

ANDRÉA FRANCISCO DOS SANTOS

Produção e imobilização de celulasas em matriz de agarose com diferentes ativações químicas

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara
2014

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Andréa Francisco dos Santos

Filiação: José Baptista dos Santos Filho e Leniuza F. Francisco dos Santos

Nascimento: 25/07/1983 – Araçatuba- SP

Carteira de identidade: 43.909.520-7 SSP/SP – 10/04/2012

CPF: 315.362.568-97

Formação acadêmica/ titulação

- 2010** Doutorado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil
Doutorado sanduíche no instituto de Catalisis y Petroleoquímica–consejo Superior de Investigaciones Científicas (Orientador- José Manual Guisán)
Título: Produção e imobilização de celulases produzidas por *Aspergillus niger* e *Humicola grisea* var. *thermoidea*: obtenção de derivados ativos e estabilizados para a produção de glicose a partir de compostos celulósicos
Orientador: Rubens Monti
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES
- 2008-2010** Mestrado em Alimentos e Nutrição.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil
Título: Imobilização de invertase Comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em Sabugo de Milho e Bagaço de Cana-de açúcar.
Orientador: Rubens Monti

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2002-2006 Graduação em Biomedicina

Centro Universitário de Araraquara- UNIARA, São Paulo- Brasil

Formação complementar

2006 - 2006 Curso de curta duração em Técnicas Básicas de Primeiros Socorros. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Biodinâmica e pontos reativos na acupuntura. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Técnicas de coleta de Sangue venoso. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Peçonhas e Envenenamento. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Marcadores Tumoriais. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em HIV/AIDS: Impacto na sociedade. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Atualização em Medicina Laboratorial. Health consultoria e treinamento, HCT, Brasil

2002 - 2002 Curso de curta duração em Suporte Básico de Vida no laboratório Clínico. Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

Atuação profissional

1. Instituto de Química- Universidade Estadual Paulista- IQ-UNESP

2010 - Atual Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Doutoranda em

Biotecnologia. Regime: Dedicação exclusiva
2008 - 2010 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda em Biotecnologia. Regime: Dedicação exclusiva
2006 - 2006 Vínculo: Estagiária. Enquadramento funcional: Estagiária
Regime: Dedicação exclusiva

2. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – ICP

2011-2012 Vínculo: Doutorado Sandúiche. Enquadramento funcional: Estagiária. Carga horária: 40. Regime: Dedicação exclusiva

3. Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Araraquara

2003 – 2005 Vínculo: Estagiária. Enquadramento funcional: Estagiária
Regime: Dedicação parcial

Linhas de Pesquisa

1. Imobilização de enzimas em suportes sólidos
2. Produção e caracterização de enzimas microbianas

Áreas de atuação

1. Enzimologia
2. Imobilização de Enzimas
3. Microbiologia

Prêmios e títulos

2011 Menção Honrosa no Prêmio Bunge de Inovação em Tecnologia de Alimentos, 9 SLACA- Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos

Produção bibliográfica

1. GOULART, A.; BASSAN, J. C.; BARBOSA, O.; MARQUES, D. P.; SILVEIRA, C. B.; SANTOS, A. F.; GARRIDO, S. S.; RESENDE, A. S.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Transport of amino acids from milk whey by Caco-2 cell monolayer after

- hydrolytic action of gastrointestinal enzymes. **Food Research International.**, p. 1-9, 2014.
2. BENEDETTI, A. C. E. P.; COSTA, E. D.; ARAGON, C. C.; **SANTOS, A. F.**; GOULART, A. J.; ATILLI-ANGELIS, D.; MONTI, R. Low-cost carbono sources for the production of a thermostable xylanase by *Aspergillus niger*. **Revista de ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.**, v. 34, n. 1, p. 25-31, 2014.
 3. ARAGON, C. C.; SANTOS, A. F.; RUIZ-MATUTE, A. I.; CORZO, N.; GUIBAN, J. M.; MONTI, R.; MATEO, C. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized-stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic.**, v. 98, p. 8 -14, 2013.
 4. VINUEZA, J. C. G.; **SANTOS, A. F.**; BASSAN, J. C.; GOULART, A.; MONTI, R. Bromophenol blue discoloration using peroxidase immobilized on highly activated corn cob powder. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.**, v.34, p. 321 - 326, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SANTOS, A. F., GALAN, J. P. M., GOULART, A, MONTI, R. Production of celooligosaccharides by agarose-glutaraldehyde- endoglucanase derivative. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2013, Campinas, SP, Brasil.
2. GALAN, J. P. M., SANTOS, A. F., MONTI, R, GOULART, A. Purification and characterization of naringinase from *Penicillium ducumbens*. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2013, Campinas, SP, Brasil.
3. ARAGON, C. C, SANTOS, A. F., GOULART, A, MATEO, C, GUIBAN, J.M, MONTI, R. Production of xylooligosaccharides by Xylanase of *Aspergillus niger* Immobilized on Glyoxil Agarose. In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2012, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.
4. BASSAN, J.C, SANTOS, A. F., NASSER, A.L.M, MONTI, R, GOULART, A
5. Avaliação das proteínas do soro de leite de búfala pela ação enzimas digestivas adicionadas em conjunto ou separadamente em diferentes momentos da reação. SP In: 9 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: " Ciência de Alimentos e Qualidade de Vida: "Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade", 2011, Campinas, SP, Brasil.
6. SANTOS, A. F., ARAGON, C. C, BEZERRA, T. M. S., GOULART, A, VINUEZA, J. C. G, MONTI, R. Imobilização de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* em pó de sabugo de milho e aplicação em reator enzimático para produção de xarope de açúcar invertido. In: 9 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Alimentos e Qualidade de Vida: "Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade", 2011, Campinas, SP, Brasil.

7. VINUEZA, J. C. G, LOUREIRO, R. M, SANTOS, A. F., MONTI, R. Imobilização multipontual das peroxidases da casca da soja em suporte sabugo de milho. In: Congresso Farmacêutico, 2011, Araraquara, SP, Brasil.
8. VINUEZA, J. C. G, SANTOS, A. F.; GOULART, A.; MONTI, R, MARCIELLO, M.; GONZALES, C. M. Multipoint Immobilization Of Soybean Hull And Horseradish Peroxidases On Agarose Support In: 7 th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, 2011, Opatija, Croácia.
9. LOUREIRO, R. M.; SANTOS, A. F.; ARAGON, C. C.; VINUEZA, J. C. G.; GOULART, A.; BASSAN, J. C.; DELGADO, I. L.; MONTI, R. Produção de xilanase Local: Brasil; Cidade: Araraquara - São Paulo; In: Congresso Farmacêutico, 2011, Araraquara, SP, Brasil.
10. ABREU, K. S.; SANTOS, A. F.; NASSER, A. L. M.; BEZERRA, T. M. S.; VINUEZA, J. C.G.; GOULART, A.; MONTI, R. Produção de xilanase por fungo isolado da castanha de macadâmia cultivado em xilana. In: Congresso Farmacêutico, 2011, Araraquara, SP, Brasil.
11. SANTOS, A. F.; ARAGON, C. C.; GOULART, A, LOUREIRO, R. M.; VINUEZA, J. C. G.; MONTI, R. Imobilização de Invertase Comercial de *Saccharomyces cerevisiae* em Sabugo de Milho e Bagaço de Cana-de-Açúcar. In: IX Seminário brasileiro de tecnologia enzimática, 2010, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
12. SANTOS, A. F.; ARAGON, C. C.; VINUEZA, J. C. G.; PARREIRA, D. M.; MONTI, R. Imobilização de Invertase de leveduras do gênero *Saccharomices cerevisiae* em caulim. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas-PE, Brasil.
13. ARAGON, C. C.; COSTA, E. D.; BENEDETTI, A. C. E. P, VINUEZA, J. C. G.; SILVEIRA, C. B.; SANTOS, A. F.; MONTI, R. Xylanase Production by Thermophilic Fungus (Fcup) Using Corn-cob: Immobilization in Amino and Glutaraldehydo Agarose. In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia, SP, Brasil.
14. SANTOS, A. F.; BENEDETTI, A. C. E. P.; MARQUES, D.P.; COSTA, E. D.; MONTI, R. Extração de invertase intracelular de *Saccharomyces cerevisiae* por diferentes métodos e imobilização em caulim. In: Jornada Farmacêutica da Unesp, 2008, Araraquara, SP, Brasil.

ANDRÉA FRANCISCO DOS SANTOS

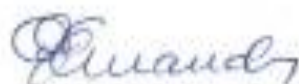
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 25 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. RUBENS MONTI (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO ERNANDES
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Profª. Drª. ELEONORA CANO CARMONA
Instituto de Biociências / UNESP / Rio Claro



Prof. Dr. HAMILTON CABRAL
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto



Profª. Drª. SANDRA HELENA DA CRUZ
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / USP / Piracicaba

Dedico

*aos meus pais, José e Leniuza, pelo:
carinho, apoio, confiança e incentivo*

Agradeco

a Deus, pelo dom da vida.

ao Prof. Dr. Rubens Monti, pela orientação, carinho e, principalmente, pelos ensinamentos, incentivo e dedicação durante a elaboração desta pesquisa. Obrigada por ser um exemplo de caráter e profissionalismo.

ao Dr. José Manuel Guisán, pela orientação e acolhimento em seu laboratório.

ao Dr. César Mateo Gonzáles, pelos ensinamentos e orientação para a elaboração desta pesquisa

ao Prof. Dr. Luís Henrique S. Guimarães e à Prof.^a Dr.^a Daniela A. Bocchi, pela contribuição no meu exame de qualificação.

ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, pela doação da cepa de *H. grisea*. var. *thermoidea*.

aos meus colegas de laboratório, Ana Lúcia Nasser, Ana Lúcia Chung, Antônio, Juliana, Júlio, Julian, Thaís, Caio e Vinícius.

aos meu colegas do CSIC (MADRID- ES)- Jana, Palomo, Javi, Marco, Marzia, Oscar, Yanosvska, Willian, Caio, Lionete, Flávio, Marília e Ana Lúcia.

os professores, funcionários e pós-graduandos da Faculdade de Ciências e Farmacêuticas e do Instituto de Química (UNESP-Araraquara).

ao Caio e Ederlan, obrigada pelas conversas e ensinamentos.

ao meu adorável amigo e companheiro de quatro patas, Plínio.

à minha família, pelo apoio e amor. Amo vocês!

aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e sogra, pelo carinho e dedicação.

ao meu avô pela eterna sabedoria.

ao meu querido e futuro esposo, Fábio Barata, amigo, companheiro, pai, irmão, namorado e marido. Obrigada por fazer parte da minha vida, te amo!

aos meus amigos pelas imemoráveis histórias e por me proporcionarem felicidade.

Kdu, Marta, Messias, Jader, Paloma, Teco, Miriam, José Carlos, Alan, Michele, Carminha, Marilza, Cristiane, Julio (Buinha), Karina, Maria Olívia, Jéssica, Meline, Juliana (Buduga), Tarsia, Vagner, Caio e Ederlan.

à CAPES, pela bolsa de doutorado.

à Fundação Carolina/ CAPES pela bolsa de doutorado-sanduíche.

Sê

Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,

Sê um arbusto no vale mas sê

O melhor arbusto à margem do regato.

Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.

Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva

E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,

Sê apenas uma senda,

Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.

Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...

Mas sê o melhor no que quer que sejas.

