sendo estudadas e colocadas em prática para promover a reciclagem enzimática (SZÉPÁL et al., 2013; ECHEVARRÍA et al., 2012; DEKKER et al., 1986; QI et al., 2011; HUSTEDT, 1986). Embora tenha sido relatada uma variedade de métodos de reciclagem de enzimas ( Tabela 1), é difícil comparar as eficiências de reciclagem entre esses métodos pois diferentes substratos e/ou diferentes métodos e/ou condições de pré-tratamento foram utilizados.

Tabela 1 | Vantagens e desvantagens dos métodos de reciclagem enzimática

Opção de Reciclagem	Vantagens	Desvantagens
<b>Reciclagem em líquido</b>	Se o método for feito após a recuperação do produto, é possível evitar a reciclagem de açúcares e produtos. Possibilidade de retirar a água e componentes secundários (inibidores) enquanto se concentram enzimas.	Desnaturação enzimática, pode requerer etapa de dessorção, já que nem todas as enzimas estão presentes na fase líquida e é um processo de alto custo.
<b>Reciclagem enzimática em resíduos sólidos</b>	Grande parte das celulasas normalmente é adsorvida em sólidos residuais, os açúcares e outros potenciais inibidores enzimáticos em solução podem ser removidos por separação (e lavagem), e é uma tecnologia de separação simples.	Os resíduos de lignina acumulados, enzimas não ligadas a sólidos residuais são perdidas ou exigem uma etapa de recuperação separada.
<b>Reabsorção de enzimas em nova biomassa</b>	Reutilização de todas as enzimas com alta afinidade por celulose é uma vantagem desse método.	Porem nem todas as enzimas adsorvem a substrato fresco, conteúdo de lignina presente no substrato, processo de separação é complexo.
<b>Reciclagem de sólidos e líquido</b>	Enzimas adsorvidas e livres são recicladas. Técnica simples e de baixo custo para implementação.	Produtos (por exemplo, etanol) no líquido de reciclagem podem inibir a Hidrólise. Apenas parte de toda a pasta pode ser reciclada. Acumulação de lignina. Acumulação de inibidores de enzimas e microrganismos
<b>Imobilização de enzimas</b>	Fácil e seletiva recuperação das enzimas, maior estabilidade operacional contra diferentes condições como temperatura e pH, diminui problemas de acúmulo de compostos indesejados e melhora a estabilidade das enzimas	Alto custo. Diminuição da atividade devido a impedimento estérico e transferência de massa. Dificil garantir a boa imobilização de múltiplas enzimas

Adaptado de Jørgensen (2017)

Um processo de reciclagem eficiente da celulase dependeria de três principais condições: (1) uma celulase altamente estável, (2) uma alta eficiência de hidrólise e (3) bom controle sobre os processos de adsorção / dessorção do substrato (GOMES et al.,2015).

O processo de hidrólise enzimática envolve as celulases, as fibras lignocelulósicas e a fase líquida (GOMES et al.,2015). A quantidade relativa de celulases livres na fase líquida não é constante, ela muda ao longo da hidrólise. Na composição final do sistema terá a fração de enzima livre e disponível para ser reutilizada e a fração ligada ao sólido final, exigindo uma etapa adicional de dessorção (GOMES et al.,2015). Este processo depende fortemente sobre a afinidade de cada celulase para celulose e lignina (PRIBOWO et al. 2012), sobre a estrutura e composição do substrato (TU et al. 2007), e fatores ambientais (por exemplo, pH, presença de surfactantes) (SHANG et al. 2014; SEO et al. 2011).

Muitos estudos já demonstraram que diferentes celulases podem apresentar afinidades distintas com o substrato. Além disso, para uma determinada celulase, afinidades também podem ser encontradas para diferentes substratos (GOMES et al.,2015). Os domínios de ligação das celulases (CBM) presentes em exoglucanases e endoglucanases, como descrito anteriormente são muito importantes para o processo de reciclagem enzimática, pois auxiliam na adsorção das enzimas no substrato. Ishihara e colaboradores (1991), estudaram a ligação entre as celulases e material sem a presença de lignina. Foram observadas maior afinidade para exoglucanases, seguido por endoglucanases e, por fim,  $\beta$ -glucosidases.

Em uma análise eletroforética, foi verificado que diferentemente de endoglucanases, os níveis de  $\beta$ -glucosidase na fração líquida permaneceram constantes durante a hidrólise, sugerindo baixa adsorção ao substrato (TU et al.,2007).

Outro parâmetro importante é que a presença da lignina no meio influencia fração final de enzimas livres. Um estudo analisou as isotermas de Langmuir para a adsorção de celulases em dois substratos, a Avicel e um contendo lignina. Enquanto a máxima adsorção de celulases foi encontrada para Avicel ( $8\text{mg/g}_{\text{substrato}}$ ), o substrato contendo 46% de lignina a adsorção foi de  $160\text{mg/g}_{\text{substrato}}$ . Após 48h de hidrólise, o teor de proteína na fração líquida foi de 85% para o caso da Avicel, contrastando apenas com 30% para o substrato com 46% de lignina (LIU et al.,2002). Esses resultados sugerem uma clara influência da lignina na fração final de enzimas livres.

Como mostrado na tabela 1, técnicas de recuperação podem estar relacionadas à fração de enzimas presente na fase líquida, ou à fração de enzimas ligada na fase sólida (RODRIGUES et al., 2014).

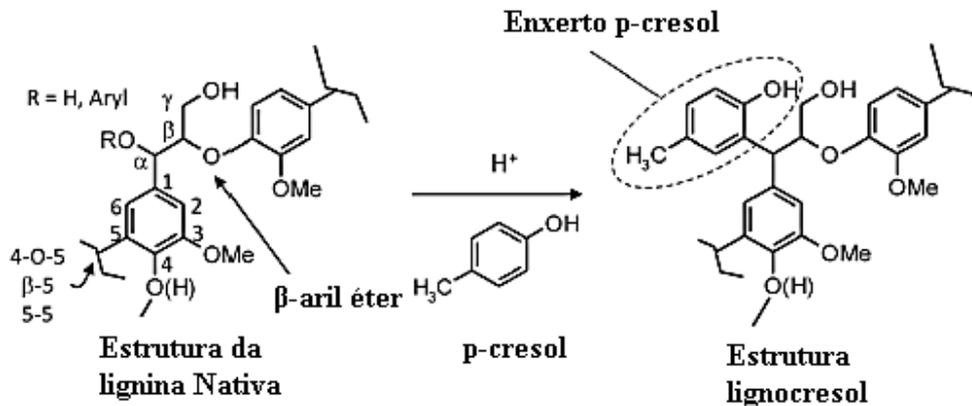
Sendo assim, para o desenvolvimento de tecnologias de reciclagem enzimática é muito importante o entendimento das possíveis interações entre enzimas e biomassa.

### 3.5 Lignocresol

Os materiais lignocelulósicos têm mostrado ao decorrer dos anos, interessantes características para sua utilização como matérias-primas para produção de material industrial. Esses materiais são renováveis, disponíveis em abundância no meio ambiente e de baixo custo, mostrando grande potencial de transformação para matérias-primas químicas ou combustíveis (MIKAME; FUNOAKA, 2006; PARISI, 1989).

O lignocresol surge como uma nova alternativa, para utilização da lignina em processos industriais. Esse composto foi desenvolvido por FUNOAKA; ABE (1989), sendo sintetizado pelo sistema de separação de fases (Figura 4), que consiste basicamente na utilização de um ácido concentrado e um derivado de fenol, o p-cresol (FUNAOKA et al., 1995; FUNAOKA, 1998; NAGAMATSU e FUNAOKA, 2003; FUNAOKA, 2013). Nesse sistema, a lignina hidrofóbica, carboidratos hidrofílicos e os componentes da parede celular, são submetidos individualmente a conversão estrutural e seletiva nas diferentes fases e separados quantitativamente à temperatura ambiente dentro de uma hora. Na fase orgânica, a lignina nativa é modificada pelo enxerto seletivo dos derivados fenólicos na posição benzilo (Figura 4). Por outro lado, os carboidratos são hidrolisados em poli, oligo e monossacarídeos solúveis em água.

O lignocresol preserva todas as características da lignina nativa, porém têm várias funções únicas, que as ligninas convencionais não possuem, apesar de possuir ligações químicas originais, por exemplo, altas propriedades fenólicas, nenhum sistema conjugado, uma coloração mais clara que a lignina, evidente ponto de transição de fase (*hardwood* 130°C, *softwood* 170°C), e alta capacidade de imobilização de enzima. (FUNAOKA; ABE, 1989; FUNAOKA, 1998).



**Figura 4.** Enxerto do derivado do fenol (p-cresol) na lignina pelo método de separação de fases (Adaptado de Nonaka et al., 2011).

Essas funções do lignocresol são atribuídos à hibridação seletiva de derivados fenólicos monoméricos nas posições C-1, levando a estruturas compostas principalmente de 1,1-bis (aril) propano (MIKAME; FUNOAKA,2006).

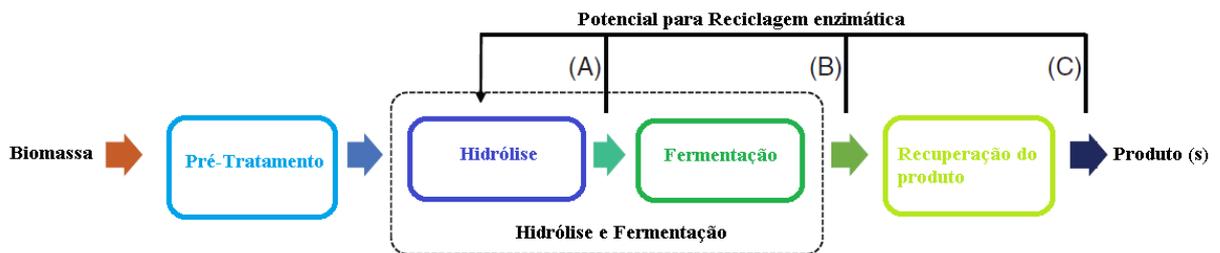
Mikame e Funaoka (2006) analisaram a morfologia molecular do lignofenol e das ligninas convencionais com o sistema SEC/MALLS, essa análise foi utilizada como método para obter o peso molecular absoluto dos polímeros. A morfologia molecular do lignocresol foi mais espalhado e linear, em comparação com as ligninas. Essa característica do lignocresol pode estar relacionado com a sua termoplaticidade que as ligninas não possuem.

A funcionalidade do lignocresol foi relatada em alguns estudos, como o de Nonaka e colaboradores (2014), que mostraram a eficiência na imobilização de celulases derivadas de *Trichoderma reesei*, e também o desempenho da hidrólise das enzimas imobilizadas que foi aproximadamente 80-90% e 30-50% em relação ao da celulase livre na hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) e papel de filtro, esses resultados mostram que a celulase fica ativa mesmo após a adsorção em lignocresol.

Analisando um processo comum de biorrefinaria, por exemplo, produção de etanol a partir do material lignocelulósico, normalmente existem três fluxos de processos que são possíveis fontes de enzimas em um processo de reciclagem; estes são (1) Reciclagem depois da hidrólise; (2) Reciclagem após a fermentação; (3) Reciclagem após a recuperação / separação

do produto. A hidrólise e fermentação podem estar em duas etapas consecutivas ou integradas em uma única etapa do processo (JØRGENSEN, 2017).

No presente trabalho propomos que o lignocresol pode ser utilizado entre a etapa de hidrólise enzimática e a fermentação para adsorver proteínas ou enzimas onde, posteriormente, passariam por um processo de separação, tornando possível a reutilização de ambos os compostos (Figura 5).



**Figura 5.** Fluxograma do processo de recuperação enzimática utilizando lignocresol

Adaptado de JØRGENSEN, 2017

As celulasas serão recuperadas pela exposição ao lignocresol, contando com sua alta capacidade de adsorção. O lignocresol será adicionado à suspensão livre de celulase sob condições de promoção de adsorção (por exemplo, agitação).

O lignocresol será incorporado ao processo na etapa de hidrólise enzimática e as celulasas estarão ligadas e ativas ao polímero de celulose, especificamente endoglucanases e exoglucanases. Considerando isso, a  $\beta$ -glicosidase é a enzima que fica disponível para a recuperação, pois seu substrato é solúvel, a celobiose. Sendo assim, o lignocresol é um novo método para recuperação de enzimas contudo mais especificamente de  $\beta$ -glicosidase na produção de etanol 2G. Porém, no presente trabalho, estudamos a interação com as outras enzimas do complexo enzimático. Já que além de ser utilizado na produção de etanol 2G, o composto pode ser utilizado em outros bioprocessos.

#### 4. Referências Bibliográficas

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A.L. Microbial cells and enzymes - A century of progress. In *Methods in Biotechnology. Microbial Enzymes and Biotransformations*, v. 17, p. 1–27, 2005.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A.L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Molecular Biotechnology*. v.38, p.38-41,2008.
- AKIMKULOVA, A., et al. Improving the enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by metal ion blocking of non-productive cellulase adsorption on lignin. *Bioresource Technology*.v. 208, p. 110-116,2016.
- AKRAM, F., et al. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. *Renewable Energy*.v.122, p. 225:238,2018.
- ALFTREN J., HOBLEY T.J. Covalent Immobilization of beta-Glucosidase on Magnetic Particles for Lignocellulose Hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* v.169, p.2076–2087,2013.
- ANTONYRAJ, C.A., HARIDAS, A. A lignin-derived sulphated carbon for acid catalyzed transformations of bio-derived sugars. *Catalysis Communication* v.104, p.101–105,2018.
- BARBOSA, L C. A. et al. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI CG/EM). *Quím. Nova, São Paulo* , v. 31, n. 8, p. 2035-2041,2008 .
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its moleculares basis and applications *Process Biochem*. v 47, p175-185,2012.
- BERLIN, A, et al. A rapid microassay to evaluate enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology Bioengineering*.v.93, p.880–886,2006.
- BHALLA A., et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*. v.9, p.751–759,2013
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, v. 28, n. 3, p. 237–259, 2008.

CAO, L., et al. Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-of-the-art review and future prospects. *Bioresource Technology*.v.269, p. 465–475,2018.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quimica Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHRISTOPHER, L. P. Lignin recovery and lignin-based products. *Integrated Forest Biorefineries - Challenges and Opportunities*. The Royal Society of Chemistry (RSC), v.8, p. 180-210, 2013.

CHEN, S.S., et al. Valorization of lignocellulosic fibres of paper waste into levulinic acid using solid and aqueous Brønsted acid. *Bioresource Technology*.v. 247, p.387–394,2018.

CHUNDAWAT, S.P.S., et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*.v.2, p.121–145,2011.

CIOLACU, D., et al. Amorphous cellulose–structure and characterization . *Cellulose Chemistry Technoogy*.v. 45p. 13–21,2011.

CONESA, A., et al. Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*.v. 93, p. 143–158,2002.

CUNHA, F. M., et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase *Bioresour. Technol.* v. 112, p. 270-274,2012.

CUNHA, F. M., et al. Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method *Biochem. Eng. J.* v. 97, p.32-39,2015.

DASHTBAN, M., et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison, *Critical Reviews in Biotechnology*. v.30, p.302–309,2010.

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1695-1699, 2007.

DELABONA, P. D., et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes *Biomass Bioenergy*. v. 37, p.243-250,2012.

DELABONA, P.D.S., et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes *Ind. Crops Prod.* v.42, p. 236,2013.

DEKKER, M., et al. Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles. *The Chemical Engineering Journal*, v. 33, p. 27-33, 1986.

DING, S., et al. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Current Opinion in Biotechnology.*v. 34, p. 242-250,2015.

DIENES, D., et al. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products.* v. 20, p. 11-21, 2004.

DUTTA, T., et al. Characterization of lignin streams during bionic liquid-based pretreatment from grass, hardwood, and softwood. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* v.6, p.3079–3090.,2018.

ECHAVARRÍA, A., et al. Enzyme recovery and effluents generated in the enzymatic elimination of clogging of pectin cake in filtration process. *Journal of Food Engineering*, v. 111, p. 52-56, 2012.

ECKARD, A.D., et al. A review of the role of amphiphiles in biomass to ethanol conversion. *Applied Sciences*, v. 3, p. 396-419, 2013.

EMERT G, BLOTKAMP PJ, Method for enzyme reutilization. US Patent No. US4220721 (1980).

ERIKSSON, K. E. L.; BERMEK, H. Lignin, Lignocellulose, Ligninase. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Third Edition (Moselio Schaechter, Editor), p. 373- 384.Oxford: Elsevier, 2009.

ES I, VIEIRA JD, AMARAL AC, Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 99,p.2065–2082,2015.

FARINAS, C. S.; Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable Sustainable Energy Rev .v 52,p. 179-188,2015.*

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions; Walter de Gruyter: Berlin, Germany, 1989.

FLORENCIO, C., et al. Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse Bioresour. Technol. v.221, p.172-180,2016.

FLORENCIO, C., et al. Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from Trichoderma Strains Appl.Biochem. Biotechnol. v. 175, p. 1389-1402,2015.

FLORENCIO, C; BADINO, A C.; Farinas, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. Quimica Nova, v. 1, p. 1, 2017.

FUNAOKA, M.; ABE, I. Rapid separation of wood into carbohydrate and lignin with concentrated acidphenol system. Tappi Journal, v. 72, p. 145-149, 1989.

FUNAOKA, M. New type of lignin-based network polymer with the structure-variable function composed of 1,1-diarylpropane units. Polymer International, v. 47, p. 277-290, 1998.

FUNAOKA, M, et al. Conversion of native lignin to a highly phenolic functional polymer and its separation from lignocellulosics. Biotechnology and Bioengineering, v. 46, p. 545-552, 1995.

FUNAOKA, M. Sequential transformation and utilization of natural network polymer "LIGNIN". Reactive and Functional Polymers, v. 73, p. 396-404, 2013.

GADHAVE, R.V., et al. Lignin-polyurethane based biodegradable foam. Open Journal of Polymer Chemistry.v. 8, p.1-10,2018.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. Biomassa and Bioenergy, v. 46, p. 70-78, 2012.

GALLAGHER, P. W. Energy production with biomass: what are the prospects? Choices: The Magazine of Food, Farm and Resource Issues, v. 21, n. 1, 2006.

GAN Q, ALLEN SJ, TAYLOR G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochem Eng J.* v. 12, p.223–229,2002.

GANDLA, M.L., et al., Analytical Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Conversion to Biofuels and Bio-Based Chemicals. *Energies* v., 11, 2936,2018.

GARCIA III A, et al. Cellulase Immobilization on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Characterization. *Biotechnol Bioeng* v.33, p.321–326,1989.

GARCIA-GALAN C., et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv Synth Catal* v.353, p.2885–2904, 2011.

GHATAK, H.R. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*,v. 15, p.4042-4052,2011.

GILKES, N. R., et al. Domains in Microbial 3-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families. *Microbiological Reviews*, v.55, p.303-315, 1991.

GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science*, v. 45, p. 820-831, 2005.

GROSSI, R. C. Estudo da reação de caustificação, Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2002.

GOMES, D., et al. Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? *Applied Microbiology Biotechnology*, v.99,p.4131–4143,2015.

GUO, F. et al., Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosics biomass and the underlying mechanism. *Biotechnology for Biofuels*, v.7, n. 38, 2014.

HAMADA, N.. J. W. MCCREADIE. Environmental factors associated with the distribution of *Simulium perflavum* (Diptera: Simuliidae) among streams in Brazilian Amazonia. *Hydrobiologia*, v.39, p.71–78, 1999.

HANSEN, G. H.; et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* v. 50, p. 1327-41,2015.

HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin. Wood chemistry and biotechnology. Berlin: de Gruyter, 2009.

HENRISSAT, B., et al. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. FEBS Lett. v.425, p.352–354,1998.

HIMMEL, M. E. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. Science. v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HEROLD, M., et al. Recovery of biologically active enzymes after HPLC separation. Biotechniques, v. 10, n. 5, p. 656-662, 1991.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? Curr. Opin. Microbiol.v. 8, p.301-306,2005.

HU, F; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. Bioenergy Research, v. 5, p. 1043-1066, 2012.

HU, J., et al. Kraft lignin biorefinery: A perspective. Bioresource Technology.v. 247, p. 1181–1183,2018.

HUMBIRD D, et al., Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol Dilute - Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. Technical Report NREL/TP-5100-47764: 1–147. National Renewable Energy Laboratory, Denver, CO, USA 2011.

HUSTEDT, H. Extractive enzyme recovery with simple recycling of phase forming chemicals. Biotechnology Letters, v. 8, n. 11, p. 791-796, 1986.

ISHIHARA M., et al., Adsorption and desorption of cellulase components during enzymatic hydrolysis of steamed shirakamba (*Betula platyphylla* Skatchev) wood. J Ferment Bioeng v.72, p.96–100,1991.

JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. Biofuels Bioprod Bioref v.10, p.164–174, 2016.

JØRGENSEN, H., PINELO, M. Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* v.11, p.150–167,2017.

JUTURU, V., WU, J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* v.33, p.188–203,2014.

KIM, Y., et al. Hydrolysis-determining substrate characteristics in liquid hot water pretreated hardwood. *Biotechnology and Bioengineering* v.112, p. 677–687,2015.

KIM, Y.,et al.Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnol. Prog.* v.25, p.340–348,2009.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D., et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering* v. 109, p.1083-7,2012

KO, J.K., et al. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* v.112, p. 252–262,2015

KO J. K. et al. Adsorption of Enzyme Onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, p. 447-456, 2015.

KO, J. K.,et al. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation process. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4374-4380, 2009.

KRUUS, K. ,et al. Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, major cellulosome component. *Journal of Microbiology.* v. 177 p. 6, 1641, 1995.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysis for industrial application. *Crit. Rev. Biotechnol.* v. 33, 365–378, 2013.

KUMAR, L.,et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour. Technol.* v.103, p.201-208,2012.

JORDAN J, et al. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *J Mol Catal B-Enzym* v.68, p.139–146, 2011.

JUTURU, V., Wu, J.C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.33, p188–203,2014.

LAI, C., et al. Enhanced enzymatic saccharification of corn stover by in situ modification of lignin with poly (ethylene glycol) ether during low temperature alkali pretreatment. *Bioresource Technology*.v. 244, p. 92-99,2017.

LAN, T.Q., et al. Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses Should be Conducted at Elevated pH 5.2–6.2. *Bioenergy Research*.v.6, p.476–485,2013.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 41, p. 455-496, 1990.

LEE, D.; et al. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 45, p. 328–336, 1995.

LIANG, W.; CAO, X. Preparation of a pH-sensitive polyacrylateamphiphilic copolymer and its application in cellulase immobilization. *Bioresour.Technol.*, v. 116, p. 140–146, 2012.

LI, H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3245-3251, 2009.

LI S.; et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 2, n. 3, 2012.

LINDER, M., et al. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Science*. v.4, p.1056-1064,1995.

LIU, G., et al. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous aspen plus modeling. *Bioprocess Biosyst. Eng.* V. 39, p.133-40,2016.

LIU, H.,et al. Toward a fundamental understanding of cellulase-lignin interactions in the whole slurry enzymatic saccharification process. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* v.10, p.648–663,2016.

LOU, et al. pH-Induced Lignin Surface Modification to Reduce Nonspecific Cellulase Binding and Enhance Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses. *ChemSusChem*.v. 6, p.919-927,2013

LU, Y., et al. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 98, p. 641–654, 2002.

LUCARINI, A.C., et al. Estudo da Hidrólise Enzimática da Palha da cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*. v. 03, p. 242–253,2017.

LUPOI JS. SMITH EA. Evaluation of Nanoparticle-Immobilized Cellulase for Improved Ethanol Yield in Simultaneous Saccharification and Fermentation Reactions. *Biotechnol Bioeng* v.108, p.2835–2843, 2011.

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

MAHMOOD, N, et al. Depolymerization of lignins and their applications for the preparation of polyols and rigid polyurethane foams: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*v. 60, p.317–329,2016.

MALMALI M., et al. Investigation of a submerged membrane reactor for continuous biomass hydrolysis. *Food Bioprod Process* v.96, p189–197, 2015.

MAO, X., et al. A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 81, p. 189–195, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. Guanabara Koogan, 1999.

MEDIE, F.M. et al. Genome analyses high light the diferente biological roles of cellulases. *Nat Ver Microbiol*. v. 10, p.227–34,2012.

MENDES, F. M., et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. *Biotechnology progress*, v. 27, n. 2, p. 395-410, 2011.

MENG, X.; RAGAUSKAS, J.A. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology*, v.27, p150-158,2014.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 108, p. 95-120, 2007.

MESA, L., et al. An approach to cellulase recovery from enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse with high lignin content. *Biocatalysis and Biotransformation* 2016.

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

MIKAME, K.; FUNAOKA, M. Polymer structure of lignophenol I - Structure and function of fractionated lignophenol. *Polymer Journal*, v. 6, p. 585-591, 2006.

MORAIS, S. A. L. Contribuição ao estudo químico de ligninas de *Eucalyptus grandis*. Belo Horizonte. 175p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFMG/ICEx, 1987.

MORAIS, S.A.L. Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: Isolamento, quantificação e análise estrutural. Belo Horizonte. 260p. Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICEx, 1992. 25

MONIRUZZAMAN, M., et al; Enzymatic hydrolysis of high-moisture corn fiber pretreated by AFEX and recovery and recycling of the enzyme complex. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 67, p. 113–126, 1997.

MOOD, S.H et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.v.27, p.77–93,2013.

MOREIRA, N. Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. *Scientific News online*, v. 168, p. 209-224, 2005.

MUBARAKAB, N.M., et al. Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.v. 107, p. 124-131,2014.

NAKAGAME, S. et al. The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4507-4517, 2011.

NAKAGAME, S. et al. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis *Biotechnol. Bioeng.* v.105, p871-879,2010.

NAGAMATSU, Y.; FUNAOKA, M. Design of recyclable matrixes from lignin-based polymers. *Green Chemistry*, v. 5, p. 595-601, 2003.

NAGAMATSU, Y.; FUNAOKA, M. Conversion and Separation Pattern of Lignocellulosic Carbohydrates through the Phase-separation System. *Polymer Journal*, v. 38, p. 694–702,2006.

NONAKA, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase on softwood lignin-based lignophenol. *J. Jap. Inst. Energy*, v. 90, n. 10, p. 977– 981, 2011.

NONAKA, H. et al. Separation of lignocresol from eucalyptus lignocresol-cellulase complex using organic solvents. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 657-659, 2013a.

NONAKA, H. et al. Behavior of lignin-binding cellulase in the presence of fresh cellulosic substrate. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 53-57, 2013b.

NONAKA, H. et al. Lignin isolated from steam-exploded eucalyptus wood chips by phase separation and its affinity to *Trichoderma reesei* cellulase. *Bioresource Technology*, v. 140, p. 431-434, 2013c.

NONAKA, H. et al. Enzymatic Hydrolysis of Carboxymethylcellulose and Filter Paper by Immobilized Cellulases on Lignophenols. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. v. 34, p.169-177, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Biobased Industrial Products, Biobased Industrial Products—Priorities for Research and Commercialization. National Academy Press, 1999.

OUYANG J, et al. Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. *Bioresour Technol* v.146, p.288–293,2013.

PALONEN, H. et al. Adsorption of trichoderma reesei cbh i and eg ii and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.* v. 107, p. 65-72,2004.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation; *Process Biochem.* v. 27, p. 109-117,1992.

PANDEY, A. Special issue on solid state fermentation- Introduction.*J. Sci. Ind. Res.* v. 55, p. 311,1996.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. *Adv. Biochem. Eng.* v.8 pp 53-87,1989

PARK, H. et al. Synthesis and characterization of enzyme-magnetic nanoparticle complexes: effect of size on activity and recovery. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, v. 83, p. 198–203, 2010.

PEREIRA, M.B. Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. 74f. (Dissertação de Mestrado) Goiânia: Instituto de Química. Universidade Federal de Goiás (UFG), GO. 2019.

PEREIRA, S. C. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, p. 44, 2015.

PRASAD, S. et al. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources Conservation and Recycling*, v. 50, p. 1-39, 2007.

PRIBOWO, A. et al. The adsorption and enzyme activity profiles of specific *Trichoderma reesei* cellulose/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover. *Enzyme Microb Technol* v.50:,p.95–203,2012.

QI, B. et al. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 2881-2889, 2011.

QIN, L. et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnology for Biofuels*.v.9,2016.

QING, Q. et al. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*.v101, p 9624-9630,2010.

RABELO, S. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 180f. (Dissertação de Mestrado) São Paulo: Escola Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP. 2007.

RAGAUSKAS, A.J. et al. Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. *Science*.v.344, p.1246843,2014.

RAHIKAINEN, J. et al. Inhibition effect of lignin during cellulose bioconversion: the effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresource technology*, v. 133, p. 270-278, 2013.

RAHIKAINEN, J. et al. Cellulase–lignin interactions—The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding *Enzyme Microb. Technol.*v.53, p.315-321, 2013.

RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 45, p. 193–207, 1994.

RAWAT R. et al. Generating fermentable sugars from rice straw using functionally active cellulolytic enzymes from *Aspergillus niger* HO. *Energy Fuels*. v. 28, p.5067–75,2014.

REINIKAINEN, T. et al. Effects of pH and high ionic strength on the adsorption and activity of native and mutated cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* *Proteins: Struct., Funct., Genet.* v. 22, p. 392-403,1995.

RENGE, V. C. et al. Enzyme synthesis by fermentation method: a review. *Appl. Microbiol.* v.2, p.585,2012.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F. et al. Use of Spectroscopic and Imaging Techniques to Evaluate Pretreated Sugarcane Bagasse as a Substrate for Cellulase Production Under Solid-State Fermentation *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 172, p.2348-2362,2014.

RODRIGUES, A. C., et al.,. Cellulase stability, adsorption/desorption profiles and recycling during successive cycles of hydrolysis and fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology* v. 156, p. 163–169, 2014.

RUIZ-DUEÑAS, F.J.; MARTÍNEZ, A.T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*, v. 2, n. 2, p. 164–177, 2009

SAMMOND, D. W. et al. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, pg. 20960-20969, 2014.

SANTIAGO,B.L.S.; RODRIGUES,A.F.Processing lignocellulosic biomass for ethanol production:A review.*The Journal of Engineering and Exact Science*, v3,p.1011-1022,2017.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para Produção de Etanol. *Química Nova*, v. 35, p 1004- 1010, 2012.

SARANRAJ, P. et al. Microbial celulasas and its applications:a review. *I J Biochem Biotech Sci*. v. 1, p.1–12,2012.

SCHELLER, H.V., ULVSKOR, P. Hemicellulose. *Review of Plant Biology* v. 61, p. 263-89, 2010.

SCHULTZ N. et al. Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology. *J Biotechnol* v.132, p.202–208, 2007.

SHANG Y. et al. Recycling cellulases by pH-triggered adsorption-desorption during the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* v.98, p.5765–5774,2014.

SHARMA, P.et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012.

Seo ,D-J, et al. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. *Adsorption* v.17,p.813–822,2011.

SHUAI, L. et al. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. *Bioresource technology*, v. 101, n. 9, p. 3106-14, 2010.

SINGHANIA, R. R.et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial celulasas. *Enzyme Microbiology Technology*. v.46 p.541. 2010.

SINGHANIA, R. R. et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*. v.127, p. 500-507,2013.

SØRENSEN, A., et al. Fungal  $\beta$ -glucosidases: abottleneck in industrial use of lignocellulosic materials, *Biomolecules*. v. 3, p.612–631,2013.

SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.v. 82, p.2379–2386,2018.

SUN, J. X. et al. Inhomogeneities in the Chemical Structure of Sugarcane. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, p. 6719-6725, 2003.

SZÉLPÁL, S.et al. Enzyme recovery by membrane separation method from waste products of the food industry. *Acta Technica Corviniensis – Bulletin of Engineering*, v. 6, n. 2, p. 149-154, 2013.

TAN, L.U.L.et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Can. J. Microbiology*, v. 33, p. 689-692, 1987.

TEN, E.; VERMERRIS, W. Recent developments in polymers derived from industrial lignin. *Journal of Applied Polymer Science*, v.132,p.42069-42081,2015.

TOMÁS-PEJÓ E, et al. Effect of different cellulase dosage on cell viability and ethanol production by *Kluyveromeces marxianus* in SSF process. *Bioresour Technol*. v. 100, p.890–895,2009.

TOMME, P.et al Comparison of a Fungal (Family I) and Bacterial (Family II) Cellulose-Binding Domain. *Journal of Bacteriology*, v.177, p. 4356 – 4363, 1995.

TU, M., et al. Adsorption of Cellulase on Cellulolytic Enzyme Lignin from Lodgepole Pine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.57, p 7771–7778,2009.

TU, M.,et al. Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine.*Biotechnol Progr* v23p.1130–1137,2007.

TU, M. et al. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol Prog.* v23, p.398–406, 2007.

UNGUREAN, M. et al. Cellulase immobilized by sol–gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v. 36, p. 1327–1338, 2013.

União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA). Disponível em: <http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/etanol/>. 2017.

VIEIRA, M.F., et al.  $\beta$ -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 69, p. 47–53, 2011.

VILELA, E, D, S.; Análise da produção de celulases e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces* sp. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2013.

VLASENKO, E., et al. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. *Bioresource Technology.* v.101, p. 2405-2411, 2010.

VOLYNETS, B., et al. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing *Green Process Synth.*, v.6, p.1-22, 2017.