Pablo Neruda

RESUMO

RESUMO

As endoglicanases EC 3.2.1.4 são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 da celulose, resultando na liberação de glicose, celobiose e celooligosacarídeos. Empregadas mundialmente em diversos processos industriais, por exemplo, como amaciante de tecidos de algodão e bioestonagem de jeans, na extração de sucos de frutas, na adição em detergentes comerciais, na fabricação de cerveja, e na produção de papel e de etanol. Atualmente, há um grande interesse em enzimas que hidrolisem biomassa lignocelulósica para obtenção de etanol de segunda geração. A imobilização de enzimas em matrizes sólidas oferece muitas vantagens, entre as quais, reuso da enzima, a fácil separação do produto e o aumento da estabilidade operacional. Os objetivos deste trabalho foram: produzir CMCase secretadas por *Aspergillus niger* e *Humicola grisea* var. *thermoidea* em cultivo sólido e submerso; imobilizar CMCase em suporte agarose com diferentes ativações químicas; determinar a estabilidade térmica e as propriedades cinéticas dos derivados obtidos, comparando-os com as enzimas livres; avaliar a capacidade de reuso dos derivados ativos e estáveis e analisar qualitativamente o produto de hidrólise dos substratos celulósicos. O fungo *A. niger* secretou grandes quantidades de CMCase, 34,1 U.mg⁻¹, em meio Vogel, utilizando pó de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. O pH 5 foi determinado como o ótimo para a enzima, apresentando instabilidade ao pH 10. Com a utilização de aditivos estabilizante, a trealose a 10% (m/v), manteve, em pH 10, 80% de atividade residual, por 25 horas. Em relação à temperatura, apresentou uma faixa ampla de atividade entre 45°C a 75°C, tendo como temperatura ótima 65°C. O derivado enzimático que ofereceu melhor estabilidade foi aquele em que a imobilização foi conduzida juntamente com o substrato carboximetilcelulose (CMC 1%), em suporte glutaraldeído-agarose (70% de grupos reativos), preservando 35% de atividade catalítica a 60 °C por 250 horas. Através da análise qualitativa em TLC constatou-se que o derivado foi capaz de hidrolisar, por 16 horas, a CMC 1% (m/v), liberando glicose e resquícios de celobiose, assim como a enzima solúvel. O fungo *H. grisea* secretou favoravelmente 14,8 U.mg⁻¹ da enzima CMCase, em meio M6 composto por Avicel® como fonte de carbono. O pH 6 foi determinado como ótimo, sendo que em pH 8-10 a enzima preservou 80% de sua atividade residual após 5 horas. A temperatura considerada ótima foi de 50°C. O melhor derivado enzimático foi obtido quando a condução da imobilização ocorreu na presença de CMC 1%, em suporte MANAE-agarose (70 μ mol de grupos aminos). Este derivado mostrou-se eficiente para a hidrólise da CMC 1% (m/v) por 16 horas, assim como a enzima solúvel. O coquetel enzimático, imobilizado ou solúvel, composto na proporção 1:1 por ambos os extratos, apresentaram-se promissores para a hidrólise de substratos celulósicos, assim como a reutilização do derivado. A análise qualitativa revelou que o produto de sacarificação foi composto por glicose, celobiose e xilose. Este trabalho é um passo importante no avanço biotecnológico para a produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*. *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Etanol de segunda geração. Imobilização de enzimas.

ABSTRACT

The endoglucanases EC 3.2.1.4 are enzymes that hydrolyze the β -1, 4 glycosidic linkages of the cellulose producing glucose, cellobiose and cello-oligosaccharides. Used worldwide in many industrial processes such as fabric softener and bioestonagem cotton jeans, extraction of fruit juices, in the addition of commercial detergents, in brewing, and the production of paper and ethanol. Currently, there is great interest in enzymes that hydrolyze lignocellulosic biomass to obtain second-generation ethanol. The immobilization of enzymes on solid arrays provides many advantages as the enzyme reuse, easy separation of the product and increased operational stability. The aims of this study were to produce secreted: CMCase produced by *Aspergillus niger* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* in solid and submerged cultivation; CMCase immobilized on agarose support with different chemical activations; determine the thermal stability and kinetic properties of the derivatives obtained comparing them with the free enzyme; evaluate the reuse capacity assets and stable derivatives and qualitatively analyze the product of hydrolysis of cellulosic substrates. The fungus *A. niger* secreted large amounts of CMCase, 34.1 U.mg⁻¹ amid Vogel, using powdered sugarcane bagasse as a carbon source. The pH of 5 was determined as the optimum for the enzyme, presenting instability to pH 10. With the use of stabilizing additives, the 10% trehalose (w / v), kept at pH 10, 80% residual activity for 25 hours. Regarding temperature there was a broad activity range from 45 °C to 75 °C and the optimum temperature as 65 °C. The enzyme derivative which offered better stability was one in which immobilization was conducted with the carboxymethylcellulose substrate (1% CMC) in agarose support Glutaraldehyde (70% of reactive groups), preserving catalytic activity of 35% at 60 °C for 250 hours. Through qualitative TLC analysis, it was found that the derivative is able to hydrolyse for 16 hours the CMC 1% (w / v), releasing traces of cellobiose and glucose, as well as the soluble enzyme. The fungus *H. grisea* secreted favorably 14.8 U.mg CMCase-1 enzyme in M6 medium comprising Avicel® as a carbon source. The pH 6 was determined as optimal, whereas at pH 8-10 the enzyme preserved 80% residual activity after 5 hours. The optimal temperature was 50°C. The best enzyme derivative was obtained when immobilization conducting occurred in the presence of 1% CMC in manae agarose support (70µmol of amino groups). This derivative was efficient for the hydrolysis of CMC 1% (m / v) for 16 hours, as well as the soluble enzyme. The immobilized or soluble enzyme cocktail, composed 1:1 by both extracts showed to be promising for the hydrolysis of cellulosic substrates, as well as the reuse of the derivative. Qualitative analysis revealed that the product comprised saccharification of glucose, xylose and cellobiose. This research is an important step in advancing biotechnology for the production of second-generation ethanol.

Key-words: *Aspergillus niger*. *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Second-generation ethanol. Enzyme immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Esquema mostrando o mecanismo de ação enzimática do sistema celulolítico em <i>Trichoderma reesei</i> .	28
Figura 2 –	Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.	30
Figura 3 –	Representação esquemática dos métodos reversíveis de imobilização de enzimas.	33
Figura 4 –	Representação esquemática dos métodos irreversíveis de imobilização de enzimas.	33
Figura 5 –	Estrutura química básica da agarose, formada por repetidas unidades de agarobiose.	35
Figura 6 –	Ativação química da agarose para obtenção do suporte glioxil.	51
Figura 7 –	Ativação química da agarose para obtenção do suporte MANAE	51
Figura 8 –	Representação esquemática dos processos para ativação da agarose.	52
Figura 9 –	Representação esquemática do processo de imobilização para a obtenção do derivado enzimático.	54
Figura 10 –	Características morfológicas macroscópicas e microscópica através de microscopia óptica em aumento de 400x do conidióforo do fungo <i>Aspergillus niger</i> .	57
Figura 11 –	Fluxograma representando o procedimento de imobilização da enzima celulase extracelular de <i>A. niger</i> em MANAE-agarose visando a purificação parcial do extrato obtido por fermentação em estado sólido.	59
Figura 12 –	SDS-PAGE do extrato bruto de <i>Aspergillus niger</i> (A) Fonte de carbono pó de sabugo de milho; (B) Fonte de carbono pó de bagaço de cana-de-açúcar.	62
Figura 13 –	Efeito do pH na atividade da CMCase do filtrado de <i>Aspergillus niger</i> .	65
Figura 14 –	Estabilidade da CMCase do filtrado de <i>Aspergillus niger</i> em pH 10,0.	65

Figura 15 –	Estabilidade da CMCase do filtrado de <i>Aspergillus niger</i> em pH 10,0 na presença de aditivo estabilizante.	66
Figura 16 –	Efeito da temperatura na atividade da CMCase do filtrado de <i>Aspergillus niger</i> .	67
Figura 17 –	Estabilidade térmica da CMCase de <i>Aspergillus niger</i> , após 30 minutos de incubação, nas diferentes temperaturas.	67
Figura 18 –	Estabilidade térmica da CMCase de <i>Aspergillus niger</i> a pH 7,0 incubada nas diferentes temperaturas.	68
Figura 19 –	Curso de imobilização da CMCase de <i>Aspergillus niger</i> em glutaraldeído-agarose 4 CL.	69
Figura 20 –	Representação esquemática do processo de imobilização sobre a superfície de um suporte.	70
Figura 21 –	Inativação térmica a 60°C da enzima CMCase livre de <i>Aspergillus niger</i> em suporte glutaraldeído-agarose.	71
Figura 22 –	Inativação térmica a 60°C da CMCase de <i>Aspergillus niger</i> em suporte agarose com 30 e 70 µmol de grupos reativos.	72
Figura 23 –	Influência da temperatura na atividade enzimática da CMCase imobilizada em glutaraldeído-agarose e MANAE-agarose.	73
Figura 24 –	Cromatografia em camada delgada TLC representando produto de hidrólise de 1% carboximetilcelulose por enzimas livres e derivados de <i>Aspergillus niger</i> .	75
Figura 25 –	Características morfológicas macroscópicas e microscópica através de microscopia óptica em aumento de 400x do conidióforo do fungo <i>H. grisea</i> .	76
Figura 26 –	SDS-PAGE do extrato bruto de <i>H. grisea</i> em diferentes tempos de fermentação, utilizando como fonte de carbono Avicel® 1%.	78
Figura 27 –	Efeito do pH na atividade da CMCase do filtrado de <i>H. grisea</i> .	80
Figura 28 –	Estabilidade da CMCase do filtrado de <i>H. grisea</i> em diferentes valores de pH a 25°C.	81
Figura 29 –	Efeito da temperatura na atividade da CMCase do filtrado de <i>H. grisea</i> .	82

Figura 30 –	Estabilidade térmica da CMCase de <i>H.grisea</i> , após 30 minutos de incubação, nas diferentes temperaturas.	82
Figura 31 –	Curso de imobilização da CMCase de <i>H. grisea</i> em MANAE-agarose e glutaraldeído-agarose 6CL.	83
Figura 32 –	Cromatografia em camada delgada TLC representando produto de hidrólise de 1% carboximetilcelulose por enzimas livres e derivados de <i>H. grisea</i> .	85
Figura 33 –	Inativação térmica a 65°C e 70°C dos derivados de CMCase de <i>H. grisea</i> em suporte Agarose-MANAE.	86
Figura 34 –	Inativação térmica em diferentes temperaturas de CMCases de <i>A. niger</i> ; <i>H. grisea</i> solúveis: comparação entre os derivados Coq-glutaraldeído-agarose, na presença e ausência do substrato carboximetilcelulose 1%.	90
Figura 35 –	SDS-PAGE dos produtos de imobilização dos derivados Coq-glutaraldeído-agarose secretadas por <i>A. niger</i> e <i>H. grisea</i> .	91
Figura 36 –	Hidrolise do substrato celobiose 1% pelo coquetel imobilizado em glutaraldeído-agarose.	92
Figura 37 –	Ciclos consecutivos de hidrólise da celobiose 1% (m/v) pelo coquetel imobilizado em glutaraldeído-agarose.	93
Figura 38 –	Perfil de hidrolise do substrato carboximetilcelulose 1% (m/v) pelas enzimas celulases secretadas por <i>H. grisea</i> e <i>A. niger</i> .	94
Figura 39 –	Ciclos consecutivos de hidrólise da carboximetilcelulose 1% (m/v) pelo coquetel imobilizado em glutaraldeído-agarose.	94
Figura 40 –	Processo de sacarificação de compostos celulósicos em diferentes tempos pelo coquetel enzimático solúvel.	95
Figura 41 –	Processo de sacarificação por 20 horas de compostos celulósicos pelo coquetel de enzimas solúveis e derivados.	96
Figura 42 –	Processo de sacarificação por diferentes tempos em distintas polpas de compostos celulósicos pelo derivado Coq-glutaraldeído-agarose e coquetel solúvel.	97
Figura 43 –	Cromatografia em camada delgada TLC representando produto de hidrólise de 96 horas da polpa de compostos celulósicos por enzimas solúveis e derivados do coquetel de <i>A. niger</i> e <i>H. grisea</i> .	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comparação entre os métodos de imobilização reversível e irreversível.	34
Tabela 2 –	Atividade celulolítica e xilanolítica dos filtrados de cultura do fungo <i>A. niger</i> , utilizando pó de sabugo de milho 1% em diferentes tempos.	61
Tabela 3 –	Atividade celulolítica e xilanolítica dos filtrados de cultura de <i>A. niger</i> , utilizando pó de bagaço de cana-de-açúcar 1% em diferentes tempos.	61
Tabela 4 –	Atividade da CMCase, β glicosidase e xilanase após a precipitação do extrato enzimático com acetona.	63
Tabela 5 –	Perfil de hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) pela CMCase de <i>Aspergillus niger</i> .	64
Tabela 6 –	Atividade recuperada da CMCase de <i>Aspergillus niger</i> , imobilizada em agarose com diferentes ativações.	74
Tabela 7 –	Atividade da CMCase dos filtrados de cultura do fungo <i>H. grisea</i> , utilizando distintas fontes de carbonos em diferentes tempos.	77
Tabela 8 –	Atividade celulolítica e xilanolítica dos filtrados de cultura do fungo <i>H. grisea</i> , utilizando avicel® 1% em diferentes tempos.	78
Tabela 9 –	Atividade da CMCase, β glicosidase e xilanase após a precipitação do extrato enzimático com etanol.	79
Tabela 10 –	Perfil de hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) pela CMCase de <i>H. grisea</i> .	80
Tabela 11 –	Representação percentual de atividade recuperada dos derivados de <i>H. grisea</i> .	84
Tabela 12 –	Carga proteica de enzimas celulolíticas e xilanolíticas oferecidas ao suporte para imobilização.	88
Tabela 13 –	Perfil do rendimento de imobilização em MANAE-agarose e atividade recuperada em glutaraldeído-agarose.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	atividade recuperada
CD	domínio catalítico
CBD	domínio de ligação ao substrato
COQ	coquetel enzimático
CL	entrecruzado (a) (cross-linked)
CMC	carboximetilcelulose
CPS	Centipoise
DNS	ácido dinitrosalicílico
EA	energia de ativação
EDA	Etilenodiamina
MANAE	monoamino-n-aminoetil
nm	Nanômetro
RI	rendimento de imobilização
TLC	cromatografia em camada delgada
U	unidade enzimática
ND	não detectado