WEISS N, et al, Enzymatic lignocellulose hydrolysis: Improved cellulase productivity by insoluble solids recycling. *Biotechnol Biofuel* v.6, p.1–14 2013.

XIAO, B.; SUN, X.F.; SUN, R.C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation Stability.* v 74, p 307–319, 2001.

YANG, W., et al. Valorization of acid isolated high yield lignin nanoparticles as innovative antioxidant/antimicrobial organic materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* v.6, p.3502–3514, 2018.

YANG J, et al. Three-stage hydrolysis to enhance enzymatic saccharification of steam-exploded corn stover. *Bioresour Technol* v.101, p.4930–4935, 2010.

YARBROUGH, J. M. et al. New perspective on glycoside hydrolase binding to lignin from pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, n. 214, 2015.

YOUNAS, R., et al. Lactic acid production from rice straw in alkaline hydrothermal conditions in presence of nio nanoplates. *Catalysis Today*.v. 274, p. 40–48,2016.

YOON, L. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*.v, 67, p. 319-338,2014.

ZHAO, X.et al. Biomass recalcitrance. Part I: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioprod. Biorefin*, v. 6, p. 465–482,2012.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource technology*, v. 101, n. 13, p. 4992-5002, 2010

## **Capítulo 2**

Capacidade de adsorção de  $\beta$ -glicosidasas em lignocresol visando reciclagem enzimática.

## Resumo

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas com um grande potencial, por isso, são utilizadas para diversos processos industriais, incluindo a produção de etanol 2G. As  $\beta$ -glicosidases são fundamentais para a hidrólise eficaz da celulose, essas enzimas são responsáveis pela liberação de moléculas de glicose, que é o produto final da hidrólise. Além disso, a atividade  $\beta$ -glicosídica potencializa a ação sinérgica das outras celulases, incrementando o rendimento do produto final e também diminui a concentração de celobiose que é um inibidor do complexo celulolítico. Este estudo apresenta o processo de adsorção de duas  $\beta$ -glicosidases de *Thermotoga petrophila*, pertencentes às famílias 1 e 3 (*TpBgl1* e *TpBgl3*), separadamente, para formar um complexo de enzima lignocresol. A síntese de lignocresol, oriundo da lignina Kraft de *Pinus spp.*, foi realizada pela adaptação à metodologia do sistema de separação de fases que consiste na utilização de ácido sulfúrico 72% e um derivado de fenol (p-Cresol). Para obtenção do complexo, foram realizadas duas suspensões de lignocresol em tampão citrato de sódio (50 mM), ambas com concentração fixa 10 mg/mL. Diferentes concentrações enzimáticas (0,1-1,0 mg/mL) de  $\beta$ -glicosidases da família 1 e 3 (*TpBgl1* e *TpBgl3*, respectivamente), foram colocadas à interação (ensaios em pH 6,0 para *TpBgl1* e pH 4,0 para *TpBgl3*). Interações com lignina Kraft de *Pinus spp.* também foram realizadas nas mesmas condições para posterior comparação. A validação da adsorção foi realizada através da quantificação pelo método de Bradford. Os resultados encontrados demonstram grande adsorção (100-90%) do lignocresol para com *TpBgl1* e *TpBgl3*, em concentrações inferiores à 0,25 e 0,40 mg/mL, respectivamente. Ensaios de adsorção utilizando somente a lignina apresentaram resultados muito inferiores aos de lignocresol, comparados também em concentrações inferiores como demonstradas anteriormente, sendo ausente adsorção de lignina à *TpBgl1* e adsorção de lignina à *TpBgl3* de 70-50%. Os ensaios de ELS, demonstraram que lignocresol e lignina apresentam potencial-zeta na faixa de pH 4-7. Vale ressaltar que, entre o pH 5-7, o lignocresol apresenta valores maiores negativamente se comparado à lignina. Nossos resultados mostram que o lignocresol mantém maior capacidade de adsorção para as  $\beta$ -glicosidases do que a lignina. Essa capacidade pode ser explicada tanto pela sua grande hidrofobicidade e também por características eletrostáticas. Portanto, todos esses resultados demonstram boa adsorção do lignocresol às enzimas, demonstrando potencial para reciclagem enzimática.

**Palavras chave:** Lignina, Lignocresol,  $\beta$ -glicosidase, adsorção

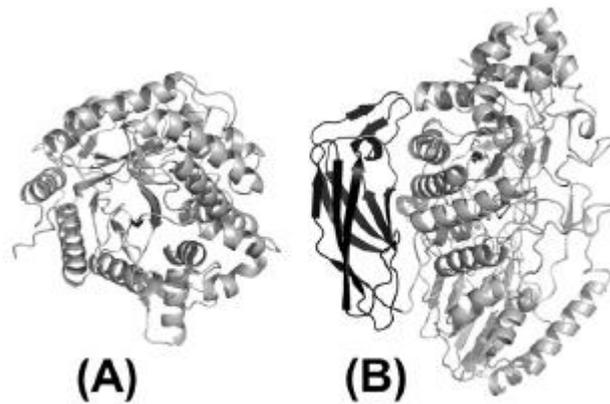
## 1. Introdução

As  $\beta$ -glicosidases (3.2.1.21) são enzimas que desempenham um papel importante na eficiência da hidrólise do material vegetal, pois, hidrolisam a celobiose à glicose que é o produto desse processo. Além disso são essenciais no sistema celulolítico, pois, trabalham sinergicamente otimizando a ação de outras celulases, aumentando o rendimento do processo, uma vez que evita a inibição de outras enzimas por celobiose acumulada (LIMA et al., 2013; KOROTKOVA et al.,2009).

Essas enzimas podem agir por dois modos que originam em retenção da rede ou inversão da configuração anomérica. A estereoquímica da catálise se deve ao arranjo espacial dos grupos catalíticos no sítio ativo da enzima. A hidrólise do glicosídeo normalmente necessita da presença de dois grupos catalíticos, que geralmente são resíduos de aspartato ou glutamato (HENRISSAT, , & DAVIES, 1997).

Sua classificação é baseada nas especificidades de substrato. São enzimas que atuam hidrolisando ligações O ou S-glicosídicas (HENRISSAT E BAIROCH, 1993;1996). A classificação também pode ser feita com base em semelhanças sequenciais (classificação no CAZy). Atualmente, a versão deste sistema contém 156 famílias, sendo GH1 e GH3 as mais interessantes para a biotecnologia (RADICCHI, 2019).

Normalmente, a família GH1 abrange as  $\beta$ -glicosidases de origem bacteriana, de plantas e mamíferos (HARNPICHARNCHAI et al., 2009). Possuem uma estrutura comum do tipo barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, no qual o sítio ativo está localizado na porção C terminal do barril (Figura 1-A) (COLUSSI et al.,2015; CAIRNS et al.,2010). A família GH3 estão inseridas as  $\beta$ -glicosidases de origem fúngica, bacteriana e vegetal e possuem uma estrutura em três domínios distintos (Figura 1-B) (HARNPICHARNCHAI et al., 2009; POZZO et al.,2010; LIMA et al.,2013).



**Figura 1.** Modelos tridimensionais das  $\beta$ -glucosidases de *Thermotoga petrophila*. (A) -Glucosidase GH1 de *T. petrophila* (TpBGL1). (B) -Glucosidase GH3 de *T. petrophila* (TpBGL3). (Adaptado de DA SILVA et al.,2015).

Embora estas enzimas estejam presentes em muitas aplicações industriais, o alto custo de sua aquisição torna os processos enzimáticos caros. Nesse contexto, a recuperação enzimática se torna um método mais econômico devido à possibilidade de reutilização dessas enzimas no processo de produção de etanol 2G.

Os componentes lignocelulósicos possuem promissoras características para seu uso como matéria-prima porque são renováveis, disponíveis em abundância no ambiente e relativamente de baixo custo (MIKAME & FUNAOKA,2006).

O lignocresol é um composto derivado da lignina, que aparece como uma alternativa para uma nova utilização dessa macromolécula. O lignocresol foi desenvolvido por Funaoka & Abe (1989), e é sintetizado a partir de lignina usando o sistema de separação de fases, que consiste principalmente no uso de um ácido concentrado e um derivado de fenol, p-cresol (FUNAOKA & ABE, 1989; NAGAMATSU & FUNAOKA,2003; FUNAOKA,1998; FUNAOKA,2013).

O lignocresol possui alta capacidade de imobilização de enzimas, devido às regiões hidrofóbicas da molécula (NAGAMATSU & FUNAOKA,2003). Esta característica é de grande importância econômica, uma vez que pode ser usada para a reciclagem de  $\beta$ -glucosidases presentes na fração solúvel no processo de hidrólise na produção de etanol 2G. Sendo assim, é uma alternativa de recuperação muito similar à imobilização, contudo, substituindo-se ligações covalentes entre suporte-enzima por interações físico-químicas, as quais podem facilitar processos de recuperação (readsorção), manutenção da longevidade da atividade enzimática, diminuir problemáticas de impedimento de sítio catalítico, entre outros.

Com base nessas considerações, o objetivo desse trabalho foi a síntese do lignocresol para promover adsorção enzimática entre esse composto e  $\beta$ -glucosidases de *Thermotoga*

*petrophila* e o desenvolvimento de um complexo lignocresol-enzima, possibilitando a reciclagem de enzimas na produção de etanol 2G.

## 2. Metodologia

### 2.1 Enzimas

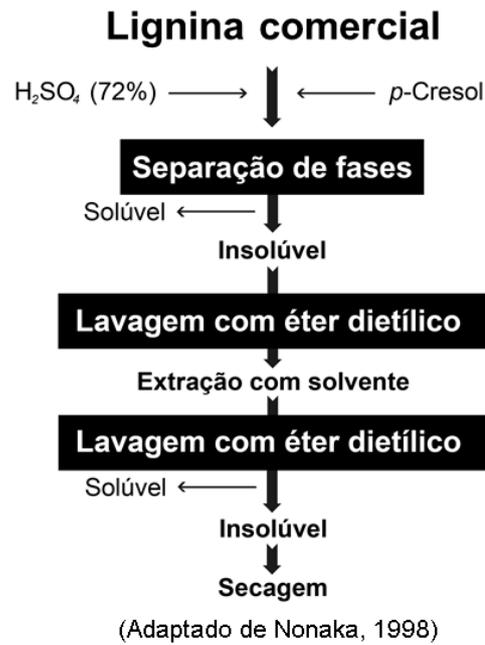
As enzimas de *Thermotoga petrophila*, *TpBgl1* e *TpBgl3*, foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Wanius Garcia da Universidade Federal do ABC (UFABC).

### 2.2 Síntese de lignocresol

Para a síntese do lignocresol será utilizada a metodologia do sistema de separação de fases, descrita anteriormente por Funaoka (1998). 1 g de lignina do tipo Indulin AT comercial (LKI) extraída a partir do liquor residual do processo Kraft em *Pinus sp.*, cedida gentilmente pela empresa MWV (*MeadWestvaco Corporation*), foi colocada em um frasco de reação. 10 mL de *p*-Cresol (10 mL/g de lignina) foram adicionados em leve agitação com a mão por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 20 mL de ácido sulfúrico 72% (20 mL/g de lignina) sob agitação vigorosa por 1 hora. Todo o volume presente no frasco fora transferido a um tubo *falcon* de 50 mL para centrifugação (4000 rpm) da amostra (1ª centrifugação) por 20 min à temperatura ambiente (25± 2 °C).

O sobrenadante formado fora retirado do tipo falcon e pipetado gota a gota em um volume de 200 mL de éter etílico frio sob vigorosa agitação (utilizado para remoção do ácido e parte do *p*-cresol). O precipitado aquoso formado foi recuperado por centrifugação (2ª centrifugação) à 5°C (4000 rpm) por 20 min e o sobrenadante descartado. O lignocresol presente no precipitado foi extraído com 80 mL de acetona e o volume da solução será reduzida à, aproximadamente, 10 mL com auxílio de um Rotaevaporador (Fisatom modelo 804) à 40°C e rotação de 150 rpm.

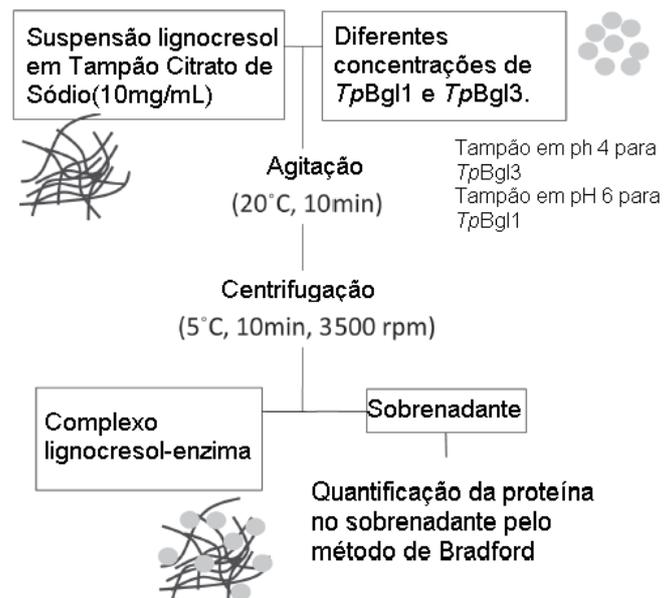
Após redução, a solução fora, novamente, pipetada gota a gota em 200 mL de éter etílico frio sob vigorosa agitação e a amostra centrifugada (3ª centrifugação) por 20 minutos a temperatura ambiente (4000 rpm). O sobrenadante será descartado e o *pellet* de lignocresol será seco em estufa à 50°C por 3 horas. Na figura 2 mostra o esquema do processo de obtenção do lignocresol.



**Figura 2.** Esquema do processo de obtenção do lignocresol.

### 2.3 Formação do complexo lignocresol-enzima

Esta metodologia consiste basicamente na promoção da interação e, posteriormente, adsorção entre  $\beta$ -glicosidase da família GH1 e GH3 de *Thermotoga petrophila* (*TpBgl1* e *TpBgl3*) e uma suspensão de lignocresol formada (Figura 2).



**Figura 3.** Fluxograma do processo de adsorção (Adaptado de Nonaka et al., 2011)

Para a formação da suspensão ( $\approx 20$  mg/mL iniciais), foram pesados 30 mg de lignocresol seco e adicionados 1500  $\mu$ L de tampão citrato de sódio à 50 mM em pH 6,0 e pH 4, segundo Cota et. al. (2015), *TpBgl1* tem uma atividade ótima dentro do intervalo de pH de 6-7, enquanto *TpBGL3* tem atividade ótima em torno de pH 4.0. A amostra foi colocada em um sonicador (Sharp UT-205S, 200 W) com aquecimento durante 1 hora. Diferentes diluições iniciais em tampão citrato de sódio (mesmas condições) de *TpBgl1* e *TpBgl3* (0.06–1.6 e 0.2–0.5 mg/mL, respectivamente) foram realizadas em diferentes microtubos, estabelecendo um volume final de 160  $\mu$ L. Por fim, para promover a interação entre ambos, 160  $\mu$ L da suspensão de lignocresol após agitação vigorosa, foram adicionados a cada diluição. Sendo assim, garantiu-se uma reação final de 10 mg/mL de lignocresol constante em todas as amostras e concentração enzimática reduzida à metade em todos os tubos pois, desta maneira, seria possível analisar até que ponto de concentração de *TpBgl1* e *TpBgl3* o lignocresol seria capaz de adsorver 100% à enzima.

Todas as amostras foram então levadas a um agitador por 20 min à temperatura ambiente pois, segundo Nonaka e colaboradores (2011), a adsorção entre lignocresol e enzima atinge equilíbrio após 10 min de interação. Em seguida, estas foram centrifugadas à 5°C por 10 min à 10000 rpm para que houvesse a separação entre o complexo lignocresol-enzima recém-formado e o restante enzimático dissolvido no sobrenadante, bem como, para permitir a clarificação das amostras para análises colorimétricas futuras. Interações com lignina Kraft de *Pinus spp.* também foram realizadas nas mesmas condições para posterior comparação.

#### 2.4 Quantificação enzimática por Bradford

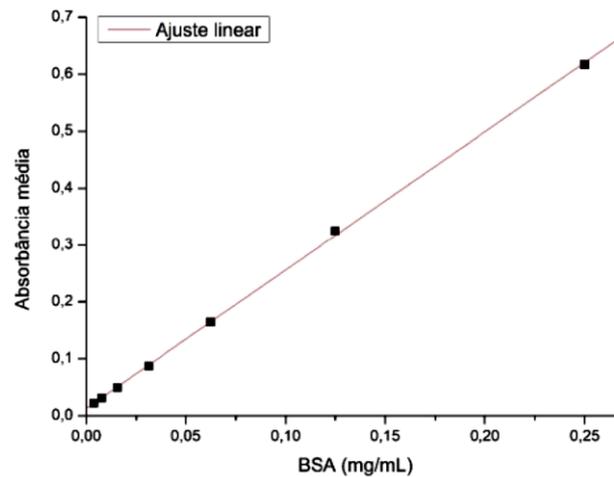
Para aplicação da metodologia descrita por Bradford (1976), fora necessário a construção de uma curva padrão relacionando a concentração em mg/mL da proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*), comumente utilizada, para com absorbâncias lidas. Sendo assim, em triplicata, preparou-se uma solução mãe de BSA na concentração de 1 mg/mL para a realização de diluições seriadas (tabela 1). Em um microtubo foram adicionados 100  $\mu$ L de cada uma das diluições e por fim 1000  $\mu$ L de corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (corante reagente Bradford feito no laboratório). Para o branco, 1000  $\mu$ L de reagente foram misturados em 100  $\mu$ L de água milli-Q. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm.

Portanto, para quantificação da *TpBgl1* e *TpBgl3* residual diluída no sobrenadante da amostra final (obtida pela metodologia descrita no item anterior) foram adicionados 100  $\mu$ L do sobrenadante e 1000  $\mu$ L de reagente. Para o branco fora utilizado 100  $\mu$ L de água milli-Q e

1000  $\mu$ L de reagente A curva padrão para o método de Bradford estão demonstrados na Tabela 1. A partir destes dados, fora possível aplicar um ajuste linear aos dados plotados (Figura 7) e criar uma equação da reta (Equação 1), utilizada posteriormente para a quantificação enzimática. Os pontos de concentração 1,0 e 0,5 mg/mL de BSA foram excluídos devidos aos valores de absorbância maiores que 1,0.

**Tabela 1.** Absorbâncias para concentrações de BSA (mg/mL).

<b>BSA (mg/mL)</b>	<b>Abs.<sup>1</sup></b>	<b>Abs.<sup>2</sup></b>	<b>Abs.<sup>3</sup></b>	<b>Média</b>
<b>1,0</b>	1,643	1,663	1,651	1,652 $\pm$ 0,010
<b>0,5</b>	1,148	1,105	1,160	1,138 $\pm$ 0,023
<b>0,25</b>	0,597	0,610	0,644	0,617 $\pm$ 0,019
<b>0,12</b>	0,315	0,331	0,330	0,325 $\pm$ 0,007
<b>0,06</b>	0,166	0,167	0,161	0,165 $\pm$ 0,002
<b>0,03</b>	0,089	0,090	0,083	0,087 $\pm$ 0,003
<b>0,015</b>	0,050	0,056	0,043	0,050 $\pm$ 0,005
<b>0,008</b>	0,032	0,034	0,028	0,031 $\pm$ 0,002
<b>0,004</b>	0,025	0,022	0,020	0,022 $\pm$ 0,002



**Figura 4.** Ajuste linear aos pontos de absorbância encontrados para concentrações de BSA ( $R^2$  ajustado de 0,99962).

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \left(\frac{\text{Abs} - 0,034060}{22065}\right) FD$$

Na Equação 2, o termo *FD* pode ser descrito como fator de diluição, o qual pode ser acrescentado caso haja alguma diluição no protocolo. *Abs* é descrito como a absorbância, variável a qual se inserem os valores de absorbância experimentais.

### 2.5 Adsorção de $\beta$ -glicosidases em lignocresol em meio rico em glicose

Os ensaios de adsorção simulando um meio na presença de hidrolisados foram feitos com o complexo lignocresol-enzimas com o objetivo de verificar se a presença de glicose no meio afeta a adsorção. A concentração final das enzimas *TpBgl1* e *TpBgl3* no complexo foi de 0,2 mg / mL. Os experimentos foram feitos conforme descrito na seção 2.3 com a adição de uma solução de glicose + CMC em diferentes concentrações (4 mg / mL de glicose + 0,1% de CMC, 10x diluído). A concentração de enzima residual no sobrenadante após a centrifugação foi medido pelo método de Bradford.

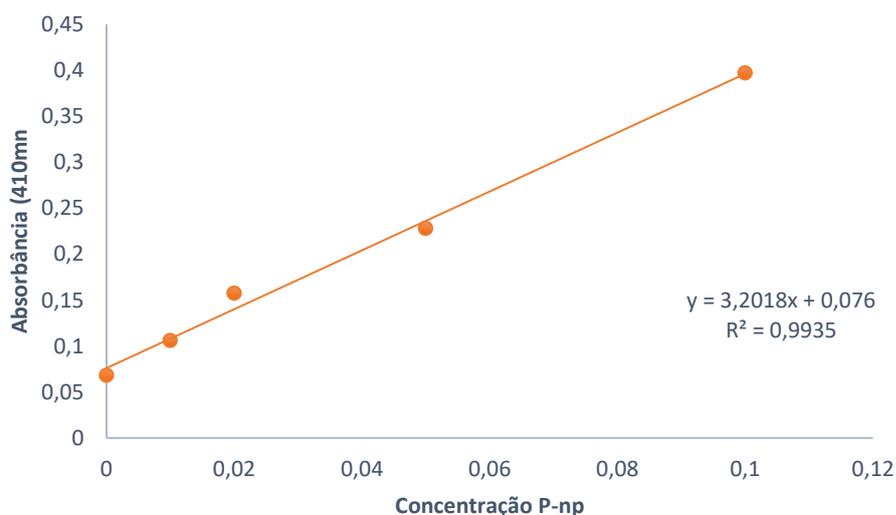
### 2.6 Atividade de $\beta$ -glicosidases após formação do complexo

Após a adsorção enzimática no lignocresol, o sobrenadante foi cuidadosamente removido utilizando uma pipeta. O ensaio enzimático para a atividade da  $\beta$ -glucosidase adsorvida em lignocresol foi feito utilizando o pellet que foi misturado com 50  $\mu$ l de solução tampão ajustada a diferentes de pH (pH 6 para *TpBgl1* e pH 4 para *TpBgl3*) e 250  $\mu$ l de 4-

nitrofenil- $\beta$ -Dglucopiranosido 2 mM (pNPG) que foi usado como substrato. Após incubação a 50 ° C durante 15 min, a reação foi interrompida pela adição de 1000  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M e a liberação de *p*-nitrofenol foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm utilizando um leitor de microplacas. Uma curva padrão baseada na relação entre concentração de *p*-nitrophenol (mM) e absorvância fornecida foi construída. A curva padrão foi preparada segundo a tabela 2.

**Tabela 2.** Diluições para o preparo da curva analítica padrão

Diluição	1	2	3	4	5
Substrato	400	400	400	400	400
2mM $\rho$ -NP	0	10	20	50	100
Tampão ( $\mu$ L)	100	90	80	50	0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)	1	1	1	1	1
$\rho$ -NP ( $\mu$ mole)	0	0.02	0.04	0.10	0.2



**Figura 5.** Curva padrão baseada na relação entre concentração de *p*-nitrophenol (mM) e absorvância.

Para o cálculo de atividade enzimática, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar  $\mu$ mole de nitrofenol por minuto de reação sob condições especificadas. Como na equação 2:

$$\text{Atividade enzimática IU/mL} = (\rho\text{-NP gerado}/0.5/15) \times \text{FD} \quad (\text{Eq 2})$$

## 2.7 Análise de Potencial zeta

Medidas de espalhamento de luz eletroforético (ELS) foram usadas para determinar o potencial zeta médio ( $\zeta$ ) de lignocresol e lignina, e foram coletados usando um Zetasizer Nano-ZS a 20 ° C (SQUINA, et al., 2009). Neste estudo, o potencial zeta foi medido para preparações de lignocresol e lignina (a 20 ° C) em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado aos diferentes valores de pH. Este instrumento mede a mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ) e converte o valor para um potencial (mV) através da equação de Henry:  $\mu_e = [2\varepsilon\zeta F(\kappa a)] / 3\eta$ , onde  $\varepsilon$  é a constante dielétrica da água e  $\eta$  é a viscosidade. Além disso,  $F(\kappa a)$  é a função de Henry, calculada pela aproximação de Smoluchowski  $F(\kappa a) = 1,5$ . O ponto isoelétrico é dado pelo valor de pH no qual o potencial zeta é aproximadamente zero. O conhecimento da mobilidade eletroforética permite calcular o número médio de cargas por molécula ( $N_c$ ) da relação de Lorenz-Stokes  $N_c = \frac{6\pi\eta}{e} R_s\mu$ , onde  $\mu_e$  é expresso em  $\mu\text{m cm s}^{-1} \text{V}^{-1}$  e o valor na denominador corresponde à carga elementar ( $e = 1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$ ) (SQUINA, et al., 2009).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Síntese do Lignocresol

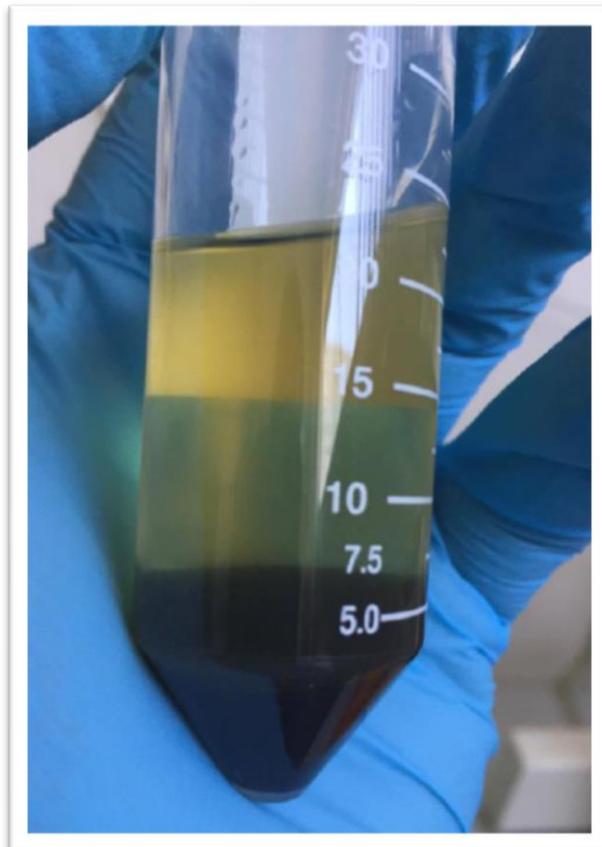
As figuras a seguir representam fases da produção do lignocresol a partir da lignina de *Pinus sp.* A metodologia descrita consiste basicamente na aplicação de um derivado de fenol (p-Cresol) e um ácido concentrado (ácido sulfúrico, 72%) onde, o primeiro realiza a solvatação da lignina e o segundo promove separação de fases em aquosa, composta por carboidratos residuais e orgânica, composta pelos derivados de lignofenol, os quais resultarão no lignocresol.

Inicialmente à produção, pode ser observado que com a adição do derivado fenol e posteriormente o ácido, inicia-se uma separação de fases como descrita anteriormente (Figura 6). A separação completa das duas fases pode ser melhor observada após a primeira centrifugação, onde a fase orgânica encontra-se no sobrenadante e apresenta coloração muito escura se comparada à fase aquosa, translúcida. (Figura 7).

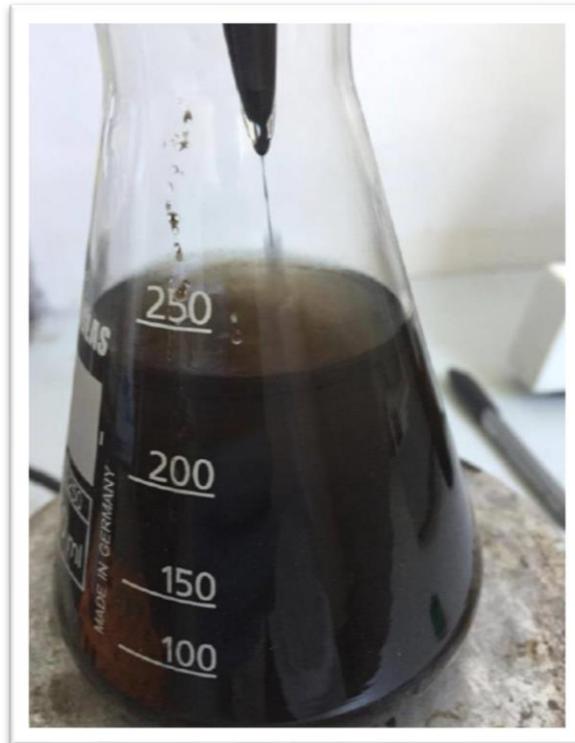
O sobrenadante pipetado gota a gota em éter etílico promove a formação de um precipitado aquoso (Figura 8), onde está presente o composto lignocresol, o qual é recuperado pela segunda centrifugação. Pode-se observar claramente a separação entre o precipitado aquoso e o sobrenadante, este último composto basicamente por éter etílico, ácido sulfúrico e parte de p-Cresol (Figura 9).



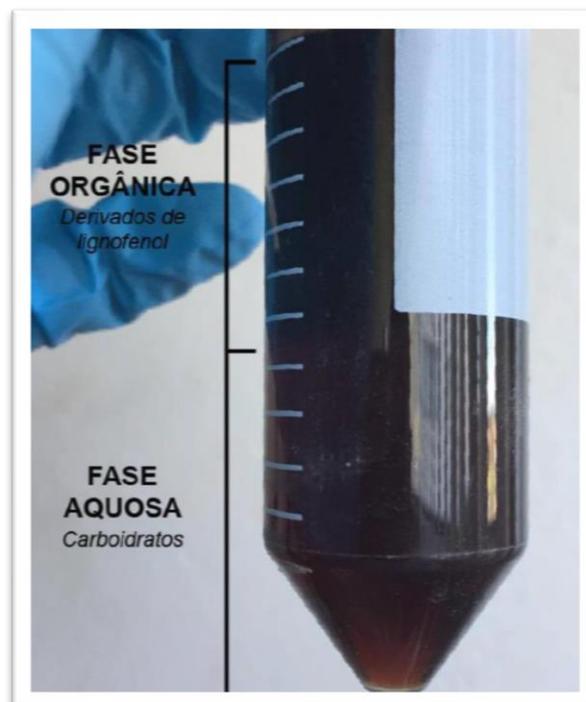
**Figura 6.** Início da separação de fases após adição de ácido sulfúrico.



**Figura 7.** Resultado da primeira centrifugação da síntese de lignocresol.



**Figura 8.** Pipetagem gota a gota da fase orgânica (1ª centrifugação) em éter etílico.



**Figura 9.** Resultado da segunda centrifugação da síntese de lignocresol.

O lignocresol presente no precipitado é extraído com acetona e o volume da solução é reduzido com auxílio de um evaporador rotativo (Figura 10) e então seco em estufa (Figura 11).



**Figura 10.** Redução da amostra por Rotaevaporador em banho maria.



**Figura 11.** Lignocresol após secagem em estufa.

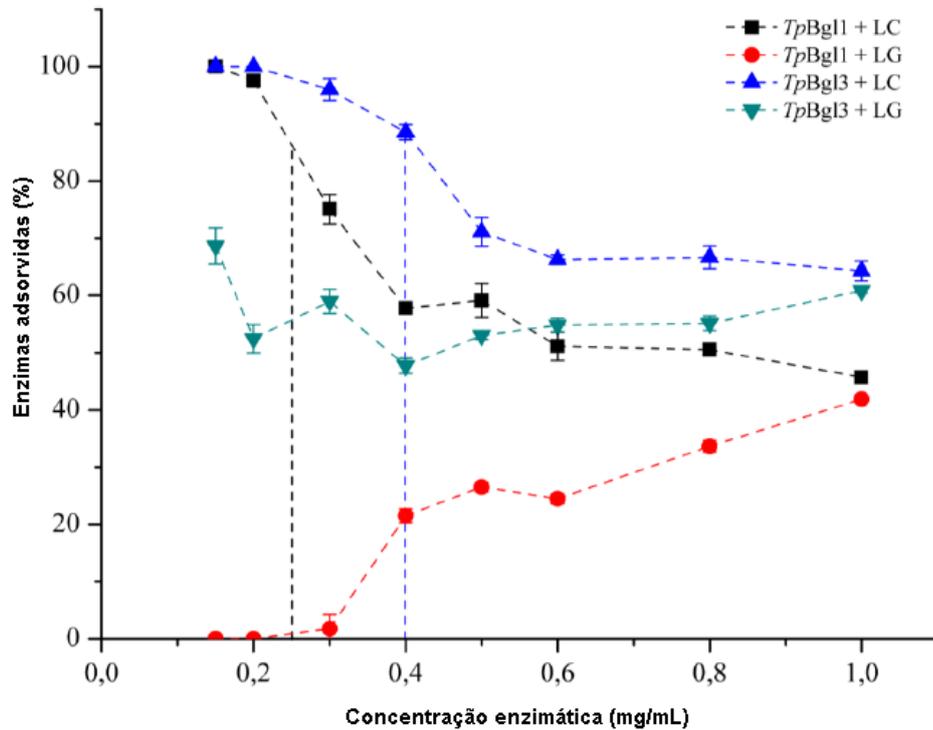
### 3.2 Adsorção de *TpBgl1* and *TpBgl3* em lignocresol e lignina

Os resultados obtidos entre a adsorção de lignocresol e lignina com *TpBgl1* e *TpBgl3* podem ser confirmados devido à ausência da enzima no sobrenadante em alguns pontos de concentração. A Figura 12 mostra que o lignocresol tem uma maior capacidade de adsorção do que a lignina. O melhor ponto de adsorção foi observado para *TpBgl1* e *TpBgl3* nas concentrações enzimáticas abaixo de 0,3 e 0,4 mg / mL, respectivamente (Fig. 12).