SUMÁRIO

1 Introdução	25
1.1 Produção de enzimas	25
1.2 Celulose	26
1.3 Celulases	26
1.4 Mecanismo de ação	27
1.5 Aplicação	28
1.6 Bioetanol	29
1.7 Organismos de estudo	31
1.7.1 <i>Aspergillus niger</i>	31
1.7.2 <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	31
1.8 Imobilização de enzimas	32
1.8.1 Imobilização de celulases	35
2 Objetivos	38
2.1 Objetivos geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 Material e Métodos	40
3.1 Microrganismos	40
3.2 Suportes	40
3.3 Manutenção do microrganismo	40
3.4 Obtenção de conídios	40
3.5. Fermentação para produção de celulalases de <i>A. niger</i>	41
3.5.1 Meios de cultivo sólido	41
3.5.2 Meio de cultivo submerso (líquido)	41
3.5.2.1 Composição do meio Vogel	42
3.6 Meio de cultivo submerso para produção de celulases de <i>H. grisea</i>	43
3.7 Obtenção do pó bagaço de cana-de-açúcar “pré-tratamento físico”	43
3.8 Processo de pré-tratamento físico-químico do pó de bagaço de cana-de-açúcar	44
3.9 Obtenção de polpa celulósica	44
3.10 Dosagem de proteínas	44
3.11 Atividade enzimática para CMCase, Avicelase e Xilanase	45
3.12 Atividade para β -glicosidase	46

3.13 Determinação da quantidade de glicose residual pelo método com Glicose Oxidase	46
3.14 Atividade para celobiase	46
3.15 Atividade para o coquetel enzimático	47
3.16 Substratos para o processo de sacarificação	47
3.17 Sacarificação enzimática de celulose	47
3.18 Determinação da Temperatura ótima	48
3.19 Estabilidade frente à temperatura	48
3.20 Determinação de pH ótimo	48
3.21 Determinação da estabilidade enzimática ao pH	48
3.22 Inativação térmica	49
3.23 Determinação da estabilidade enzimática ao pH 10,0 na adição de aditivos estabilizantes da CMCase de <i>A. niger</i>	49
3.24 SDS-PAGE	49
3.25 Cromatografia de Camada Delgada de sílica (TLC) dos produtos de hidrólise	49
3.26 Reuso dos derivados	50
3.27 Preparação de suportes para a imobilização de enzimas	50
3.27.1 Preparo inicial do suporte agarose 4 e 6 CL	50
3.27.2 Suporte oxidado (Glioxil)	51
3.27.3 Momonoaminoacetil- N- aminoetil agarose (MANAE- agarose)	51
3.27.4 Glutaraldeído-agarose	52
3.27.5 Imobilização das celulasas produzidas por <i>A. niger</i> e <i>H. grisea</i>	52
3.27.6 Entrecruzamento com glutaraldeído dos derivados obtidos com o coquetel enzimático	53
3.27.7 Acompanhamento do processo de imobilização	53
3.27.8 Rendimento de imobilização	54
3.27.9 Atividade recuperada	55
3.28 Análise dos dados	55
4 Resultados e Discussão	57
4.1 Celulasas de <i>Aspergillus niger</i>	57
4.1.1 Identificação do fungo	57
4.1.2 Produção e padronização do extrato enzimático produzido por <i>A. niger</i>	58
4.1.2.1 Produção de celulasas em estado sólido	58
4.1.2.2 Produção de celulasas em meio submerso	60
4.1.3 Ensaio cinéticos da CMCase produzida por <i>Aspergillus niger</i>	63
4.1.3.1 Perfil de hidrólise do substrato carboximetilcelulose	63

4.1.3.2 pH ótimo	64
4.1.3.3 Estabilidade ao pH	65
4.1.3.4 Temperatura ótima	66
4.1.3.5 Estabilidade térmica	67
4.1.3.6 Estudos de imobilização das celulasas produzidas por <i>Aspergillus niger</i>	68
4.1.3.7 Estabilidade do derivado CM-agarose.....	71
4.1.3.8 Temperatura ótima dos derivados CM-agarose	73
4.1.3.9 Atividade recuperada.....	73
4.1.3.10 Análise dos produtos de hidrólise.....	74
4.6 Celulasas de <i>Humicola grisea</i> . var. <i>thermoidea</i>	76
4.6.1 Identificação do fungo	76
4.6.2 Fermentação em meio-submerso.....	76
4.2 Ensaios cinéticos da CMCase produzida por <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> ..	79
4.2.1 Perfil de hidrólise do substrato carboximetilcelulose	79
4.2.2 pH ótimo	80
4.2.3 Estabilidade ao pH	81
4.2.4 Estabilidade térmica	82
4.2.5 Estudos de imobilização.....	83
4.2.5.1 Atividade recuperada.....	84
4.2.5.2 Estabilidade dos derivados CM-MANAE-agarose	85
4.3 Estudos de imobilização de celulasas de <i>A. niger</i> e <i>H. grisea</i> e coquetel enzimático dos respectivos fungos.....	86
4.3.1 Estudo comparativo de imobilização através de entrecruzamento.....	86
4.3.2 Rendimento de imobilização e Atividade recuperada.....	88
4.3.3 Inativação térmica	89
4.3.4 SDS-PAGE	90
4.4 Estudos de hidrólise de materiais celulósicos pelo coquetel enzimático e derivados enzimáticos obtidos através de extratos enzimáticos secretados por <i>A. niger</i> e <i>H. grisea</i>	92
4.4.1 Hidrólise do substrato celobiose 1%.....	92
4.4.2 Reuso dos derivados na hidrólise da celobiose.....	93
4.4.3 Hidrólise do substrato carboximentilcelulose 1%.....	93
4.4.4 Reuso do derivado na hidrólise da carboximentilcelulose.....	94
4.4.5. Sacarificação de material celulósico.....	95
4.4.6 Cromatografia em camada delgada.....	98

5. Conclusões	101
Referências	104
Apêndice.....	111

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Produção de enzimas

Presentes em todas as células vivas, as enzimas exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular. Os microrganismos são as principais fontes produtoras de enzimas industriais com diferentes atividades catalíticas. A produção das enzimas ocorre através de processos fermentativos em pequena e grande escala utilizando meios de cultivo líquidos ou sólidos constituídos de requerimentos nutricionais (BON et al., 2008). A partir dos anos 90 houve aumento da preocupação com as questões ambientais, com a qualidade dos produtos e com o consumo de energia no mundo todo. Por estes motivos, os governos e empresas vêm incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias “limpas”, mais sofisticadas e de baixo custo. Neste contexto, a tecnologia enzimática surgiu como uma alternativa para a substituição gradual de processos químicos por processos biocatalisados (BON; PEREIRA, 1999).

É de conhecimento que o uso de microrganismos como leveduras, bactérias e fungos filamentosos são de grande interesse na aplicação de processos fermentativos para a produção de enzimas úteis. Os filtrados de cultivos podem ser denominados como extratos enzimáticos ou proteicos. Os fungos filamentosos destacam-se, entre os microrganismos, por produzirem enzimas de grande aplicabilidade devido a suas características, como a facilidade de cultivo e por secretarem suas enzimas diretamente ao meio em que se encontram (SINGHANIA, 2011).

A utilização de enzimas em bioprocessos industriais incluem a escolha do microrganismo a ser manipulado, devendo este ajustar-se a uma série de características preferenciais. Dentre as quais incluem a elevada capacidade de conversão do substrato em produto; a tolerância a altas concentrações de substrato e de produto, ter estabilidade fisiológica, ser pouco exigente quanto às condições de cultivo e não requerer condições operacionais dispendiosas (LEISOLA et al., 2002).

1.2 Celulose

Considerado o maior polissacarídeo encontrado em paredes de plantas, a celulose é um carboidrato que apresenta um entrelaçamento de hemicelulose e lignina, essas características conferem a capacidade estrutural na parede celular de plantas (JUTURU; WU, 2014). Esse polissacarídeo é formado por resíduos de glicose ligadas através de ligações covalentes β -1,4-glicosídicas, as cadeias assim formadas são unidas entre si por pontes de hidrogênio. As hemiceluloses (polissacarídeo não celulósico, que inclui xilanas, mananas e glucanas) recobrem toda a fibra celulósica, sendo classificados como polissacáridos formados principalmente por resíduos de D-xilose com possíveis ramificações de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucorônico e ácido manurônico. Ligninas (compostos com estrutura polifenólica complexa) são denominadas como redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas (OGEDA; PETRI, 2010; KUMAR et al., 2008).

A interação por pontes de hidrogênio, que unem as fitas de celulose, faz com que haja formação de microfibrilas com regiões altamente ordenadas, conferindo características de insolubilidade, rigidez e resistência a degradação enzimática, essas regiões são conhecidas como cristalinas. Após o rompimento dessas pontes, formam-se regiões denominadas amorfas, permitindo a hidratação e melhor acessibilidade para a degradação enzimática (CASTILLO et al., 2002).

1.3 Celulases

As celulases são enzimas com capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas β 1,4 da celulose, estando presentes em 13 das 82 famílias das hidrolases glicosídicas identificadas através de análise sequencial molecular. Estas enzimas liberam como principais produtos de hidrólise a glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos (SINGHANIA et al. 2010). O complexo celulolítico utiliza como substrato a celulose. Essas enzimas são divididas em três tipos, sendo elas: endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases.

As endoglicanases ou endo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.4 Cx-celulase) hidrolisam as cadeias de celulose internamente de modo aleatório. Essas enzimas

hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como a carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) (LYND et al., 2002)

As exoglicanases ou exo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.91 celobio-hidrolase) agem nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose, produzindo em maiores quantidades a celobiose, além de glicose e celotriose. Essas enzimas não atuam sobre celuloses solúveis por haver impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, seja carboximetílico (CMC) ou hidroxietílico (HEC). As exoglicanases atuam sobre celulose microcristalina (Avicel®), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização (LYND et al., 2002). As β -glicosidases (EC 3.2.1.21 celobiase) rompem a celobiose, liberando glicose.

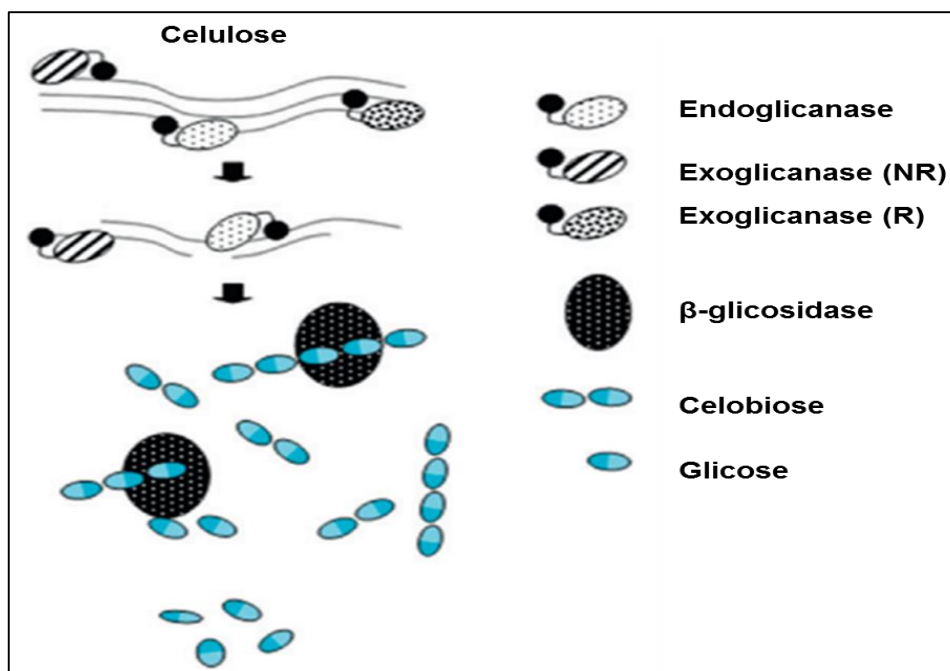
Celulases fúngicas têm uma arquitetura simples, contendo um domínio catalítico (CD) e um domínio de ligação ao substrato (CBD). O CD está ligado à CBD por meio de um peptídeo ligante, funcionando como uma âncora do CBD para o substrato celulose, permitindo que o CD desempenhe a sua função catalítica. (JUTURU; WU, 2014).