A adsorção do lignocresol às  $\beta$ -glicosidases pode ser explicada inicialmente por princípios de interações superficiais. Isto é, sabe-se que muitos processos de adsorção improdutiva entre  $\beta$ -glicosidases e lignina ocorrem por interações hidrofóbicas superficiais entre ambas as moléculas. Sendo assim, enzimas, de modo geral, apresentam certas forças de interação devido aos seus resíduos hidrofóbicos. Portanto, discute-se que, fixada a concentração de lignocresol em 10 mg/mL, até certo ponto de concentração enzimática adicionada para interação, toda a área superficial do lignocresol consegue receber  $\beta$ -glicosidases para adsorção. Contudo, após certo ponto de concentração, cujo ponto consiste em 0,25 e 0,40 mg/mL para *TpBgl1* e *TpBgl3*, a superfície do polímero estará completamente ocupada pelas enzimas, impedindo novas adsorções, decaindo a porcentagem adsorvida.

Ensaio de adsorção utilizando somente lignina não modificada apresentaram resultados (%) muito inferiores aos de lignocresol, comparados também em concentrações inferiores como demonstradas anteriormente (pontos 0,25 e 0,40 mg/mL), sendo ausente adsorção de lignina à *TpBgl1* e adsorção de lignina à *TpBgl3* de 70-50%. A menor adsorção da lignina era esperada para ambas as enzimas, uma vez que o lignocresol sintetizado é submetido ao sistema de separação de fases (FUNAOKA,2013). Esta metodologia permite modificações físico-químicas da lignina, levando ao aumento de hidroxilas fenólicas em sua composição, o que resulta no lignocresol muito mais hidrofóbico que sua molécula de partida, a lignina. Sendo assim, supõe-se que tais modificações auxiliam no momento da adsorção com as enzimas, possivelmente pela contribuição à característica hidrofóbica superficial ao lignocresol (SAMMOND et al., 2014).

Em um estudo de lignocresol proveniente de madeira de gimnosperma e angiosperma em interação com um coquetel enzimático, mostrou que a capacidade de adsorção de lignocresol de Eucalipto (angiosperma) foi menor que o lignocresol de Hinoki (gimnosperma), provavelmente porque o lignocresol de Eucalipto é mais hidrofílico devido ao menor massa molecular e estrutura linear com mais grupos fenólicos hidroxilo (KOBAYASHI.et al.,2014).



**Figura 12.** Porcentagem de *TpBgl1* (GH1) e *TpBgl3* (GH3) adsorvida para diferentes concentrações iniciais de lignocresol e lignina não modificada. LC-Lignocresol, LG- Lignina

Pode-se notar que a adsorção de *TpBgl3* ao lignocresol é maior em comparação com *TpBgl1*. Isto poderia ser relacionado comparando o tamanho de ambas as enzimas, *TpBgl3* tem área de superfície maior que *TpBgl1*. Além disso, *TpBgl3* tem o domínio semelhante à fibronectina (FnIII), cujo papel na adsorção de substratos não é completamente elucidado (DA SILVA, et al., 2016; POZZO et al., 2010; MCANDREW, et al., 2013).

Este domínio pode estar relacionado ao reconhecimento de pequenos substratos e na ligação de grandes polímeros (POZZO et al., 2010; MCANDREW, et al., 2013). Da Silva e colaboradores (2016), mostraram que este domínio em pH 4, possivelmente adquire cargas positivas e a adsorção pode ser explicada principalmente por interações eletrostáticas entre as preparações de lignina utilizadas nos experimentos com *TpBgl3*. Este é um indicativo que esta área adicional em *TpBgl3* pode contribuir para a superfície hidrofóbica e uma melhor interação entre enzima e lignocresol e assim adsorvendo melhor que *TpBgl1*. Estudos com FnIII de  $\beta$ -glucosidase *AnBgl1* de *Aspergillus niger* mostra que este domínio é essencial para ancorar a

enzima na matriz de lignina. Embora não haja especificidade na complexação entre FnIII e lignina. Além disso, no domínio FnIII existem importantes sítios de ligação em dímeros de lignina formando uma gaiola hidrofóbica por resíduos aromáticos e argininas (LIMA, et al., 2013).

Vale ressaltar que, como demonstrado por Sammond e colaboradores (2014), a melhor contribuição à interação por hidrofobia consiste em área superficial e não à quantidade de resíduos hidrofóbicos presentes na proteína.

### 3.3 Influência do pH na adsorção das $\beta$ -glucosidases em lignocresol e lignina

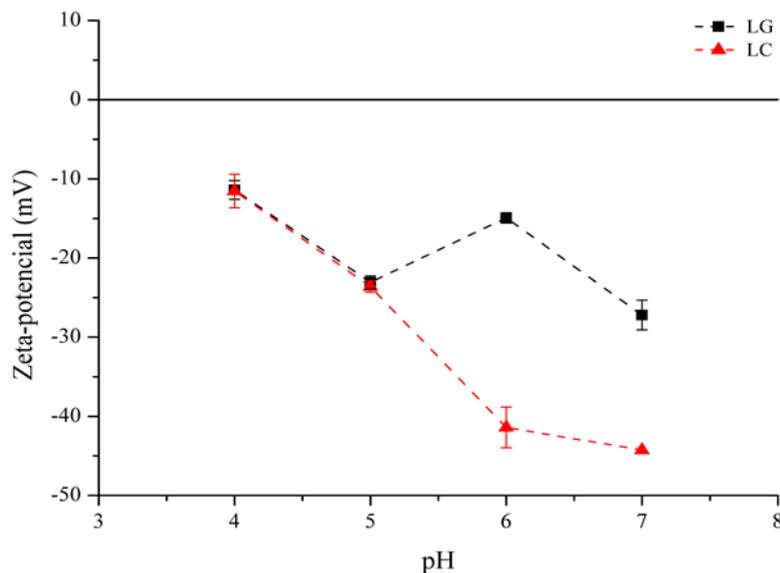
As medidas ELS (Dispersão de Luz Eletroforética) foram realizadas para determinar o potencial zeta médio ( $\zeta$ ) das amostras de lignina e lignocresol. Os resultados demonstraram que lignocresol e lignina apresentam potencial-zeta (mV) negativo entre a faixa de pH 4 a 7 (Figura 13). Vale ressaltar que, entre o pH 5 a 7, o lignocresol apresenta valores maiores negativamente se comparado à lignina.

Da Silva e colaboradores (2016), encontraram os mesmos resultados em ligninas não modificadas de cana-de-açúcar e eucalipto. Ambos foram negativos nos pHs observados em nosso trabalho, pH 4 e 6. No mesmo estudo, os autores relatam que a carga superficial de  $\beta$ -glicosidases (*TpBgl1* e *TpBgl3*) são afetadas pelo pH. Em pH 7 e 6, ambas as  $\beta$ -glicosidases adquirem cargas negativas muito semelhantes, enquanto em pH 4 as  $\beta$ -glicosidases adquirem uma carga positiva. Assim sendo, estes dados podem nos demonstrar que, além de interações superficiais, a adsorção de lignocresol às enzimas, pode também estar relacionada às influências eletrostáticas das moléculas.

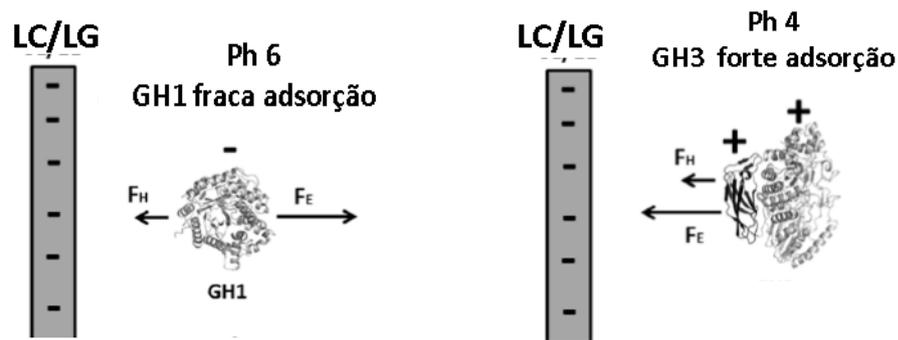
Esta discussão pode ser sustentada pelo fato de que a interação entre lignocresol e *TpBgl3* apresenta baixa diferença entre a interação do lignocresol com a mesma enzima, o que contrasta da interação entre lignocresol e *TpBgl1* e lignocresol e *TpBgl1*, que apresenta grande diferença adsortiva. Observa-se que a presença de cargas negativas (potencial zeta) para lignocresol/lignina em pH 4 é a mesma, de -11,5 mV. Por isso, a diferença eletrostática entre lignocresol ou lignina mantém-se a mesma durante interação com a *TpBgl3* neste pH, que consiste no pH ótimo para enzima utilizado nos ensaios. Em contrapartida, em pH 6 utilizado para a *TpBgl1* por ser seu pH ótimo, o lignocresol apresenta-se com mais cargas negativas que a lignina de *Pinus spp.*, cerca de -17,07 mV de diferença. Por este motivo e, neste momento, respeitando os princípios de interação mediada por condições eletrostáticas, a enzima *TpBgl1* adsorve menos com a lignina do que com o lignocresol e, por isto, a grande diferença entre

Como discutido anteriormente, a adsorção de *TpBgl3* ao lignocresol é maior em comparação com *TpBgl1*. A *TpBgl3* possui o domínio FnIII, Da Silva e colaboradores (2016), mostraram que este domínio em pH 4, possivelmente adquire cargas positivas e a adsorção pode ser explicada principalmente por interações eletrostáticas entre as preparações de lignina utilizadas nos experimentos com *TpBgl3*. Este é um indicativo que esta área adicional em *TpBgl3* pode contribuir para a superfície hidrofóbica e uma melhor interação entre enzima e lignocresol e assim adsorvendo melhor que *TpBgl1*.

Desta forma, os dados apresentados neste trabalho são consistentes com o modelo anterior de como as  $\beta$ -glicosidases adsorvem no lignocresol onde interações eletrostáticas e hidrofóbicas contribuem ao mecanismo de adsorção. Na figura 14, mostra a dinâmica de adsorção da *TpBgl1* e *TpBgl3* em lignocresol. Enquanto a *TpBgl1* tem sua adsorção ao lignocresol devido às interações hidrofóbicas a *TpBgl3* é por meio também desse mecanismo e por interações eletrostáticas corroborando com os dados apresentados anteriormente aonde *TpBgl3* adsorve melhor que a *TpBgl1*. Portanto, tomando-se que as interações são influenciadas por características eletrostáticas, e não apenas por hidrofobicidade superficial.



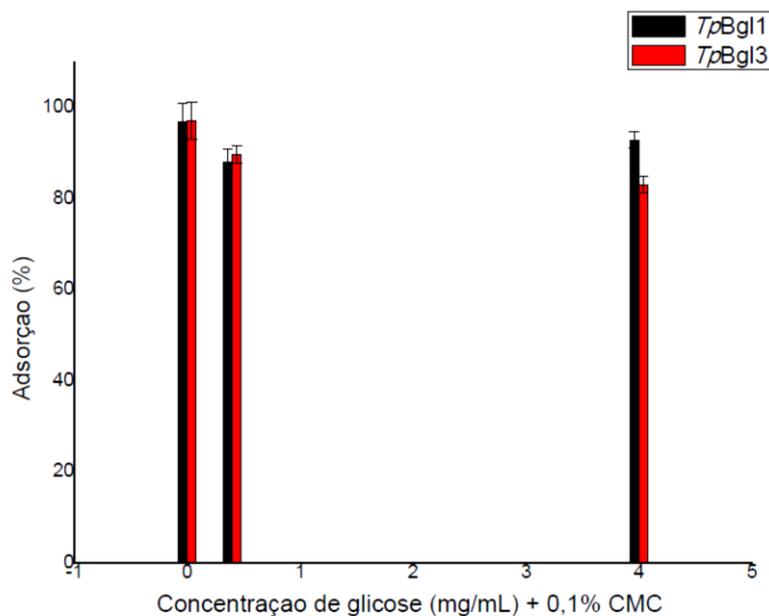
**Figura 13.** Potencial Zeta do lignocresol (LC) e lignina (LG) em função do pH.



**Figura 14.** Modelo esquemático da interação entre o lignocresol e lignina com as  $\beta$ -glicosidasas. Os resultados mostram que os mecanismos eletrostáticos contribuem para a adsorção (Adaptado Da Silva et al., 2016)

### 3.4 Influência de um meio rico em glicose na adsorção de $\beta$ -glicosidasas no lignocresol

A adsorção de  $\beta$ -glicosidasas no lignocresol com diferentes concentrações de glicose foram analisados para determinar se os produtos de hidrólise afetariam o mecanismo de adsorção de lignocresol. A escolha das concentrações de glicose foi baseada em nossos estudos de hidrólise enzimática (capítulo 3). A figura 15 mostra que a adsorção das enzimas não é afetada pela presença de glicose no meio.

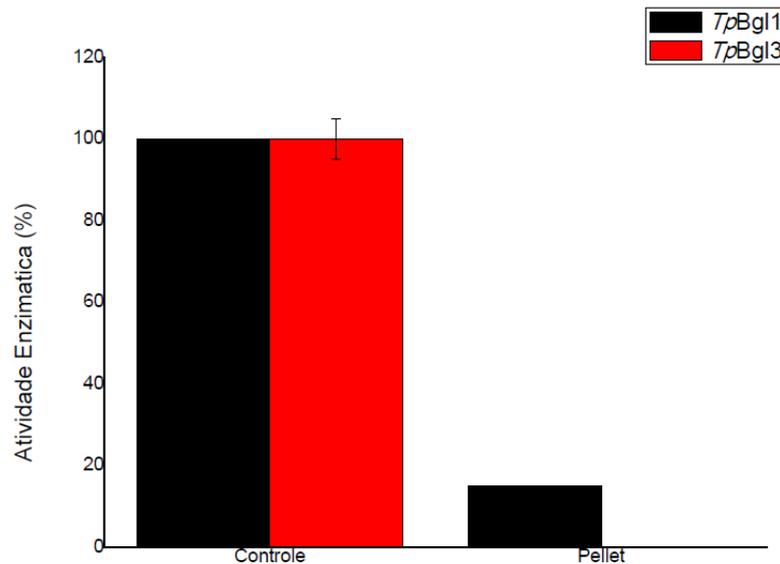


**Figura 15.** Avaliação a capacidade de adsorção de *TpBgl1* e *TpBgl3* em lignocresol na presença de glicose + CMC.

Maurer e colaboradores (2012), mostraram que a glicose não compete com as enzimas para os sítios de ligações ativos presentes na superfície dos substratos celulósicos, conseqüentemente, não interferindo na adsorção das enzimas. Em nossos estudos, mostramos que o mesmo ocorre para lignocresol.

### 3.5 Atividade enzimática de $\beta$ -glicosidases em lignocresol

Após a adsorção de  $\beta$ -glicosidases em lignocresol, determinou-se a enzima atividade do complexo LC-enzimas (Fig. 16).



**Figura 16.** Efeito do efeito de adsorção na atividade enzimática das  $\beta$ -glicosidases.

O complexo lignocresol-*TpBgl1* demonstrou cerca de 20% de atividade da enzima livre. Estes dados sugerem que o *TpBgl1* não perde inteiramente a função e atividade enzimática quando imobilizada. Por outro lado, o *TpBgl3* perde completamente a funcionalidade. Esta perda total de atividade pode ser explicada pela ligação estável de *TpBgl3* em lignocresol pelas interações hidrofóbicas e eletrostáticas, como mostrado em nossos resultados.

Possivelmente com *TpBgl1* ocorre descolamento dessas enzimas do complexo com o lignocresol quando misturado no tampão devido à sua interação mais fraca, estudos relatam que uma pequena liberação de celulase adsorvida em lignocresol ocorre quando o complexo é

misturado no tampão acetato fresco. Mas o autor afirma que a atividade enzimática é estimada utilizando o complexo lignocresol-celulase em vez da celulase destacada da solução (NONAKA et al.,2011). Por outro lado, estudos de Nonaka e colaboradores (2011) relatam que em lignocresol de Eucalipto em estudos de hidrólise enzimática com coquetel enzimático houve inibição de celobiose e uma possível explicação seria porque  $\beta$ -glicosidase é mais facilmente desativada em lignocresol. Trabalhos com lignina, mostram que sua adsorção com coquetel enzimático, também não ocorre atividade de  $\beta$ -glicosidase. Esse resultado pode afirmar que o lignocresol adsorve de uma forma semelhante a lignina (KO et al.,2015).

No entanto, quando as enzimas são imobilizadas, suas propriedades físicas e químicas podem mudar, efeitos na estabilidade, propriedades cinéticas e especificidade além da produtividade da enzima deve ser considerada (CARDOSO & CASS,2009). Existem alterações no comportamento da enzima imobilizada quanto à sua forma nativa, e são pelos seguintes fatores: modificação conformacional da enzima devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo; efeitos estereoquímicos - a enzima é imobilizada em uma posição em que o sítio ativo é relativamente inacessível; efeitos micro ambientais- que são resultado do método de imobilização escolhido ou da natureza da enzima (CARDOSO & CASS,2009). Estes fatores podem influenciar nas propriedades da enzima quando imobilizada, levando a um diferente comportamento do esperado. A atividade enzimática do complexo é baixa, mas mesmo assim, o lignocresol é eficiente na imobilização enzimática. Contudo, novos estudos de atividade enzimática serão avaliados em trabalhos futuros.

#### **4.Conclusão**

- Os dados mostraram que as  $\beta$ -glicosidases pode ser adsorvidas no lignocresol através de diferentes mecanismos, como por interações hidrofóbicas e eletrostáticas.
- A glicose no meio reacional nas condições estudadas não interfere na adsorção das enzimas ao lignocresol.
- *TpBgl1* complexado ao lignocresol mantém uma atividade enzimática residual.
- No entanto, ainda são necessários estudos de atividade enzimática após a adsorção em lignocresol. Esses estudos podem ser úteis no campo de conversão de polissacarídeos estruturais de plantas em bioenergia.

## 5. Referências Bibliográficas

ADRIO, J., L., DEMAIN. Microbial cells and enzymes - A century of progress. *Methods in Biotechnology, Microbial Enzymes and Biotransformation*; Humana Press: Totowa. 2005;17, 1,27.

AKIMKULOVA, A., et al. Improving the enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by metal ion blocking of non-productive cellulase adsorption on lignin. *Bioresource Technology*. 2016: 208,110-116.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;7, 248-254.

CAIRNS, J.R.K; ESEN, A.  $\beta$ -Glucosidases. *Cell Mol Life Sci.* v., 67, p.3389–3405, 2010.  
CHAUVE, M.; MATHIS, H.; HUC, D.; CASANAVE, D.; MONOT, F.; FERREIRA, N.L. Análise comparativa cinética dos dois fungos  $\beta$ -glucosidases. *Biocombustíveis*, 2010.

COLUSSI, F., et al. Oligomeric state and structural stability of two hyperthermophilic  $\beta$ -glucosidases from *Thermotoga petrophila*. *Amino Acids*, Advance Access published January 31, 2015.

CARDOSO, L.C., et al. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. *Química Nova*. 2009;32,175-187.

COTA, J., et al. Comparative analysis of the hyperthermophilic GH1 and GH3 family members with industrial. *New Biotechnology*. 2015;32, 13-20.

DA SILVA, V. M., et al. Non-productive adsorption of bacterial  $\beta$ -glucosidases on lignins is electrostatically modulated and depends on the presence of fibronectin type III-like domain. *Enzyme and Microbial Technology*. 2016; 8788, 1-8.

FLORENCIO, C., et al. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Quimica Nova*.2017;40, 1082-1093.

FUNAOKA, M.; ABE, I. Rapid separation of wood into carbohydrate and lignin with concentrated acidphenol system. *Tappi Journal*.1989;72, 145-149.

FUNAOKA, M. A new type of phenolic lignin-based network polymer with the structure-variable function composed of 1,1-diarylpropaneunits. *Polymer International*.1998;47, 277–290.

FUNAOKA, M. Sequential transformation and utilization of natural network polymer ‘LIGNIN’. *Reactive and Functional Polymers*.2013; 73, 396-404.

HARNPICHARNCHAI,P.,et al. A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expression and Purification*.v. 67, p. 61-69,2009.

HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J*.v. 293, 781-788, 1993.

HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem.J.*, v. 316, p. 695–696,1996.

HENRISSAT, B., DAVIES, G. J. Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. v. 7. p.637-644, 1997.

KOBAYASHI A., et al. Comparison of Softwood and Hardwood Lignocresol-immobilized Cellulases. *Journal of the Japan Institute of Energy*.2014;91,992-997.

KOROTKOVA, O. G., et al. Isolation and properties of fungal  $\beta$ -glucosidases. *Biochemistry*.2009;74, 569–577.

LI S.,et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.2012; 2, e201209017.

LIMA, M. A., et al. *Aspergillus niger* beta-Glucosidase Has a Cellulase-like Tadpole Molecular Shape Insights into glycoside hydrolase family 3 (gh3) beta-glucosidase structure and function. *Journal of Biological Chemistry*.2013; 288, 32991-33005.

LOU, H., et al .pH-Induced Lignin SurfaceModification to Reduce Nonspecific Cellulase Binding and Enhance Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses. *ChemSusChem*.2013;6,919-927.

MAURER, S. A., et al., Cellulase Adsorption and Reactivity on a Cellulose Surface from Flow Ellipsometry. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2012;51, 11389–11400.

MERINO, S. T., CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances Biochemical. Engineering Biotechnology*.2007;108, 95-120.

MIKAME, K., FUNAOKA, M. Polymer structure of lignophenol I - Structure and function of fractionated lignophenol. *Polymer Journal*.2006; 6, 585-591.

NAGAMATSU, Y., FUNAOKA, M. Design of recyclable matrixes from lignin-based polymers. *Green Chemistry*.2003; 5, 595-601.

NAKAGAME, S., et al. The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis od cellulose. *Bioresource Technology*.2011; 102, 4507-4517.

NONAKA, A., et al. Adsorption of *Trichoderma raasei* cellulase on softwood lignin basead lignophenol. *Journal of the Japan Institute of Energy*;2011;90,977,981.

PALONEN, H., et al. Adsorption of *trichoderma reesei* cbh i and eg ii and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*.2004;107,65-72.

POZZO, T., J.L. et al. Structural and functional analyses of  $\beta$ -glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: a thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3, *Journal of Molecular Biology*.2010; 397, 2724–739.

R.P. MCANDREW, et al. From soil to structure, a novel dimeric  $\beta$ -glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 3 isolated from compost using metagenomic analysis, *Journal of Biological Chemistry*.2013; 288, 14985–14992.

RADICCHI, M.A.B. Estudos de inibição de  $\beta$ -glicosidases bacterianas por fenóis solúveis.66f (Tese de Doutorado) São Paulo: Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP), SP.2019.

SAMMOND, D.W., et al. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. *The Journal of Biological Chemistry*.2014; 289, 20960-20969.

SQUINA F.M., et al. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of an endo-1,5- $\alpha$ -l-arabinanase from hyperthermophilic *Thermotoga petrophila*. *Acta Crystallographica Section F*. 2009; 65,902–905.

## Capítulo 3

Capacidade de Adsorção e Funcionalidade de Celulases  
adsorvidas em Lignocresol

## Resumo

Enzimas chamadas celulasas são responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais. As enzimas que fazem parte desse grupo são as endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EC3.2.1.4), exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EC3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (EC3.2.1.21) essas enzimas trabalham sinergicamente agindo sobre o polímero de celulose e são geralmente produzidos por microrganismos. Essas enzimas possuem grande potencial biotecnológico e além da produção de etanol são utilizadas em vários processos, como por exemplo, na indústria têxtil, de bebidas, nutrição animal, entre outras. Mas um fator limitante é o alto custo dessas enzimas. Portanto, os estudos de imobilização são de grande importância. Os gastos envolvendo utilização de enzimas em diversos bioprocessos é uma das principais despesas para as empresas atualmente. É fato que, cada vez mais, as empresas que desenvolvem tais enzimas tentam ao máximo a redução de custos envolvidos na produção destas. Entretanto, nem todas medidas tomadas são eficientes na redução de custos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal a confecção de uma suspensão de lignocresol para reciclagem ou reaproveitamento enzimático em bioprocessos. Para a síntese desse composto, foi utilizada a metodologia do sistema de separação de fases e para comprovação da formação do complexo (lignocresol-enzima) e atividade enzimática do coquetel enzimático *Cellic CTec3* da empresa *Novozymes* foram utilizados, respectivamente, o método de Bradford e o método DNS (ácido dinitrosalicílico). Os resultados obtidos no presente trabalho, comprovam que o lignocresol sintetizado adsorve eficientemente *Cellic CTec3* e que o complexo lignocresol-celulase possui uma atividade enzimática residual em comparação a celulase livre. Os resultados mostram também que o complexo formado é estável, ou seja, após o período de 4 dias ainda há atividade enzimática. Sendo assim, o lignocresol apresenta-se como um grande candidato à aplicação em recuperação ou imobilização enzimática.

Palavras-chave: Lignina, lignocresol; celulasas; hidrólise enzimática

## 1.Introdução

A biomassa lignocelulósica é matéria-prima para a produção de energia e produtos químicos de valor agregado como, por exemplo, a produção de etanol. É um recurso renovável, biodegradável e favorável para o meio ambiente (CHEN, et al.,2017; CHEN, et al.,2017; SAGUES, et al.,2018; YU, et al.,2017). Essa biomassa é um material complexo composto por celulose, hemiceluloses e lignina (DA SILVA, et al.,2016) A celulose é um polissacarídeo de cadeia linear homogêneo, consistindo de unidades de celobiose ligadas por ligações glicosídicas, enquanto a hemicelulose é um polissacarídeo heterogêneo composto por pentoses, hexoses e ácidos urônicos (BALAT, et al.,2008). A lignina é uma macromolécula tridimensional amorfa não polissacarídica encontrada em associação com fibras de celulose e hemicelulose na parede celular de vegetais, caracterizando a rigidez estrutural. Os precursores da lignina são compostos por unidades fenilpropanóides, unidas por ligações tridimensionais C-O-C e C-C, formadas através da polimerização de monômeros fenólicos tais como, álcoois cumarílico (p-hidroxifenil “H”), coniferílico (guaiacil “G”) e sinapílico (siringil “S”) (GUO, et al.,2017; VANHOLME, et al.,2010). Na conversão da biomassa lignocelulósica, há a necessidade de uma etapa de pré-tratamento da biomassa vegetal para aumentar o acesso da celulose à ação da atividade celulolítica das enzimas durante a hidrólise enzimática (ZHANG, et al.,2012; NASIPOUR, et al.,2014). A hidrólise enzimática compreende uma etapa de adsorção das celulasas no material lignocelulósico, mas a presença de resíduos de lignina pode levar à adsorção improdutiva de enzimas. Esse processo ocorre devido ao caráter hidrofóbico da lignina, que pode expor o núcleo hidrofóbico das celulasas ao ponto de inativação (ECKARD, et al.,2013).

O setor industrial de papel e celulose é o que mais cresce no Brasil, e recentemente alcançou o posto de quarto produtor mundial. Esse fato se dá pelos altos investimentos na produção (SOUZA, et al.,2018). Cerca de 80% das pastas celulósicas geradas neste setor industrial brasileiro são pelo cozimento Kraft (sulfato), um dos processos químicos alcalinos existentes (GROSSI, 2002). Este método é utilizado para a obtenção de celulose através da “polpação” da madeira ou bagaço, e tem como objetivo principal a individualização das fibras de celulose através da dissolução da lignina em solução contendo sulfatos (GOMES, 2009). Um subproduto gerado pelo processo de cozimento Kraft é o licor negro. Em sua composição há: celulose, hemiceluloses, sais de sódio e cálcio, e lignina (CHRISTOPHER, 2013).

Assim, a partir da lignina, do licor negro do processo de cozimento Kraft proveniente da indústria de papel e celulose pode-se obter um polímero chamado lignocresol, composto de unidades de 1,1-bis (aryl) propano, que preservam características da lignina (MIKAME &

FUNAOKA,2006). Este composto é sintetizado utilizando o sistema de separação de fases, que consiste no uso de ácido concentrado e um derivado de fenol (FUNAOKA & ABE,1989; FUNAOKA, et al.,1995; FUNAOKA,2013).

Nesse contexto, avaliamos a adsorção de celulases com o lignocresol e a sua funcionalidade após a formação do complexo através de experimentos que avaliaram as atividades enzimáticas dessas enzimas adsorvidas.

## 2. Metodologia

### 2.1 Enzima

O complexo de celulases utilizado foi Cellic CTec3®, um coquetel enzimático produzido pela empresa *Novozymes*, cedido gentilmente por uma empresa nacional de papel e celulose.

### 2.2. Síntese do Lignocresol

Para a síntese do lignocresol será utilizada a metodologia do sistema de separação de fases, descrita anteriormente por Funaoka (1998). 1 g de lignina do tipo Indulin AT comercial (LKI) extraída a partir do liquor residual do processo Kraft em *Pinus sp.*, cedida gentilmente pela empresa MWV (MeadWestvaco Corporation), fora colocada em um frasco de reação. 10 mL de p-Cresol (10 mL/g de lignina) foram adicionados em leve agitação com a mão por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 20 mL de ácido sulfúrico 72% (20 mL/g de lignina) sob agitação vigorosa por 1 hora. Todo o volume presente no frasco fora transferido a um tubo falcon de 50 mL para centrifugação da amostra (1ª centrifugação) por 20 min à temperatura ambiente (4000 rpm).

O sobrenadante formado fora retirado do falcon e pipetado gota a gota em um volume de 200 mL de éter etílico frio sob vigorosa agitação (utilizado para remoção do ácido e parte do p-cresol). O precipitado aquoso formado será recuperado por centrifugação (2ª centrifugação) à 5°C (4000 rpm) por 20 min e o sobrenadante descartado. O lignocresol presente no precipitado será extraído com 80 mL de acetona e o volume da solução será reduzida à, aproximadamente, 10 mL com auxílio de um Rotaevaporador (Fisatom modelo 804) à 40°C e rotação de 150 rpm.

Após redução, a solução fora, novamente, pipetada gota a gota em 200 mL de éter etílico frio sob vigorosa agitação e a amostra centrifugada (3ª centrifugação) por 20 minutos a temperatura ambiente (4000 rpm). O sobrenadante será descartado e o pellet de lignocresol será seco em estufa à 50°C por 3 horas.

### *2.3. Adsorção das celulases em lignocresol*

40 mg de lignocresol foi completamente disperso em 2,0 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) em microtubo (2,0 mL). Para formar a suspensão a amostra foi colocada em um sonicador (Sharp UT-205S, 200 W) com aquecimento por 1 hora. O coquetel enzimático Cellic Ctec 3 foi adicionado numa concentração final de 0,5 mg / ml (FPU 0,250 mg/mL). A mistura foi agitada durante 20 min à temperatura ambiente num agitador (30 rpm) para permitir que a adsorção da celulase atingisse o equilíbrio. Após adsorção, a mistura foi centrifugada durante 20 min a 1000 rpm. A concentração de proteínas não adsorvidas no sobrenadante foi medida usando um método de Bradford (1976). A quantidade de enzima adsorvida foi calculada subtraindo a quantidade de enzima restante no sobrenadante da quantidade total de enzima adicionada.

### *2.4 Estabilidade do complexo lignocresol-celulase*

Após a adsorção da enzima no lignocresol, o sobrenadante foi cuidadosamente removido usando uma pipeta. O complexo foi armazenado a -4 ° C. Sendo assim, foram feitos ensaios de atividade enzimática do complexo por 4 dias seguidos com o objetivo de verificar sua estabilidade. A quantidade de açúcares redutores foi determinada utilizando o método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (GHOSE,1987).

Foi adicionado 1,0 mL do tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) em tubos de ensaio, colocados a 50 ° C para estabilizar a temperatura da reação. Depois, o complexo lignocresol-celulase foi colocado em um tubo com 50 mg de tiras de papel de filtro Whatman N ° 1. Em seguida, foi incubado a 50 ° C por 60 min. No final do período de incubação, foi removido os tubos de ensaio e a reação enzimática foi parada adicionando imediatamente 3,0 mL de reagente DNS. A absorbância foi determinada usando um espectrofotômetro a 540 nm.

De acordo com Ghose (1987), foi necessário realizar diluições a fim de se obter amostras as quais liberassem acima e abaixo de 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL. Ao encontradas diluições, e com o auxílio da curva padrão identificou-se a concentração que liberasse 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL de solução.

### *2.5. Hidrólise enzimática de celulases em papel de filtro immobilizadas em lignocresol*

Para a sacarificação do substrato sólido, em papel de filtro, foram adicionados 10 mg de papel de filtro Whatman No. 1 e 1,0 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) ao microtubo de 2,0 mL. Os microtubos foram agitados durante 30 min, 1 h, 1:30 h, 2 h, 4 h e 8 h, utilizando um agitador mantido a 50 ° C. Após a hidrólise enzimática do papel de filtro, o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,45 µm. A redução das concentrações de açúcar em cada amostra de filtrado foi determinada pelo método DNS como descrito acima.