1.4 Mecanismo de ação

O fungo mais estudado, que explica o mecanismo de ação das celulases, é o *Trichoderma reesei*. Para a hidrólise completa da celulose, o sinergismo entre as três principais enzimas (endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases) é requerido (ARO et al., 2005).

As endoglicanases hidrolisam aleatoriamente as ligações glicosídicas β 1-4 em regiões amorfas da cadeia da celulose, produzindo novas porções terminais e celo-oligossacarídeos. As exoglicanases clivam a cadeia de celulose liberando glicose, e as β -glicosidases hidrolisam celobiose e celo-oligossacarídeos em glicose (SUKUMARAN et al., 2005; ZHANG et al., 2006). Este processo ocorre simultaneamente, de acordo com a Figura 1.

Figura 1 – Esquema mostrando o mecanismo de ação enzimática do sistema celulolítico em *Trichoderma reesei*.



Fonte: (modificado de Singhanian, 2011). Exoglicanase NR- exoglicanase agindo em extremidades não-redutoras; Exoglicanase R- exoglicanase agindo em extremidades redutoras.

1.5 Aplicação

A utilização de celulases é relatada desde 1959 para a modificação de polpas celulósicas. Mas a produção dessas enzimas em escala industrial começou em meados da década de 80, como um aditivo para ração animal (CASTRO, 2006).

Atualmente, as celulases são empregadas mundialmente em diversos processos industriais, tais como nas indústrias têxteis, amaciante de tecidos de algodão e bioestonagem de jeans; extração de sucos de frutas; adição em detergentes comerciais; fabricação de cerveja; indústrias de papel; indústria de alimentos e etanol (SILVA, 2013; OHMIYA et al., 1997).

Dentre essas aplicações, o maior interesse industrial é a aplicação de celulases para produção de bioetanol, utilizando como fonte de produção a biomassa lignocelulósica, isto a torna de grande importância para a produção de combustível para transportes (SINGHANIA et al. 2010).

Segundo Ogeda e Petri (2010), atualmente o sistema energético internacional é fortemente dependente de combustível fósseis (carvão, petróleo e gás), pois cerca de 80% do consumo mundial de energia se originam dessas fontes; o consumo apresenta um crescimento anual de cerca de 2% (média em 20 anos) e cresceu 3,1% ao longo dos últimos anos.

Esta é uma situação que merece mudanças, não só pela exaustão gradativa das reservas de combustíveis fósseis, como também, pelos efeitos negativos ao meio ambiente que resultam do seu uso, destacando o aquecimento global.

Dentro das pesquisas, visando um avanço na tecnologia da fermentação para a produção de etanol, o estudo das enzimas utilizadas na hidrólise de materiais lignocelulósicos incluem celulasas e xilanases em papel de destaque (JØRGENSEN et al., 2007; WAGHMARE et al., 2014).

1.6 Bioetanol

O Brasil tem sua indústria de bioetanol de primeira geração consolidada, sendo o segundo maior produtor mundial desse produto. Na primeira geração no Brasil, o bioetanol é obtido a partir da fermentação da sacarose de cana-de-açúcar. Os Estados Unidos são atualmente o primeiro produtor mundial de bioetanol com sua plataforma baseada na hidrólise do amido de milho e posterior fermentação. Entretanto, o bioetanol brasileiro é mais competitivo que o americano.

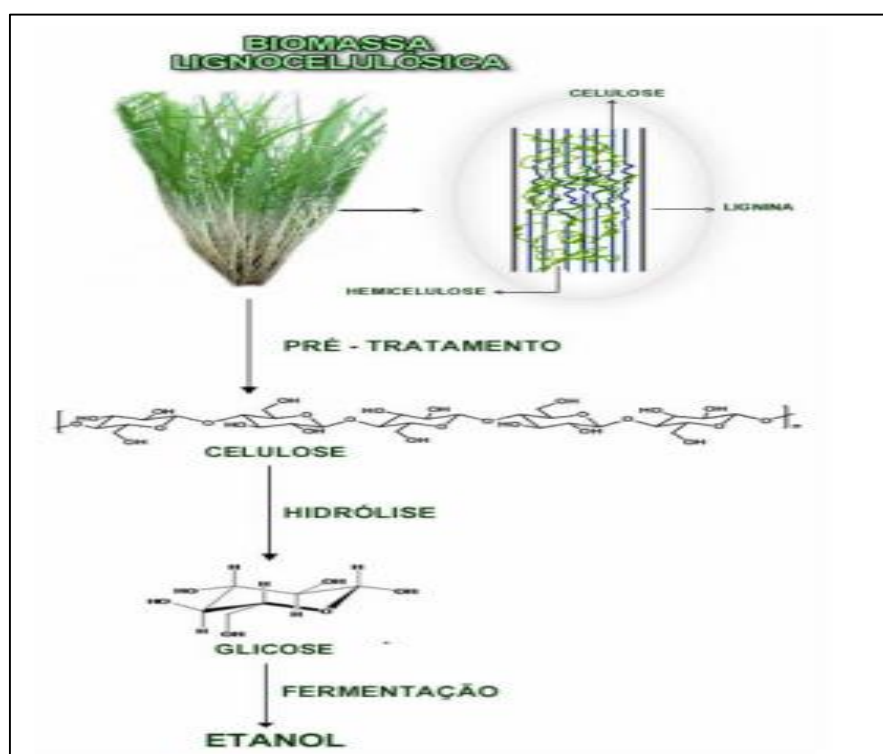
Apesar de algumas crises momentâneas na produção, pode-se afirmar que o bioetanol brasileiro é um fator determinante para a segurança energética do país (SOCCOL et al., 2010; QUIRINO et al., 2013).

O mais abundante recurso renovável da terra é a biomassa lignocelulósica (ZHANG; LYND, 2004). Estima-se que somente os EUA têm potencial para produzir mais de 1,3 bilhões de toneladas (base seca) de biomassa por ano. Segundo Zhang (2006), um bilhão de toneladas de biomassa seca produz entre 80-130 bilhões de galões de etanol celulósico.

Neste contexto, o material lignocelulósico, uma vez pré-tratado nas condições adequadas, é então hidrolisado à glicose mediante a ação de enzimas celulolíticas, e assim, produzindo etanol, denominado de segunda geração. As condições do

processo: pH, tempo de sacarificação, concentração enzimática e relação sólido-líquido, depende do substrato escolhido e das características do complexo enzimático utilizado, que devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso. A rota enzimática apresenta-se como uma alternativa mais adequada à produção de etanol a partir do bagaço e da palha de cana-de-açúcar do ponto de vista técnico, em virtude da maior possibilidade de obter elevados rendimentos glicosídicos, ao mesmo tempo em que são obtidos hidrolisados com reduzida toxicidade aos microrganismos da fermentação (SILVA; GOUVEIA, 2008; CHANDRA et al., 2010). A Figura 2 apresenta simplificada a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

Figura 2 – Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: (Extraído de Santos, 2012).

1.7 Organismos de estudo

1.7.1 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger (*A. niger*) é um dos microrganismos mais importantes utilizados na área da biotecnologia. Ele tem sido utilizado há muitas décadas para produzir enzimas extracelulares e ácido cítrico (YAKOUT, 2014). Classificado como fungo filamentoso, esse saprófito degrada moléculas complexas nos materiais derivados de células vegetais, por secretarem uma variedade de enzimas hidrolíticas (DE VRIES, 2003).

A. niger cresce em material orgânico em ampla escala de temperatura de 6 a 47 °C, e pH, 1,4 - 9,8 (SCHUSTER et al., 2002). Microscopicamente é caracterizado por apresentar cabeças conidiais escuras, geralmente negras, e conidióforos hialinos a marrom, com cabeças globosas. O conidióforo apresenta cabeça conidial radiada, com métulas e fiálides ou somente fiálides. Conídios escuros unicelulares, globosos, medem 4 - 5 µm de diâmetro (ABARCA et al., 1994).

Tratando-se da produção de celulases, Khademi et al. (2002), reportam que o *A. niger* é uma importante fonte fúngica de baixo custo para a produção de celulases, com grande aplicabilidade na indústria têxtil, alimentícia e farmacêutica. Bansal et al. (2013), produziram celulases em estado sólido de fermentação com linhagens de *Aspergillus niger* NS-2.

Singhania et al. (2010), descrevem que a maior parte das celulases disponíveis comercialmente são produzidos a partir de *A. niger* e *T. reesei*.

1.7.2 *Humicola grisea* var. *thermoidea*

Classificado como fungo filamentoso, estritamente aeróbio e pertencente ao complexo *Torula-Humicola*, este complexo compreende os fungos filamentosos *Torula thermophila*, *Humicola insolens* e *Chaetomium thermophilum* (SILVA, 2013).

De acordo com Monti (1989) o gênero *Humicola* é constituído por fungos desprovidos de reprodução sexuada, pertencente à classe Deuteromicetes e à família Dematiaceae. Filho (1996); Maheshwari et al. (2013), descrevem o fungo *Humicola*

grisea var. *thermoidea* como sendo um bom produtor de celulases. Retratado por Oliveira et al. (2013) *H. grisea* var. *thermoidea* é um eficiente produtor de hidrolases termoestáveis, com potencial aplicação biotecnológica. Quando cultivado em resíduos lignocelulósicos, como bagaço de cana, secreta majoritariamente celobiohidrolases.

1.8 Imobilização de enzimas

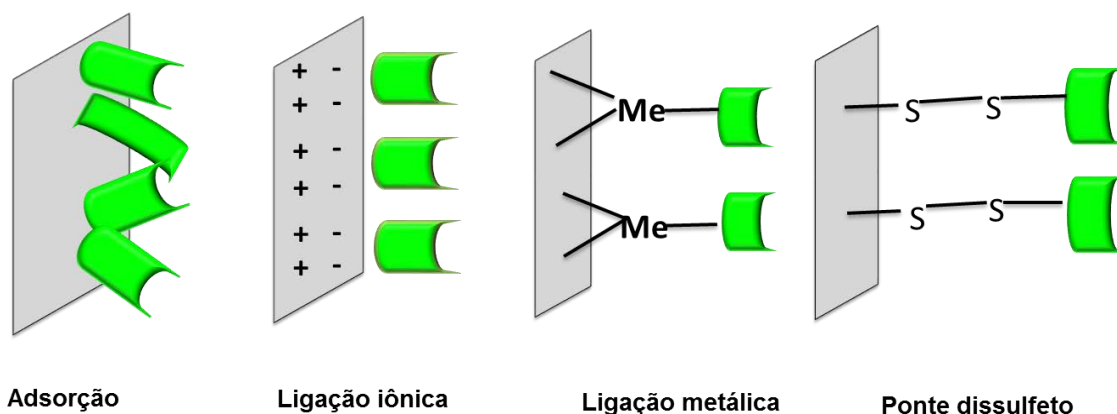
As enzimas têm intrinsecamente excelentes propriedades como atividade, seletividade e especificidade, o que permitem o desenho de processos de síntese de produtos muito complexos. Mas apesar do elevado potencial de aplicações das enzimas, devido à necessidade dos consumidores, elas têm de ser otimizadas, de modo a cumprirem suas funções biológicas com eficácia e eficiência. A catálise de reações em processos metabólicos complexos pode ser regulada em vários níveis, onde algumas reações passam a ter as características para serem aplicadas em processos industriais (BON et al., 2008).