## **3.Resultados e Discussão**

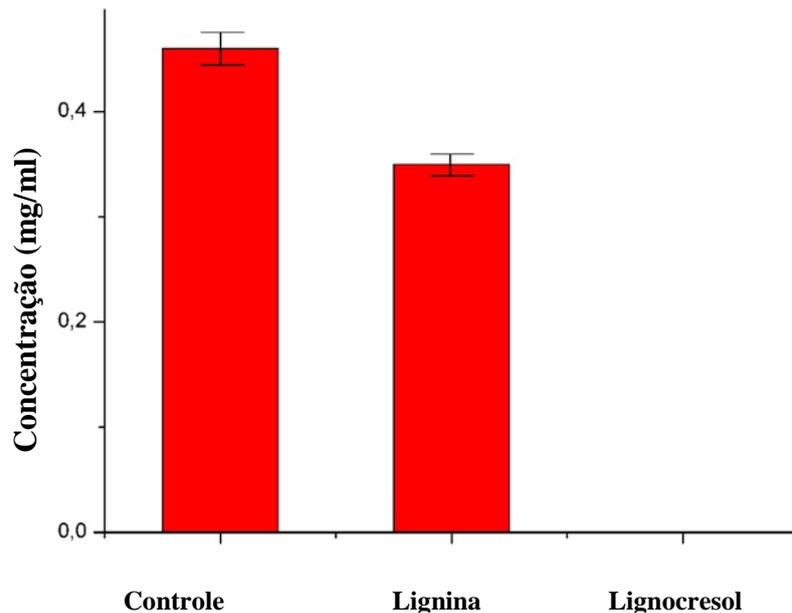
### *3.1 Adsorção das celulases em lignocresol*

As quantidades de celulase adsorvidas na lignina não modificada e no lignocresol foram comparadas na Fig.1. Os resultados obtidos entre a adsorção de lignina não modificada e lignocresol com celulases podem ser confirmados devido à ausência da enzima no sobrenadante. Diluições de celulase foram utilizadas para os ensaios de adsorção e a concentração em 0,5mg/ml de celulase foi a mais eficiente. Porque quanto maior a quantidade de celulase colocada, o processo de adsorção é saturado (NONAKA, et al.,2011). A menor adsorção de lignina não modificada era esperada para ambas as enzimas, uma vez que o lignocresol sintetizado é submetido ao sistema de separação de fases (FUNAOKA,1998). Segundo Funaoka (1998), essa metodologia permite modificações físico-químicas da lignina, levando a um aumento de hidroxila fenólica em sua composição, o que resulta em polímeros de lignocresol muito hidrofóbicos.

Os grupos funcionais existentes na lignina desempenham um papel essencial na adsorção. A presença ou não desses grupos influenciam diretamente na adsorção com as enzimas. Por exemplo, quando há presença de ácidos carboxílicos e grupos hidroxila alifáticos a lignina terá uma característica mais hidrofílica, diminuindo assim a adsorção de celulases a essa macromolécula. Quando a lignina em sua estrutura tem grande quantidade de grupos hidroxilas fenólicas, o oposto acontece já que essa macromolécula terá alta hidrofobicidade e assim adsorvendo mais enzimas (NAKAGAME, et al.,2013; BERLIN, et al.,2006; RAHIKAINEN, et al.,2013). As estruturas da lignina se diferem de um material lignocelulósico para outro, isso se deve às mudanças estruturais tomadas devido às diferentes proporções e tipos de precursores em sua composição, bem como, durante o isolamento das paredes celulares (MORAIS, 1987 e 1992), o que acarreta tipos de biomassas

lignocelulósicas com diferentes ligninas e assim também possuem diferentes capacidades de adsorção (KO, et al.,2014; GUO,et al.,2014). O mesmo ocorre com o lignocresol. Em um estudo com lignocresol de diferentes materiais vegetais em interação com um coquetel enzimático, a capacidade de adsorção de lignocresol de folhosas foi menor que a de coníferas, provavelmente porque o lignocresol de Eucalipto é mais hidrofílico devido ao menor peso molecular e estrutura linear com mais grupos hidroxila fenólicos (KOBAYASHI, et al.,2014).

Estudos mostram que a presença dos domínios de ligação a carboidratos (CBMs - *carbohydrate-binding modules*) das celulasas podem, também, causar o efeito da adsorção improdutivo (RAHIKAINEN *et al.*, 2013). Esse mecanismo está presente, principalmente em endoglucanases e celobiohidrolases. O CBM interage com a superfície da celulose pela presença dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes em sua superfície, que são possivelmente os mesmos resíduos responsáveis pela interação da lignina (LINDER, et al.,1995; RAHIKAINEN, et al.,2013). Então, o CBM tem como função a aproximação entre domínio catalítico das celulasas e a superfície da celulose, aumentando assim a ação da enzima sobre o substrato insolúvel.



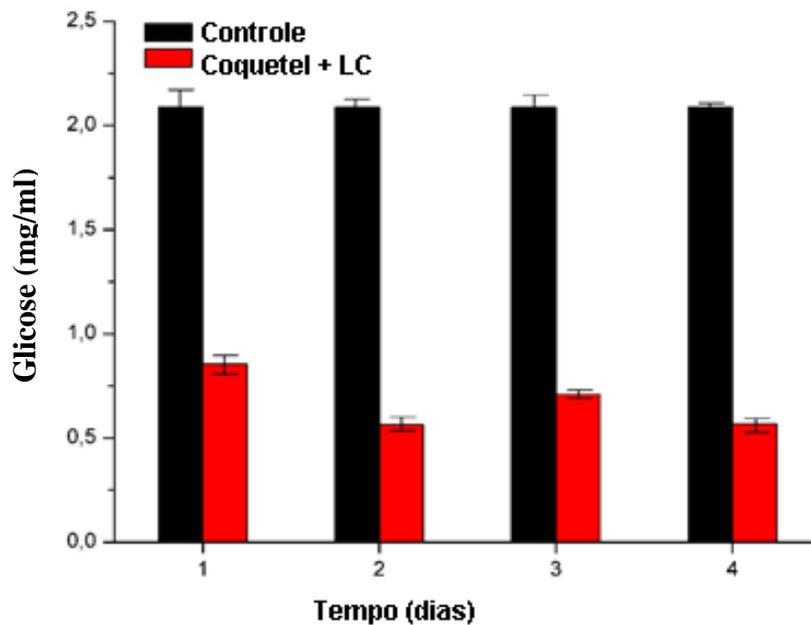
**Figura 1.** Adsorção de celulases pelo lignocresol.

O pI (ponto isoelétrico) é um ponto importante que deve ser considerado no mecanismo de adsorção. A carga elétrica apresentada pelas celulases pode influenciar na interação com a lignina pois gera repulsão ou atração eletrostática com essa macromolécula, que é geralmente carregada negativamente (Nakagame, et al., 2011). Estudos prévios mostram que o lignocresol, em pH 4,8, tem o pI mais negativo que a lignina (BARDUCO et al., 2019). Nonaka e colaboradores (2011), mostram o efeito do pH na adsorção de celulases de *Trichoderma reesei* em lignocresol, o máximo de adsorção observado foi em torno de pH 2 ~5 corroborando com os nossos resultados em que os ensaios foram conduzidos a pH 4.8. Esse fato se deve pelo pI que as celulases possuem, entre 4,6 e 6,4, deste modo as enzimas com pI baixo estarão neutras enquanto que as enzimas com pI alto estarão carregadas positivamente em pH 4,8 – 5,0 (KO et al., 2014).

O lignocresol adsorve mais celulases em comparação com a lignina, não apenas pela hidrofobicidade, mas também porque apresenta uma quantidade mais significativa de cargas negativas em sua estrutura.

### 3.2. Estabilidade do complexo lignocresol-celulases

A Figura 2 mostra a estabilidade do lignocresol após adsorção com as celulases. A quantidade de açúcares redutores foi determinada usando o método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (GHOSE, 1987)



**Figura 2.** Estabilidade do complexo lignocresol-celulase. A quantidade de glicose foi determinada utilizando o ácido dinitrossalicílico (DNS), foi utilizado 0,4 mg de celulase misturada com 40 mg de lignocresol (LC) e 0,4 mg de celulase nativa livre.

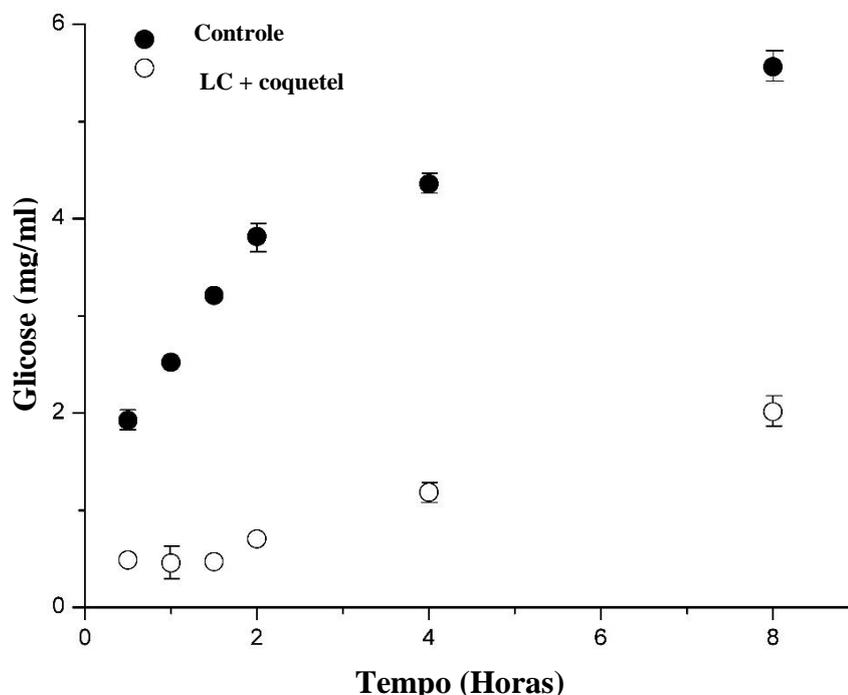
O lignocresol é estável ao longo de quatro dias após a formação do complexo com as celulases. Embora a produção de açúcares redutores tenha diminuído quando a celulase foi adsorvida sobre o lignocresol, a celulase manteve atividade enzimática para ser utilizada. A perda da atividade enzimática pode ser explicada pelo fato de que as enzimas podem se desprender do lignocresol dentro da solução com o tampão (NONAKA et al., 2011).

Nonaka et al., 2011 mostram em seus estudos que a celulase comercial derivada de *Trichoderma reesei* foi facilmente imobilizada em lignocresol com uma atividade enzimática de cerca de 60% em comparação com a celulase livre. Mostram ainda que a celulase não se

separou significativamente do lignocresol quando misturado com tampão acetato, indicando que a celulase imobilizada por adsorção física simples é estável.

### 3.3 Sacarificação em papel de filtro por celulases imobilizadas em lignocresol

A Figura 3 mostra a quantidade de açúcares redutores produzidos através da sacarificação de papel de filtro por celulases imobilizadas em lignocresol. A produção de açúcares redutores aumentou gradualmente com o tempo de sacarificação. Os desempenhos da hidrólise enzimática das celulases imobilizadas com lignocresol foram de aproximadamente 33% da celulase nativa livre. Quando a enzima interage com o lignocresol, há perda da atividade da celulase, semelhante à lignina não modificada (KO, et al.,2014). Nonaka et al. (2014), mostram que, com base na quantidade de açúcares redutores produzidos na hidrólise de papel de filtro de celulases adsorvidas em lignocresol, a atividade foi de aproximadamente 30% e 45% (lignocresol de folhosas e coníferas, respectivamente) comparada à celulase nativa livre. Neste estudo, os autores também mostram cromatogramas de hidrolisados após a sacarificação do papel de filtro por 0,5 a 8 horas.



**Figura 3.** Quantidade de açúcares redutores produzidos por sacarificação de papel de filtro a 50 °C ao longo de 8h catalisada por 0,45mg/ml de celulase misturada com 40 mg de lignocresol (LC) e 0,5 mg/ml de celulase nativa livre.

O baixo desempenho da hidrólise do complexo enzimático lignocresol também pode ser correlacionado com o contato com o papel de filtro, que foi fisicamente limitado pelo lignocresol (NONAKA, et al.,2014). Outra possibilidade é que as celulases adsorvidas na lignina hidrofóbica possam apresentar alterações conformacionais, como desdobramento e desnaturação (BOERJESSON, et al.,2007). A hidrólise enzimática do complexo é baixa, mas, mesmo assim, o lignocresol é eficiente na adsorção enzimática. No entanto, mesmo com uma diminuição da atividade enzimática, ainda é mantida atividade suficiente para a hidrólise de substratos sólidos em laboratório. Estudos com biomassa em condições industriais ainda são necessárias para comprovar a eficiência do lignocresol.

#### **4.Conclusão**

- O coquetel enzimático Cellic Ctec 3 foi totalmente adsorvido pelo lignocresol;
- O complexo enzimático lignocresol apresentou estabilidade, mantendo atividade enzimática por quatro dias.;
- A hidrólise enzimática por papel de filtro foi de 33% em comparação com a celulase nativa;
- Estes resultados indicam que adsorvidas com o lignocresol as celulases mantem uma baixa atividade.

## 5. Referências Bibliográficas

ANTONYRAJ, C.A., et al. A lignin-derived sulphated carbon for acid catalyzed transformations of bio-derived sugars. *Catal. Commun.* 2018; 104:101–105.

BALAT, M., et al. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science.* 2008;34:551-573.

BARDUCO FERREIRA, M.T., et al. Studies of adsorptive capacity of bacterial  $\alpha$ -glucosidases on lignocresol aiming the enzymatic recycling in bioprocesses, *Biotechnology Reports* .2019, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00326>

BERLIN A., et al. Inhibition of cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.* 2006;125:198–209.

BOERJESSON, J., et al. Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enz. Microbial Technol.* 2007; 41: 186–195.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;7: 248-254.

CAO, L., et al. Effect of glycerol as cosolvent on yields of bio-oil from rice straw through hydrothermal liquefaction. *Biores. Technol.* 2018; 220: 471–478.

CHEN, P., et al. Catalytic depolymerization of the hydrolyzed lignin over mesoporous catalysts. *Biores. Technol.* 2017; 226:125–131.

CHEN, S.S., et al. Valorization of biomass to hydroxymethylfurfural, levulinic acid, and fatty acid methyl ester by heterogeneous catalysts. *Chem. Eng. J.* 2017a;328: 246–273.

CHEN, S.S., et al. Valorization of lignocellulosic fibres of paper waste into levulinic acid using solid and aqueous Bronsted acid. *Bioresour. Technol.* 2018;247:387–394.

DA SILVA, V.M., et al. Non-productive adsorption of bacterial  $\beta$ -glucosidases on lignins is electrostatically modulated and depends on the presence of fibronectin type III-like domain. *Enz and Microbial Technol.* 2016; 8788:1-8.

ECKARD, A.D., et al. A review of the role of amphiphiles in biomass to ethanol conversion. *Appl. Scienc.*2013; 3:396-419.

FUNAOKA, M, ABE, I. Rapid separation of wood into carbohydrate and lignin with concentrated acidphenol system. *Tappi Journal.*1989;72:145-149.

FUNAOKA, M., et al. Conversion of native lignin to a highly phenolic functional polymer and its separation from lignocellulosics. *Biotechnol and Bioeng.*1995; 46: 545-552.

FUNAOKA, M. New type of lignin-based network polymer with the structure-variable function composed of 1,1-diarylpropane units. *Polym. Int.*1998; 47:277-290.

FUNAOKA, M. Sequential transformation and utilization of natural network polymer ‘‘LIGNIN’’. *React. and Functi. Polym.*2013;73: 396-404.

GADHAVE, R.V, et al. Lignin-polyurethane based biodegradable foam. *Open J. Polym. Chem.*2018; 8:1–10.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & App.Chem.*1987;59:257-268.

GROSSI, R. C. Estudo da reação de caustificação, Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2002.

GUO, D., et al. Effect of molecular weight on the pyrolysis characteristics of alkali lignin. *Fuel.*2017; 193: 45–53.

KO, J.K., et al. Adsorption of Enzyme Onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. *Biotechnol and Bioeng.*2014;112:447-456.

KOBAYASHI A., et al. Comparison of Softwood and Hardwood Lignocresol-immobilized Cellulases. *J. Jap. Inst. Energy.*2014;91:992-997.

LINDER, M., et al. Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Prot Science.*1995;4:1056-1064.