De acordo com Aragon (2013), para aplicações práticas, a imobilização de microrganismos ou enzimas em materiais sólidos oferece muitas vantagens, entre as quais o reuso da enzima, a fácil separação do produto e o aumento da estabilidade enzimática. O termo “enzimas imobilizadas” refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em determinada região de espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas repetida e continuamente (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006).

Para determinar o sucesso de imobilização de enzimas, deve-se considerar as características físico-cinéticas, como também, as características físico-química dos diferentes suportes (matriz), e as diferentes possibilidades de ativação química destes suportes. A escolha de um processo de imobilização pode ser dividida em métodos reversíveis e irreversíveis, onde nos métodos reversíveis pode-se recuperar o suporte para posterior utilização; como exemplo, têm-se os métodos de adsorção física e ligação iônica. No caso específico da ponte dissulfeto, é possível recuperar o suporte após o tratamento com uma mercaptana. (Figura 3). Já para os métodos irreversíveis, esse processo de recuperação não é possível, pois o processo de imobilização ocorre através de ligações covalentes entre a enzima e o suporte utilizado em questão; como

exemplo, imobilização multipontual covalente, onde há mais de uma ligação covalente entre a enzima e o suporte. O entrecruzamento é obtido utilizando o reagente bifuncional (glutaraldeído) permitindo desta forma ligações covalentes entre as moléculas já imobilizadas (Figura 4) (TAVANO, 2013).

Figura 3 – Representação esquemática dos métodos reversíveis de imobilização de enzimas.



Fonte: própria autoria.

Figura 4 – Representação esquemática dos métodos irreversíveis de imobilização de enzimas.



Fonte: própria autoria.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica igual a enzima solúvel. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A Tabela 1 apresenta a comparação entre os métodos de imobilização.

Tabela 1 – Comparação entre os métodos de imobilização reversível e irreversível.

Características	Ligações cruzadas	Adsorção física	Ligação iônica	Ligação metálica	Ligação covalente	Oclusão
Preparação	Intermediária	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediária
Atividade	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediária	Intermediária	Alta	Baixa
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção microbiana	Intermediária	Não	Não	Não	Não	Sim

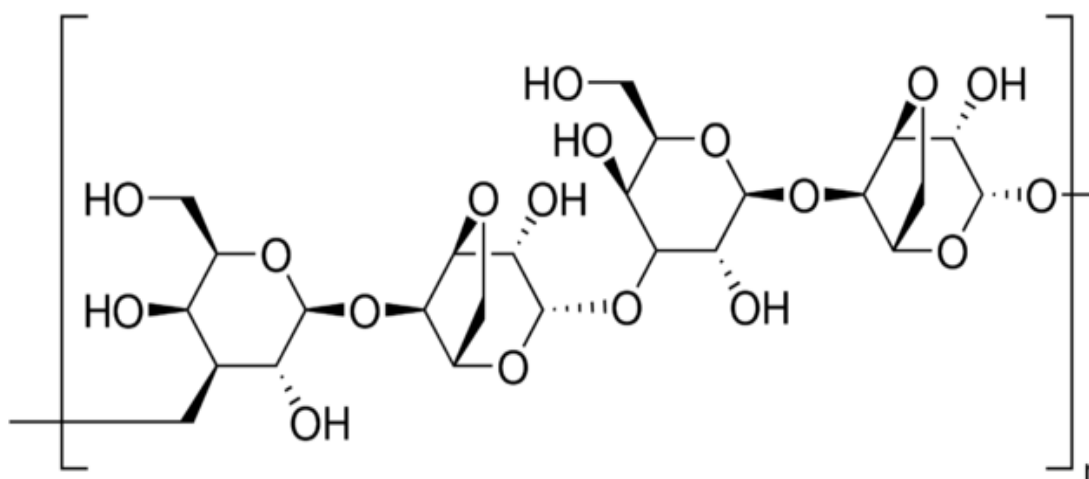
Fonte: (GALLEGO, 2006; BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE, 1993).

Atualmente diversas matrizes são utilizadas para a imobilização de enzimas. Entre os suportes utilizados podemos citar polissacarídeos (agarose, celulose, amido, dextrana, quitosana), proteínas (colágeno, gelatina, albumina), polímeros sintéticos (poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilamida, poliamidas, minerais (bentonite, sílica)

e outros materiais (vidro não poroso, vidro de poro controlado (CABRAL; KENNEDY, 1991).

A agarose é um polímero natural extraído de algas vermelhas (Figura 5). Basicamente suas fibras são constituídas de unidades repetidas de agarobiose (D-galactose e 3,6- anidro-L-galactose), cujas hidroxilas podem ser transformadas por meio de reações químicas e grupos ativos, onde se ligarão enzimas a serem imobilizadas (GUISÁN, 2006).

Figura 5 – Estrutura química básica da agarose, formada por repetidas unidades de agarobiose.



Fonte: (extraído de SIGMA-ALDRICH, 2014).

1.8.1 Imobilização de celulasas

É de grande interesse biotecnológico a imobilização de celulasas, uma vez que há poucos trabalhos científicos comparados às demais enzimas.

De acordo com a revisão literária, são encontrados alguns trabalhos sobre imobilizações de celulasas de distintas fontes, sendo: Eudragit S-100 (YU et al., 2013), Dendrímero de Poliaminoamida (WANG et al., 2013), Partículas de Grafeno (GOKHALE et al., 2012), Eudragit L-100 (ZHANG et al., 2010), Quitosana (ABD EL-GHAFFAR; HASHEM, 2010), Sílica Gel (PALVEJAC et al., 2007), Nanofibras de Poli Vinil Álcool (PVA) (WU et al., 2004), Acrilamida (YUAN et al., 1998), Argila de Silicato (SINEGANI et al., 2005), Agarose (CHIM-ANAGE et al., 1986).

As celulasas são cada vez mais utilizadas nas indústrias de alimentos, de celulose e papel, e na formulação de detergentes em pó. O alto custo das enzimas, muitas vezes, faz com que o procedimento enzimático seja economicamente insatisfatório

Assim, a etapa chave para o procedimento enzimático é a imobilização de enzimas, que confere inúmeros benefícios em relação à enzima livre, como reutilização, fácil recuperação e em, alguns casos, a purificação.

Portanto, a imobilização enzimática facilitará uma maior economia industrial, pois as enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas por várias vezes, e também, podem apresentar maior estabilidade térmica comparada a enzimas não imobilizadas.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivos geral

Produzir celulases por fungos filamentosos e imobilizar em suportes sólidos: caracterização dos derivados ativos e estabilizados.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir CMCases secretadas por *A. niger* e *H. grisea* em meio de cultivo sólido e submerso;
- Imobilizar CMCases em suporte agarose com diferentes ativações químicas;
- Determinar a estabilidade térmica e propriedades cinéticas dos derivados obtidos, comparando-os com as enzimas livres;
- Avaliar a capacidade de reuso dos derivados ativos e estáveis;
- Analisar qualitativamente o produto de hidrólise dos substratos celulósicos.

MATERIAL E MÉTODOS

3 Material e Métodos

3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Aspergillus niger* isolado de fruto cupuaçu em decomposição. Este fungo foi identificado por biologia molecular na fundação André Tosello, Campinas- SP (OS 120017). A linhagem de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (*H. grisea*) foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge do departamento de biologia da FFCL- USP- Ribeirão Preto-SP.

3.2 Suportes

Como suporte para imobilização de enzimas foi utilizado agarose de 4 e 6 CL (Cross-linked) ((Sigma Aldrich®)) com diferentes ativações químicas.

3.3 Manutenção do microrganismo

As culturas foram mantidas a 35°C, em tubos de ensaio contendo meio inclinado de 2% de (m/v) de ágar-ágar e 4,5% (m/v) de farinha de aveia (Quaker®). Após quatro dias de crescimento para o fungo *A. niger* e dez dias para o *H. grisea*, os microrganismos foram armazenados a 4°C.

A manutenção dos microrganismos foi realizada através de repiques periódicos.

3.4 Obtenção de conídios

Os conídios foram obtidos a partir das culturas estoques. A cada tubo de cultura foi adicionado 10 mL de água estéril de onde se retirava o volume de 2 mL da suspensão (aproximadamente $5 \cdot 10^7$ esporos/mL) sendo transferido para um erlenmeyer contendo meio líquido (50 mL) ou sólido (9 g).

3.5. Fermentação para produção de celulases de *A. niger*

3.5.1 Meios de cultivo sólido

Meio constituído em uma composição de 3 g de farelo de trigo/ 3 g de pó de sabugo de milho/3g de Avicel®, 25% (m/v) de água destilada e 1% (m/v) de água de maceração de milho. Após a esterilização a 120°C, por 15 minutos, o meio inoculado e incubado a 35°C permaneceu sem agitação em uma mesa incubadora.

Após 120 horas, foi adicionado água destilada esterilizada (20 mL), onde permaneceu sob agitação constante por 24 horas a 140 rpm em movimento linear. Após o tempo pré-determinado, os micélios resultantes das culturas foram colhidos, por filtração a vácuo com perfex®. O filtrado (meio de cultura livre de células) constitui o extrato que foi parcialmente purificado em suporte agarose ativado a MANAE (descrito a seguir) para obtenção de um extrato livre de açúcares e restos celulares acrescidos do processo de fermentação.

3.5.2 Meio de cultivo submerso (líquido)

O meio líquido utilizado foi o proposto por Vogel (1956), contendo 1% (m/v) de pó de sabugo de milho e pó de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono a pH 6,0. Descreve-se:

1) Microelementos (solução traços)

Composição	Quantidade
Ácido cítrico.....	0,5 g
ZnSO ₄ . H ₂ O.....	0,5 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 6H ₂ O.....	0,1 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	0,025 g
MnSO ₄ . H ₂ O.....	0,005 g
H ₃ BO ₃	0,005 g
NaMoO ₄ . H ₂ O	0,005 g

CHCl ₃	0,1 mL
H ₂ O dest. q.s.p.....	10 mL

2) Biotina

Composição	Quantidade
0,5 mg.....	10 mL (etanol 50%)

3) Sais de Vogel

Composição	Quantidade
KH ₂ PO ₄	2,5 g
NH ₄ NO ₃	1,0 g
Mg SO ₄ . 7H ₂ O.....	0,1 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	0,05 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	1,5 g
Solução de traços.....	0,05 mL
CHCl ₃	0,02 mL
H ₂ O q.s.p.....	10 mL

3.5.2.1 Composição do meio Vogel

Composição	Quantidade
Sais de Vogel	2mL
Biotona.....	2μl
pH.....	6,0
H ₂ O q.sp.....	100mL

Após a esterilização a 120°C, por 15 minutos, o meio inoculado e incubado a 35°C permaneceu sob agitação linear a 140 oscilações por minuto em uma mesa incubadora. Após determinado tempo de fermentação, os micélios resultantes das culturas foram colhidos, por filtração a vácuo com perfex® e auxílio de uma bomba de vácuo. O filtrado (meio de cultura livre de células) foi usado como preparação de enzimas extracelulares. Em seguida, quando necessário, realizou-se a precipitação proteica “overnight” (12 horas) em acetona 3:1 (solvente: extrato).

3.6 Meio de cultivo submerso para produção de celulasas de *H. grisea*

O meio líquido utilizado foi proposto por Monti (1989). Sendo composto, por:

Meio M6

Composição	Quantidade
NH ₄ CL.....	0,5g/L
CaCO ₃	1,0 g
Peptona.....	1,0 g
Nacl.....	5,0 g
Gelatina.....	2,5 g
Extrato de levedura.....	8,0 g
H ₂ O dest. q.s.p.....	1000 mL
pH inicial.....	6,0

Ao meio foi adicionado fonte de carbono 1 % (m/v) de pó de sabugo de milho, pó de bagaço de cana-de-açúcar e avicel®. Após a esterilização a 120°C, por 15 minutos, o meio foi inoculado e incubado a 40°C, com agitação constante a 140 oscilações por minuto, em uma mesa incubadora de movimento linear por determinado tempo. O extrato bruto produzido, quando necessário, sofreu precipitação proteica *overnight* em etanol 3:1 (solvente extrato).