MARKGLOU, N., WAINER, I W. *Methods em enzymology immobilized enzymes*, Academic Press: New York, vol. XLIV, 1976.

MIKAME, K., FUNAOKA, M. Polymer structure of lignophenol I - Structure and function of fractionated lignophenol. *Polym Journal.*2006;6:585-591.

MORAIS, S. A. L. Contribuição ao estudo químico de ligninas de *Eucalyptus grandis*. Belo Horizonte. 175p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFMG/ICEx, 1987.

MORAIS, S.A.L. Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: Isolamento, quantificação e análise estrutural. Belo Horizonte. 260p. Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICEx, 1992.

NAGAMATSU, Y.,FUNAOKA, M. Design of recyclable matrixes from lignin-based polymers. *Green Chem.*2003; 5: 595-601.

NAKAGAME, S. et al. The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biores. Technol.*,2011;102: 4507-4517.

NASIPOUR, N.,et al. A novel surfactant-assisted ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. *Biores.Technol.*2014;169:33-37.

NONAKA, H.,et al. Basic characteristics of cellulase immobilized on lignophenol. *Kobunshi Ronbunshu.* 2011; 68:315–319.

NONAKA, A.,et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase on softwood lignin based lignophenol. *Journal of the Japan Institute of Energy.*2011;90,977,981.

NONAKA, H., et al. Enzymatic Hydrolysis of Carboxymethylcellulose and filter paper by Immobilized Cellulases on Lignophenols. *J. Wood Chem and Technol.*2014;34:169-177.

RAHIKAINEN, J.L., et al. Cellulase-lignin interactions-The role of carbohydrate binding module and pH in non-productive binding. *Enz. Microbiol. and Technol.*2013;53:315–321.

SAGUES, W.J., et al. Lignin-first approach to biorefining: utilizing Fenton's reagent and supercritical ethanol for the production of phenolics and sugars. *ACS Sustain. Chem. Eng.*2018; 6;4958–4965.

SOUSA, P.R. DE, et al. Terceirização das Atividades Florestais na Indústria de Celulose e Papel. *Revista de Administração IMED.* 2018;8:260-280.

VANHOLME, R., et al. Lignin Biosynthesis and Structure. *Am Soc Plant Biol.*2010; 153:895-905.

YOUNAS, R., et al. Lactic acid production from rice straw in alkaline hydrothermal conditions in presence of nio nanoplates. *Catal. Today.*2016;274:40–48.

YU, I.K.M, TSANG, D.C.W. Conversion of biomass to hydroxymethylfurfural: A review of catalytic systems and underlying mechanisms. *Biores. Technol.*2017; 238: 716–732.

ZHANG, Z., et al. Pretreatment of sugarcane bagasse by acid-catalysed process in aqueous ionic liquid solutions. *Biores.Technol.*2012;120:149-156.

## Capítulo 4

**Avaliação da capacidade de adsorção de lignocresol  
proveniente de bagaço de cana-de-açúcar.**

**Resumo**

No presente trabalho, o lignocresol foi avaliado como método de imobilização e reciclagem enzimática. Lignina é uma macromolécula tridimensional amorfa encontrada na parede celular de plantas que estão em associação com fibras de celulose e hemiceluloses. É composta de unidades fenilpropanóides formadas por polimerização de monômeros fenólicos. Essa macromolécula interage com a superfície hidrofóbica de celulases, causando a adsorção improdutiva. Com isso, gastos envolvendo o uso de uma variedade de enzimas são uma despesa importante para as empresas. É fato que, cada vez mais, as empresas que desenvolvem enzimas tentam maximizar a redução dos custos envolvidos na produção. No entanto, nem todas as medidas tomadas são eficazes. Com base nesta propriedade da lignina, foi desenvolvida uma solução de lignocresol sintetizado a partir de bagaço de cana-de-açúcar, que foi isolada através do extrator Soxhlet (água / etanol). Foi realizado o processo de separação de fases para a obtenção do lignocresol. A adsorção foi feita com o coquetel enzimático Cellic Ctec2 (Novozymes). Os resultados mostram que o lignocresol sintetizado adsorve as enzimas e apresenta-se como um candidato para aplicação em recuperação ou imobilização enzimática, porém, experimentos de hidrólise enzimática indicam que as enzimas quando interagem com o lignocresol perdem a atividade provavelmente pelo processo de imobilização exigindo mais estudos sobre esse processo de recuperação.

Palavras- chave: Lignina.Lignocresol.Cana-de-açúcar.enzimas

## 1.Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol, produzindo 28% do total mundial, apenas atrás dos Estados Unidos, que é o primeiro, e responsável por 57,5% da produção (RFA,2015). Na última safra 2017/2018, mais de 630 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram produzidos no Brasil, gerando 27,8 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2018).

Uma das etapas para produção do etanol 2G é a hidrólise, e essa pode ser por rota ácida e a enzimática. A hidrólise é importante para a quebra das ligações de celulose. Os processos ácidos são eficientes e mais baratos, porém, geram subprodutos inibidores da fermentação, além disso, em alguns casos, é necessário o uso de altas temperaturas e/ou pressões. Deste modo, a hidrólise enzimática é o alvo de estudos, já que gera maiores rendimentos e é feita a pressão ambiente, sem formação de subprodutos indesejáveis. Contudo existem limitações, como o alto custo das enzimas, o qual pode ser contornado com o uso da imobilização das enzimas, o que pode viabilizar economicamente o processo. (RABELO, 2007).

A aplicação de celulasas imobilizadas na hidrólise enzimática gera vantagens para o processo, sendo uma das principais, a reutilização de enzimas, permitindo uma maior produção de açúcar por massa de biocatalisador, mas também, as problemáticas em relação ao custo, estabilidade e recuperação das enzimas são grandes desafios para viabilizar técnica e economicamente o método (PEREIRA,2019).

A partir dessas considerações, o trabalho tem como objetivo sintetizar uma solução de lignocresol, a partir da lignina do bagaço de cana-de-açúcar afim de promover uma imobilização/recuperação dessas enzimas visando a reciclagem enzimática.

## **2. Metodologia**

### *2.1 Síntese do Lignocresol*

O bagaço de cana-de-açúcar foi extraído com Soxhlet com água por 24 horas, seguido de uma segunda extração com etanol por 24 horas. Para a síntese do lignocresol foi utilizada a metodologia do sistema de separação de fases, descrita anteriormente por Funaoka (1998). 1g de lignina foi colocada em um frasco de reação. 10 mL de p-Cresol (10 mL/g de lignina) foram adicionados em leve agitação com a mão por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 20 mL de ácido sulfúrico 72% (20 mL/g de lignina) sob agitação vigorosa por 1 hora. Todo o volume presente no frasco foi transferido a um tubo falcon de 50 mL para centrifugação da amostra (1ª centrifugação) por 20 min à temperatura ambiente (4000 rpm). O sobrenadante formado foi retirado do falcon e pipetado gota a gota em um volume de 200 mL de éter etílico frio sob vigorosa agitação (utilizado para remoção do ácido e parte do p-cresol). O precipitado aquoso formado foi recuperado por centrifugação (2ª centrifugação) à 5°C (4000 rpm) por 20 min e o sobrenadante descartado. O lignocresol presente no precipitado foi extraído com 80 mL de acetona e o volume da solução foi reduzida à, aproximadamente, 10 mL com auxílio de um Rotaevaporador à 40°C e rotação de 150 rpm. Após redução, a solução foi, novamente, pipetada gota a gota em 200 mL de éter etílico frio sob vigorosa agitação e a amostra centrifugada (3ª centrifugação) por 20 minutos a temperatura ambiente (4000 rpm). O sobrenadante será descartado e o pellet de lignocresol será seco em estufa à 50°C por aproximadamente 3 horas.

## 2.2 Adsorção de Celulases no Lignocresol

5 mg de lignocresol foram completamente dispersos com ajuda de um sonificador em 220 µl de tampão de Citrato de Sódio (50 mM, pH 4,8) em um microtubo (1,5 mL). O coquetel enzimático Cellic Ctec 2 adquirido da Sigma (St. Louis, MO) foi adicionado na concentração final de 1,9 g/l. A mistura foi agitada vigorosamente durante 12 h à temperatura ambiente num agitador (30 RPM) para permitir que a adsorção de celulase atingisse o equilíbrio. Após a adsorção, a mistura foi centrifugada durante 20 min a 1000 rpm. A concentração de proteínas não adsorvidas no sobrenadante foi medida usando um kit colorimétrico de detecção de proteínas o ácido bicinchonínico (BCA) (Thermo-Scientific, Rockford, IL), e lido no espectrofotômetro à 595 nm. A quantidade de enzima adsorvida foi calculada subtraindo a quantidade de enzima restante no sobrenadante da quantidade total de enzima adicionada.

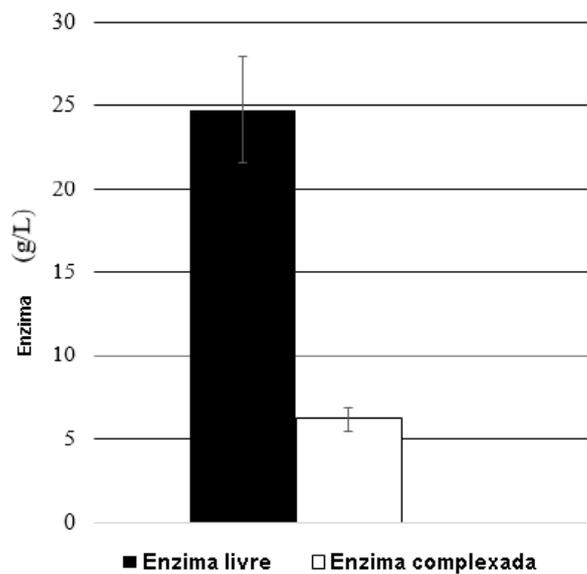
## 2.3 Hidrolise Enzimática

Os experimentos de hidrólise enzimática com o lignocresol de cana-de-açúcar foram realizados utilizando Solka Floc (5% p / v) e 0,5 mg de complexo de lignocresol (0,5% p / v). O volume total foi de 1 mL, pH 4,8, em tampão de citrato de sódio 50 mM em um tubo de centrífuga (1,5 mL). O controle foi realizado com Cellic Ctec 2 (8,4 FPU / mL) nas mesmas condições. Após a hidrólise de 72h, as amostras foram centrifugadas (1000 rpm durante 20 minutos) e os sólidos residuais foram lavados com 1000 µL de água DI e reutilizados para hidrolisar Solka Floc (5% p / v) durante 72 h de hidrólise que foi feita no mesmo tubo. Os sobrenadantes foram analisados utilizando o kit D-Glucose Assay Kit (GOPOD Format).

### 3.Resultados e Discussão

#### 3.1 Adsorção da celulase no lignocresol

A quantidade de celulase adsorvida no lignocresol é mostrada na figura 1. Valores semelhantes de adsorção foram observados com Eucalipto. O lignocresol proveniente de Eucalipto adsorveu 38% (Nonaka et al., 2011). No mesmo estudo foi mostrado o potencial de adsorção de lignocresol de Pinus que foi de 55%. O valor de adsorção de Eucalipto é o mais baixo entre as biomassas, o que pode ser explicado pelo tempo de equilíbrio de adsorção. O Eucalipto é uma madeira macia assim como é a cana-de-açúcar e, portanto, pode precisar de mais tempo para alcançar o equilíbrio da reação.



**Figura 1.** Adsorção de celulases em lignocresol proveniente de cana-de-açúcar.

Trabalhos anteriores do nosso grupo, mostram 100% de adsorção do coquetel Cellic Ctec3 em lignocresol proveniente de lignina do processo Kraft (BARDUCO, et al.,2019). Essa diferença de adsorção entre materiais pode ser explicada pelo tipo de pré-tratamento que essa biomassa foi submetida. Ligninas de diferentes materiais lignocelulósicos apresentaram diferentes capacidades de adsorção (NAKAGAME; CHANDRA; SADDLER, 2010). Outro ponto a considerar é a temperatura no momento da adsorção. Em nosso estudo, os ensaios foram conduzidos à temperatura ambiente (30°C). Zanchetta et al., 2017 mostra que a adsorção de enzimas celulolíticas na lignina do bagaço de cana-de-açúcar não modificada foi maior a 45°C. Neste mesmo estudo, mostra-se uma diferença na adsorção de enzimas de diferentes

microrganismos, como as enzimas de *N. niger* adsorvem menos que *T. reesei*, mas a temperatura ideal permanece 45 ° C.

### 3.2 Hidrolise enzimática

Os resultados da hidrólise indicam que não há atividade das enzimas ligadas ao lignocresol (Tabela 1). Quando a enzima interage com o lignocresol, há perda da atividade da celulase, semelhante à lignina não modificada (Ko et al., 2015). Nonaka et al. (2014) mostram que, com base na quantidade de açúcares redutores produzidos na hidrólise da CMC do lignocresol adsorvido com as celulases, a atividade das endoglucanases foi de aproximadamente 81% em comparação com a celulase nativa livre. Entretanto, nossos experimentos sugerem que essa atividade vem da celulase residual e não do complexo.

Tabela1- Resultado da Hidrolise

<i>Controle</i>	<b>81%</b>
<i>LC+Enzima</i>	<b>8%</b>

Algumas propriedades da enzima e seu comportamento podem mudar quando são imobilizadas. Muitos fatores levam a alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação à livre, diminuindo o rendimento do processo de imobilização (BICKERSTAFF, 1995). Alguns fatores são: efeito conformacional, efeitos eletrostáticos, efeitos difusionais (BICKERSTAFF, 1995). Sendo assim, a adsorção com o lignocresol inibe a atividade das enzimas durante a hidrólise enzimática, levando assim a mais estudos acerca de como dessorver as enzimas do lignocresol.

## 4. Conclusões

A adsorção da enzima lignocresol não pôde ser distinguida da adsorção de lignina. A modificação da superfície com p-cresol não fez diferença na taxa, extensão e retenção de atividade. A inclusão de um substituinte hidrofóbico não alterou as características da lignina.

## 5. Referências Bibliográficas

BARDUCO FERREIRA, M.T., et al. Studies of adsorptive capacity of bacterial  $\alpha$ -glucosidases on lignocresol aiming the enzymatic recycling in bioprocesses, *Biotechnology Reports* .2019, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00326>

BICKERSTAFF, G. Immobilization of Enzymes and Cells – Some Practical Considerations, *Methods in Biotechnology*, p.1-9,1995.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>.

FUNAOKA, M., New type of lignin-based network polymer with the structure-variable function composed of 1,1-diarylpropane units. *Polymer International*, v.47, p.277-290, 1998.

NAKAGAME, S.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v.105, p.871–9,2010.

NONAKA, H., et al., M.Adsorption of *Trichoderma reesei* cellulase on softwood lignin-based lignophenol. *J. Jap. Inst. Energy*,v. 90, p. 977– 981,2011.

KO, J.-K.,et al. Adsorption of Enzyme Onto Lignins of Liquid Hot Water Pretreated Hardwoods, *Biotechnology and Bioengineering*, v.112,p.447-456,2015.

PEREIRA, M.B. Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. 74f. (Dissertação de Mestrado) Goiânia: Instituto de Química. Universidade Federal de Goiás (UFG), GO. 2019.

RABELO, S. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 180f. (Dissertação de Mestrado) São

Paulo: Escola Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP. 2007.

RFA. Renewable Fuel Association. World fuel ethanol production – 2015 Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099788442-e48b2782-ea53>>

ZANCHETTA, A. et al.,.Temperature Dependent Cellulase Adsorption on Lignin from Sugarcane Bagasse. *Bioresource Technology*,v. 252, p.143-149,2017.

## Capítulo 5

### **Conclusões Finais**

Os gastos envolvendo utilização de celulases na produção de etanol 2G é uma das principais despesas para esse setor atualmente. O presente trabalho teve como objetivo solucionar tal problemática com a confecção do lignocresol. O lignocresol se torna uma opção viável para a utilização da lignina resultantes de processos indústrias e para reciclagem ou reaproveitamento enzimático em bioprocessos. Frente aos resultados obtidos nos testes de adsorção pudemos demonstrar que o lignocresol possui capacidade adsortiva à *TpBgl1* e *TpBgl3*, e também ao coquetel enzimático Celic Ctec 2 e 3 demonstrando seu grande potencial como suporte à recuperação e/ou reciclagem enzimática. Nossos estudos também mostram que as celulases quando complexadas ao lignocresol possuem baixa produtividade da sua atividade enzimática. Esse fato pode ser explicado, porque talvez o lignocresol se ligue a enzima em seu sítio ativo e seu processo de adsorção seja parecido com o da lignina nativa. Para dar continuidade aos estudos acerca dessa macromolécula e permitir a aplicação deste em processos de reciclagem de enzimas, ainda são necessários ensaios de dessorção para testar a viabilidade das enzimas, pois caso possua atividade, o lignocresol poderá ser utilizado como um substrato para promover a recuperação das enzimas nos processos industriais.