3.7 Obtenção do pó bagaço de cana-de-açúcar “pré-tratamento físico”

O bagaço de cana-de-açúcar foi moído em máquina picadeira/siladeira-TRAPP®. Em um recipiente cilíndrico de PVC envolto por camadas de gaze na extremidade (técnica desenvolvida no laboratório), adicionou-se o resíduo de bagaço de cana, onde foi lavado abundantemente em água corrente por aproximadamente 6 horas para eliminação das impurezas. Em seguida, o conteúdo foi despejado em bandeja plástica com água destilada para a decantação. Eliminado o excesso de água, o material foi seco em estufa com circulação de ar a 100°C por 24 horas. O

bagaço seco foi triturado em liquidificador, e tamisado em malhas de 125 mesh. Ao final, obteve-se um pó fino para o processo de pré-tratamento.

3.8 Processo de pré-tratamento físico-químico do pó de bagaço de cana-de-açúcar

O pó de bagaço de cana foi submetido a pré-tratamento químico, catalisado por base NaOH 2 mol. L⁻¹ em 24 horas sob agitação suave em palas. Nessas condições, parte da lignina é removida. Após o tempo pré-determinado, o pó de bagaço de cana, junto com o catalisador, foi autoclavado a vapor por 15 minutos a 120°C e após esse tempo uma descompressão rápida foi realizada. Sem seguida, foi lavado com água destilada 8 vezes em um volume de 200 mL para a remoção do hidróxido de sódio em seguida submetido à 100 °C. O material assim obtido foi armazenado à temperatura ambiente.

O processo de descompressão ocorre quando a autoclave é desligada e a válvula aberta rapidamente, deixando o vapor sair com consequente queda na pressão interna da autoclave. Processo fundamental para redução da lignina e hemicelulose (SANTOS, 2010).

3.9 Obtenção de polpa celulósica

A polpa celulósica foi obtida através do processo mecânico em liquidificador, onde 1% do pó de bagaço de cana-de-açúcar, papel Kraft e papel sulfite usado não contendo tinta, foram triturados junto com 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ até a obtenção de um produto pastoso. As polpas obtidas foram utilizadas no processo de sacarificação enzimática.

3.10 Dosagem de proteínas

As proteínas foram quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976). O diagrama de calibração da proteína foi elaborado com solução de proteína padrão, Soro Albumina Bovina (BSA), método baseado na ligação do corante Coomassie

Brilliant Blue G-250 às proteínas. Essa ligação do corante às proteínas é monitorizada a 595_{nm} através de métodos espectrofotométricos. Através dos resultados em absorbância construiu-se um gráfico, obtendo absortividade igual a 0,3451 (mg/ mL)⁻¹ para um volume total 1mL de reagente/0,02 mL de amostra e de 2,2243 (mg/ mL)⁻¹ para 1mL de reagente/0,1mL de amostra.

3.11 Atividade enzimática para CMCase, Avicelase e Xilanase

Para a determinação da atividade das CMCases foi utilizado carboximentilcelulose (CMC) 1% (m/v). Para Avicelases, Avicel® 1% (m/v). A atividade xilanolítica foi determinada em 0,5 % (m/v) xilana solúvel *birchwood* (Sigma- Aldrich®) (ARAGON, 2013). Os substratos foram elaborados em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5. Após a adição das enzimas, foram retiradas alíquotas em diferentes tempos e o produto liberado foi detectado com Ácido 3-5- dinitrosalicílico (Miller, 1959). Após a fervura por cinco minutos, fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540_{nm}. A curva de calibração com o uso de glicose obteve um coeficiente de extinção molar igual a 94 mol⁻¹.cm⁻¹, para xilose, coeficiente de extinção molar igual a 240 mol⁻¹.cm⁻¹. Determinando que uma unidade enzimática (U) para atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto. A atividade específica foi definida através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína (U. mg⁻¹).

As condições dos ensaios utilizados para CMCases e Avicelases foi de 0,9 mL de substrato e 0,1 mL de extrato enzimático, totalizando 1 mL de solução final. Após o procedimento de precipitação das proteínas, foi utilizado quantidades de 0,99 mL de substrato e 0,01 mL de extrato. Os ensaios foram conduzidos a 50°C, com agitação constante durante 20-30 minutos. Acrescido de reagente alcalino DNS para detecção do produto.

Para xilanases foram utilizados volume de 0,9 mL de substrato e 0,1 mL-0,01mL de solução enzimática, convenientemente diluída em um volume final de 1 mL. A reação foi conduzida a 50°C, com agitação constante durante 10- 30 minutos, quando se acrescentou 1mL de DNS para detecção do produto. Manteve-se o cuidado

para elaborar o controle da reação (branco), contendo: DNS/substrato/extrato enzimático para as enzimas CMCase, avicelases e xilanases.

3.12 Atividade para β -glicosidase

A atividade da enzima β -glicosidase foi conduzida em 3,0 mmol.L⁻¹ pNP-Glu (Sigma- Aldrich®) em tampão fosfato de sódio 100 mmol. L⁻¹ pH 6,0, incubado a 50°C por 10-30 minutos. Acrescido de solução saturada de tetraborato de sódio, fez-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410_{nm}.

O volume final do ensaio foi igual a 1mL, variando a quantidade de substrato e solução enzimática. O coeficiente de extinção molar determinado para p-nitrofenol foi de 17.500 M⁻¹.cm⁻¹ em pH 12 a 410_{nm}. O controle da reação foi elaborado com tetraborato de sódio/substrato/extrato enzimático para a enzima.

3.13 Determinação da quantidade de glicose residual pelo método com Glicose Oxidase

Para a quantificação da glicose residual presente nos ensaios, utilizou-se o método enzimático por glicose oxidase. Foram utilizadas preparações dos reativos enzimáticos e de cor do *Kit* de análises clínicas da LABORLAB. Foi adicionado 2,0 mL da solução reagente em 20 μ L de amostra e incubada a 37°C por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura de absorbância a 505_{nm}. A quantidade de glicose presente na amostra foi calculada a partir da absorbância da solução padrão de mg/dL de glicose.

3.14 Atividade para celobiase

A determinação de atividade celobiásica foi realizada utilizando celobiose 1% em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5. Foram utilizados volume de 0,9 mL de substrato e 0,1 mL de solução enzimática previamente diluída. O ensaio foi conduzido a 50°C por 30 minutos sob agitação constante. A quantificação de glicose residual presente nos ensaios foi determinada pelo método com Glicose Oxidase- LABORLAB.

3.15 Atividade para o coquetel enzimático

O coquetel enzimático elaborado para a hidrólise dos substratos celulósicos foi preparado na proporção de 0,39 mg/mL⁻¹ de proteína 1:1 (v/v) dos extratos enzimáticos de *A. niger* e *H. grisea*. As condições para determinações de atividade para CMCase, β -glicosidases e xilanases foram as mesmas descritas para as soluções descritas anteriormente.

3.16 Substratos para o processo de sacarificação

O coquetel enzimático solúvel e imobilizado foram ensaiados com os substratos carboximetilcelulose 2% (CMC), pó de bagaço de cana-de-açúcar explodido e o papel de filtro Whatmann n°.1 cortado no tamanho de 1 x 2 cm. As polpas do bagaço de cana; papel Kraft e papel sulfite também foram utilizados no processo.

3.17 Sacarificação enzimática de celulose

As reações de sacarificação dos substratos celulósicos foram realizadas em um volume final de 4 mL, contendo tampão acetato de sódio em concentração final de 50 mmol. L⁻¹ pH 5,0, 10 mmol. L⁻¹ de azida sódica.

Para 20 mg de substratos celulósicos foram utilizados 2mL de enzima solúvel (concentrada 10 vezes e diluída em 2 mL de H₂O). Já para a hidrólise das polpas, foram utilizados 3mL de polpa para 1 mL de extrato enzimático. Quando utilizado o coquetel enzimático, preservou-se a proporção 1:1 de extrato obtidos pelas fontes enzimáticas. As soluções enzimáticas e derivados foram adicionadas aos substratos e mantidos sob agitação linear a 50°C por diferentes tempos. O acompanhamento de hidrólise era monitorado pela quantificação de glicose residual pelo método com Glicose Oxidase- LABORLAB.

3.18 Determinação da Temperatura ótima

A enzima solúvel e seus respectivos derivados foram ensaiados em temperaturas de 25°C a 75°C, em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 4,0 para CMCase de *A. niger* e pH 6,0 para CMCase de *H. grisea*. O valor da energia de ativação (EA) foi calculado pela regressão linear da curva obtida no gráfico de Arrhenius.

3.19 Estabilidade frente à temperatura

As enzimas solúveis foram ensaiadas em diferentes temperaturas, conferindo assim, assim a estabilidade térmica. O ensaio foi conduzido em temperaturas de 4°C a 80 °C em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0. Após o tempo pré-determinado, as alíquotas eram retiradas e deixadas em banho de gelo por 10 minutos. Após dosada a atividade enzimática, como descrito anteriormente.

3.20 Determinação de pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo das atividades das CMCases solúveis, os extratos enzimáticos foram incubados em tampão de McIlvaine (fosfato de sódio 200 mmol L⁻¹ e citrato de sódio 100 mmol L⁻¹) com diversos valores de pH, 3,0 - 8,0. Para pH 9,0-10,0 foi utilizado tampão carbonato/borato de sódio 100 mmol.L⁻¹.

3.21 Determinação da estabilidade enzimática ao pH

A estabilidade das CMCases foi determinada em tampão carbonato/borato de sódio 100 mmol/L⁻¹ em valores de pH 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0, incubada a temperatura ambiente (25°C). Após o tempo pré-determinado, as alíquotas eram retiradas e deixadas em banho de gelo por 10 minutos. Após dosada a atividade enzimática, como descrito anteriormente.

3.22. Inativação térmica

As enzimas livres e derivados foram incubados em diferentes valores de temperatura, em solução tampão acetato de sódio 100 mml. L⁻¹. Em determinados tempos, uma amostra foi retirada, e a atividade, verificada, conforme descrito no item 3.11. A atividade residual foi calculada pela razão entre a atividade em um dado tempo e a atividade no início da incubação.

3.23 Determinação da estabilidade enzimática ao pH 10,0 na adição de aditivos estabilizantes da CMCase de *A. niger*

O extrato enzimático solúvel foi ensaiado junto com aditivos estabilizantes em pH 10,0. Em uma quantidade de extrato enzimático era acrescido 10%, 20% e 30% de trealose. Após a solubilização dos aditivos, o ensaio de estabilidade ao pH era conduzido como descrito anteriormente.

3.24 SDS-PAGE

As amostras de enzimas solúveis, imobilizadas e sobrenadantes foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes, em gel de poliacrilamida a 12%, de acordo com o método de Laemmli (1970). Como padrão de massa molar, foi utilizado kit “Amersham™ LMW calibration kit for SDS electrophoresis”. As bandas proteicas foram visualizadas com corante *Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate* (Sigma Aldrich®) de acordo com Neuhoﬀ et al. (1987). Quando necessário, corado através do método de prata coloidal (MERRIL et al., 1984).

3.25 Cromatografia de Camada Delgada de sílica (TLC) dos produtos de hidrólise

A determinação dos produtos de hidrólise formados foi obtida por cromatografia ascendente em camada delgada de sílica de 20x20 cm (ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel). Alíquotas dos produtos de hidrólise das enzimas livres e de seus respectivos derivados foram ensaiados por aproximadamente 16 horas, utilizando,

como padrões, glicose, celobiose e xilose. O sistema de solvente utilizado foi constituído de acetato de etila / ácido acético / ácido fórmico / água (9:3:1:4 v/v/v/v). A cromatografia foi revelada com orcinol 0,2 % em ácido sulfúrico: metanol (1:9 v/v) e exposição ao calor (100 °C) por 5 minutos (FONTANA, 1988).

3.26 Reuso dos derivados

O melhor derivado ativo e estabilizado obtido com o coquetel enzimático foi submetido a ensaios de reutilização. Os derivados foram colocados em soluções de celobiose 1% e CMC 1%, em quantidades de 0,5 g de derivado em 2 mL dos substratos em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, em pH 5,0 a 50°C. O derivado foi incubado por 30 minutos e, a cada ciclo de reação, alíquotas eram retiradas e a glicose residual era dosada pelo método com Glicose Oxidase- LABORLAB.

Após cada ciclo, o derivado foi lavado com 1 L de água e 1 L de tampão acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹ pH 5,0, e o substrato foi adicionado a um novo ciclo e, assim, sucessivamente.

3.27 Preparação de suportes para a imobilização de enzimas

3.27.1 Preparo inicial do suporte agarose 4 e 6 CL

Em uma quantidade de 105g de agarose que corresponde a 180 mL de gel, foi adicionado 50 mL de uma solução de NaOH 1,7 mol.L⁻¹ com 1,425 g de boroidreto de sódio (NaBH₄). Em banho de gelo, foram acrescentados, gota a gota, 36 mL de glicidol. A mistura foi levemente agitada em temperatura ambiente por 18 horas, e após, o gel lavado excessivamente com água destilada. Desta maneira, a agarose ativada passa a apresentar grupos ativos gliceril na superfície de sua estrutura (GUISÁN, 1988).

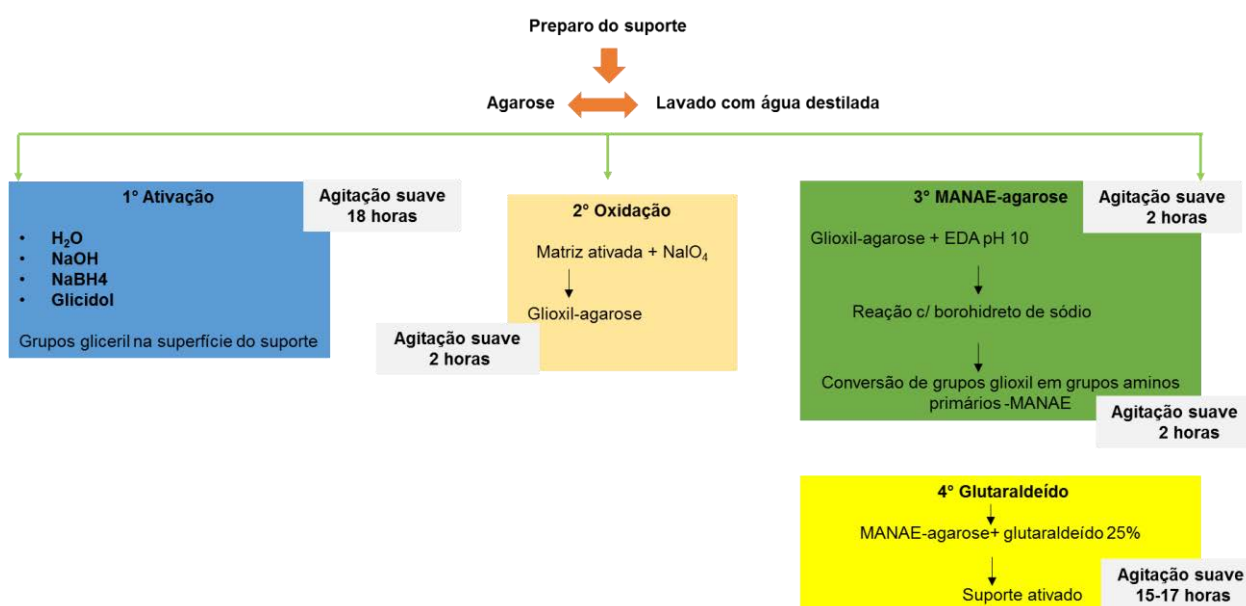
Fonte:(modificado de Guisán, 2006).

3.27.4 Glutaraldeído-agarose

O suporte glutaraldeído-agarose foi preparado pela ativação dos grupos amino primários do suporte MANAE-agarose, de acordo com Fernandez-Lafuente (1993). Uma quantidade de 20 g de MANAE-agarose foi suspensa em 22,4 mL de tampão fosfato de sódio mmol.L⁻¹ pH 7,0. Posteriormente, 33,6 mL de uma solução de glutaraldeído a 25% foram adicionados, mantendo-se a mistura em suave agitação por 16 horas, à temperatura ambiente. Ao final, o suporte foi lavado com água destilada sob vácuo em funil sinterizado.

A Figura 8 mostra a representação esquemática resumida dos processos para ativação do suporte agarose.

Figura 8 – Representação esquemática dos processos para ativação da agarose.



Fonte: própria autoria.

3.27.5 Imobilização das celulases produzidas por *A. niger* e *H. grisea*

Utilizou-se 1 g de cada suporte ativado, como descrito anteriormente, para 10 mL de uma solução enzimática (1:10) concentrada em acetona 3 volumes (extrato enzimático de *A. niger*) e álcool 3 volumes (extrato enzimático de *H. grisea*), sendo 2

mL correspondente ao extrato enzimático e 8 mL ao tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ aferido a pH 7,0. Também foi conduzido o ensaio de imobilização na presença de carboximetilcelulose 1%, em tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ aferido a pH 7,0.

Nestas condições, o ensaio de imobilização era composto por 2 mL de extrato enzimático para 8 mL de carboximetilcelulose 1% em tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ pH 7,0.

3.27.6 Entrecruzamento com glutaraldeído dos derivados obtidos com o coquetel enzimático

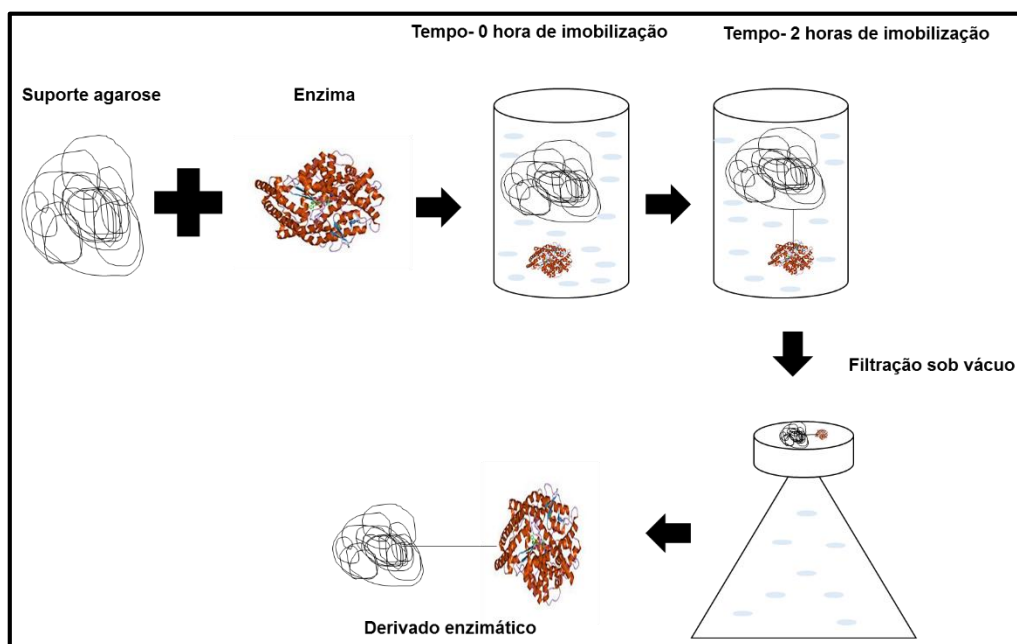
Após a imobilização em MANAE-agarose os derivados enzimáticos (enzima+ suporte) foram entrecruzados com uma solução de glutaraldeído a 0,5% na proporção 1:5, ou seja, 1 grama de suporte para 5 mL de uma solução a 0,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ por 1 hora a 25°C sob agitação suave. Após, o derivado foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada. Método proposto por Fernandez-Lafuente (1995) e adaptado para este trabalho.

3.27.7 Acompanhamento do processo de imobilização

Para o acompanhamento da imobilização, utilizou-se 1 mL de solução enzimática como controle (nas mesmas condições da solução utilizada para o processo de imobilização). Durante o processo, amostras do sobrenadante, da suspensão e do controle foram periodicamente retiradas, medindo-se a atividade enzimática e ou proteínas totais. Considerou-se completo o processo quando não mais se observou atividade no sobrenadante. A imobilização foi realizada com suave agitação e a 25°C.

Após o processo de imobilização, o derivado foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada. O derivado seco foi condicionado a 4°C em frascos hermeticamente fechados. A Figura 9 mostra a representação esquemática da obtenção do derivado enzimático.

Figura 9 – Representação esquemática do processo de imobilização para a obtenção do derivado enzimático.



Fonte: Própria autoria

3.27.8 Rendimento de imobilização

Calculada através da razão entre a atividade da suspensão final, após o processo de imobilização e a atividade inicial da enzima oferecida (ARAGON, 2013)

Atividade recuperada:

$$(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A- Atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (branco).

B- Atividade verificada no sobrenadante, representando a enzima que não se ligou ao suporte.

3.27.9 Atividade recuperada

Rendimento de imobilização é a relação entre as atividades no sobrenadante e no branco da enzima solúvel (ARAGON, 2013).

Rendimento de imobilização:

$$(\%) = \frac{C}{A} \times 100$$

A- Atividade enzimática da solução utilizada para a imobilização (branco).

C- Atividade do derivado obtida após a imobilização.

3.28 Análise dos dados

Os ensaios foram realizados em duplicatas e o desvio padrão nunca ultrapassou 5%, em relação à média. Os gráficos foram plotados com o uso do software Microsoft® office 2013.

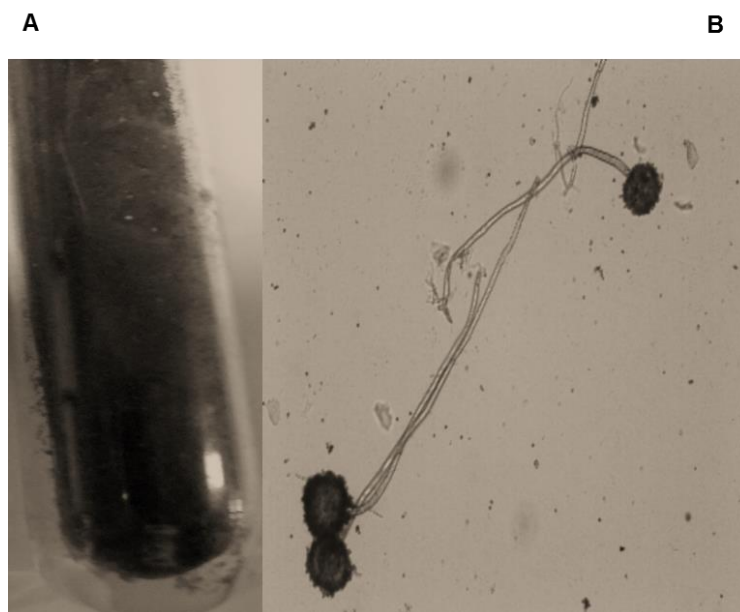
4 Resultados e Discussão

4.1 Celulases de *Aspergillus niger*

4.1.1 Identificação do fungo

O fungo utilizado neste trabalho foi isolado de um fruto de cupuaçu em decomposição, cientificamente denominado de *Theobroma grandiflorum* e identificado morfológicamente pelo grupo da Dr.^a Darlene Attili de Angelis, do Instituto de Biociência da Unesp de Rio Claro-SP, como sendo uma cepa fúngica filamentosa *Aspergillus niger*. A Figura 10 mostra as características físicas e microscópicas do fungo em questão.

Figura 10 – Características morfológicas macroscópicas e microscópica através de microscopia óptica em aumento de 400x do conidióforo do fungo *Aspergillus niger*.



*A- Características morfológicas macroscópicas; *B- Características morfológicas microscópicas.

A confirmação do fungo foi realizada pelo Instituto André Tosello (Campinas-SP), identificado através de técnicas moleculares. O fungo apresentou 100% de similaridade com as sequências de linhagens de *Aspergillus niger* van Thiegem

depositadas nos bancos de dados Genbank e CBS (Fungal Biodiversity Centre). Na árvore filogenética, a amostra agrupou-se com linhagens *Aspergillus niger* NRRL1956 e CBSS55465 (ARAGON, 2013).

4.1.2 Produção e padronização do extrato enzimático produzido por *A. niger*

Visando a obtenção de enzimas celulases, em específico CMCases, realizou-se um estudo apurado para a produção dessas enzimas. Através do levantamento da literatura científica, foram testados os melhores meios de cultivos, melhores fontes de carbono e adequação quanto à temperatura e o tempo de fermentação. Através dessas informações preliminares foi possível obter extratos enzimáticos com ótimas atividades específicas, não somente para CMCases, mas também para β -glicosidases, avicelases e xilanases.

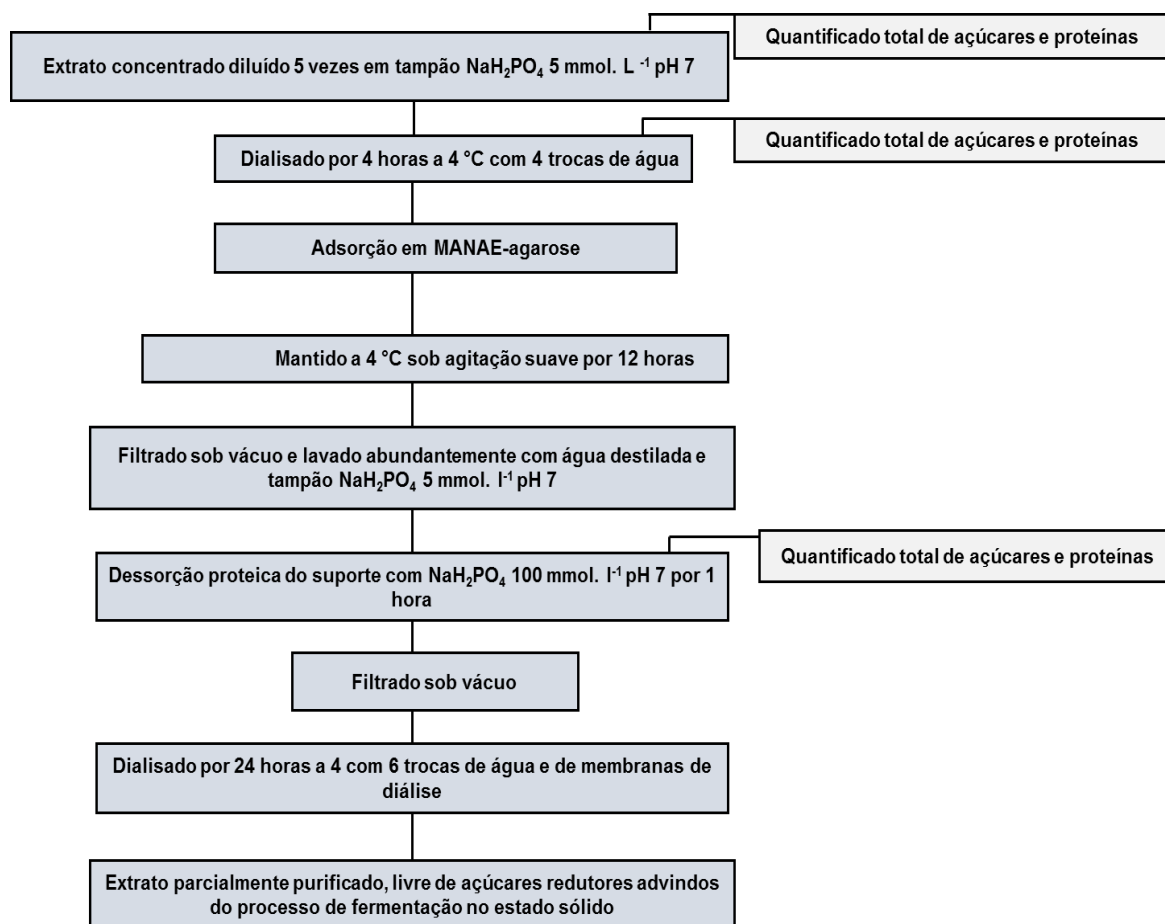
4.1.2.1 Produção de celulases em estado sólido

De acordo com Singhanian (2011) fermentação em estado sólido é definido como fermentação em ausência ou quase ausência de água livre. E também, considerado o meio mais adequado para obtenção de enzimas, em específico celulases. Esse meio mimetiza *in vitro* o meio ambiente comum para produção dessas enzimas.

Após a produção e liofilização do extrato enzimático foi realizado diálise e purificação parcial através de imobilização em suporte MANAE-agarose. Esse tipo de imobilização não é apenas um procedimento que podemos utilizá-lo como mediador de purificação, mas também para estabilizar e unir covalentemente a enzima, após tratamentos específicos com reagentes bifuncionais, discutido posteriormente. A imobilização em MANAE ocorre através de trocas iônicas, ou seja, interações entre cargas (+ -) entre a proteína e o suporte. Essas interações permitem o estabelecimento de ligações iônicas entre a matriz (suporte) e o biocatalisador (enzima). A imobilização da enzima com o suporte ocorre em baixa força iônica (5 mmol.L⁻¹), facilitando as interações iônicas.

Os açúcares, restos celulares e outros componentes presentes no extrato enzimático ficam “livres” na solução e após a filtração sob vácuo, é obtido o derivado (enzima + suporte). A enzima é totalmente recuperada para o meio aquoso através da utilização de uma concentração de 100 mmol. L⁻¹ de cloreto de sódio. Ao final, o extrato celulolítico foi congelado e preservado com azida sódica 0,5% para evitar possível contaminação fúngica ou bacteriana. Através da dosagem de açúcares redutores, foram obtidos valores de 0,638 U/mL de enzima, reação realizada a 25 °C por 15 minutos. A quantidade total de proteína foi de 0,203 mg.mL⁻¹ ao qual representa atividade específica de 3,14 U.mg⁻¹ de proteína. A Figura 11 mostra o fluxograma do processo de purificação parcial desse extrato.

Figura 11 – Fluxograma representando o procedimento de imobilização da enzima celulase extracelular de *A. niger* em MANAE-agarose visando a purificação parcial do extrato obtido por fermentação em estado sólido.



Os açúcares redutores foram dosados pelo método de Miller (1959) e determinação de proteínas Bradford (1976).

É importante salientar que durante o procedimento de diálise foi realizado a troca da membrana, esse fato é importante para evitar um possível rompimento da mesma e, conseqüentemente, perda do produto. Sabe-se que a enzima celulase degrada a celulose, sendo o principal componente das membranas para diálise. No processo de purificação parcial, foi obtido a exclusão total de todos os açúcares advindos do processo de fermentação em meio de cultura no estado sólido.

Apesar dos resultados terem sido satisfatórios, este tipo de fermentação não foi utilizado para a produção das enzimas utilizadas neste trabalho, devido ao dispendioso método de purificação para retirada dos açúcares.

4.1.2.2 Produção de celulasas em meio submerso

Entende-se por fermentação submersa, meio com excesso de água, com pH e nutrientes pré-estabelecidos, adicionado de fonte de carbono e controle de temperatura. O extrato bruto contendo as enzimas celulasas foi obtido no meio de cultivo acrescido de pó de sabugo de milho (1%) e ou pó de bagaço de cana-de-açúcar (1%) como fontes de carbono. A fermentação se deu em temperatura fixa de 30°C, rotação de 140 oscilações por minuto e pH 6,0. A Tabela 2 mostra os resultados de produção das enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico, utilizando pó de sabugo de milho 1%. Na Tabela 3, os resultados são referentes a produção de enzimas obtidas com pó de bagaço de cana-de-açúcar 1%.

Tabela 2 – Atividade celulolítica e xilanolítica dos filtrados de cultura de *A. niger*, utilizando pó de sabugo de milho 1% em diferentes tempos.

Tempo (h)	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	CMCase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Avicelase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	β glicosidase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Xilanase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹
48	0,092	2,41	26,20	0,41	4,46	38,90	423,00	5,75	62,5
72	0,103	2,32	22,60	0,425	4,13	49,85	458,42	6,13	59,51
144	0,144	2,62	18,20	0,425	2,95	69,42	482,10	6,25	43,40

Meio de Vogel (1956) em pH inicial 6,0. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

Tabela 3 – Atividade celulolítica e xilanolítica dos filtrados de cultura de *A. niger*, utilizando pó de bagaço de cana-de-açúcar 1% em diferentes tempos.

Tempo (h)	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	CMCase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Avicelase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	β glicosidase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Xilanase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹
48	0,044	1,00	22,72	0,120	2,72	22,57	512,96	3,02	68,64
72	0,050	1,33	26,60	0,138	2,76	28,95	579,00	3,70	74,00
144	0,044	1,50	34,10	0,134	3,04	40,76	926,36	5,56	126,36

Meio de Vogel (1956) em pH inicial 6,0. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

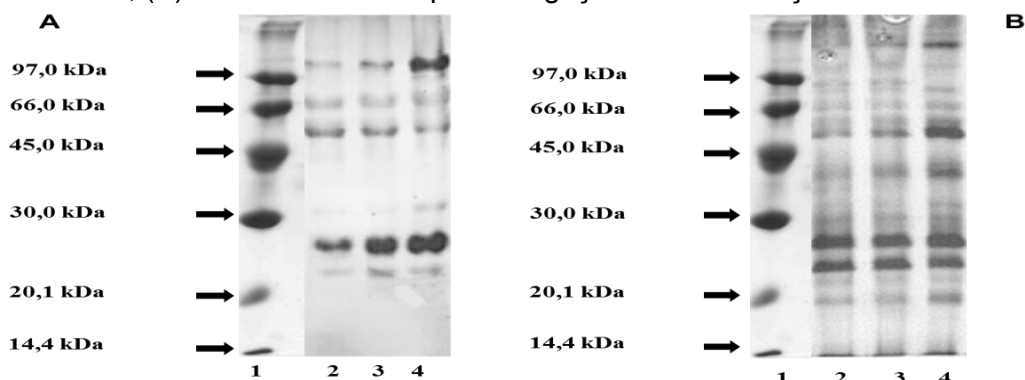
Os resultados apresentados mostraram que a utilização dos resíduos agroindustriais, que em sua composição; apresentam grandes quantidades de

celulose, hemicelulose e lignina, classificados como macromoléculas complexas; foram satisfatórios para a produção de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico.

Segundo BON et al. (2008) essas macromoléculas são inicialmente convertidas extracelularmente a subunidades menores por enzimas hidrolíticas, sendo, então, transportadas para o interior da célula e metabolizadas em vias catabólicas e/ou anabólicas. As fontes de carbono na maioria das fermentações para produção de celulases comerciais são biomassa celulósica, incluindo: palha de cascas de cereais e leguminosas, arroz ou farelo de trigo bagaço de cana e resíduos da indústria de papel, entre outros resíduos que induzem a produção de celulases (SINGHANIA, 2011).

Em comparação às duas fontes de carbono, podemos observar que a melhor atividade específica para a CMCases, foi obtida com o bagaço de cana-de-açúcar, no tempo fixo de 144 horas. Após obter estes resultados o extrato foi obtido posteriormente nas mesmas condições. Na Figura 12 A, é apresentado resultados do perfil proteico do extrato obtido com sabugo de milho, e na Figura 12 B, o perfil proteico do extrato obtido com bagaço de cana. Embora as dosagens de proteína total nestes extratos tenham sido diferentes, foi verificado que no extrato com menor quantidade de proteína total houve o aparecimento de um número maior de bandas proteicas. Entretanto, no gel com menor número de bandas proteicas, a quantidade total de proteína no extrato foi maior.

Figura 12 – SDS-PAGE do extrato bruto de *Aspergillus niger* (A) Fonte de carbono pó de sabugo de milho; (B) Fonte de carbono pó de bagaço de cana-de-açúcar.



Legenda: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato bruto em 48 horas; (3) extrato bruto em 72 horas; (4) extrato bruto em 144 horas.

Em determinados momentos, fez-se necessária a concentração proteica do extrato enzimático em acetona 3:1 (solvente: extrato), dessa forma, poderíamos controlar a carga proteica oferecida ao suporte para a imobilização (discutido posteriormente). A Tabela 4 mostra que a precipitação em acetona preservou a atividade específica da CMCase, diminuindo a atividade para β glicosidase e avicelase. Para xilanase, observa-se um aumento significativo da atividade específica.

Tabela 4 – Atividade da CMCase, β glicosidase e xilanase após a precipitação do extrato enzimático com acetona.

Enzimas				
	CMCase	β glicosidase	Avicelase	Xilanase
Atividade (U.mL⁻¹)	13,0	163,71	0,53	118,3
Proteína (mg.mL⁻¹)	0,39	0,39	0,39	0,39
Atividade específica (U.mg⁻¹)	33,4	419,8	1,36	303,4

Para a determinação da atividade dessas enzimas foi realizado a diluição em 4 vezes do extrato enzimático, anteriormente concentrado 10 vezes. Para um volume de reação final de 1mL foram utilizados: CMCase-20 μ l de extrato; β glicosidase- 10 μ l de extrato; avicelase- 20 μ l de extrato; xilanase-10 μ l (diluído 50 vezes). Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. O extrato utilizado para a concentração proteica foi aquele obtido em 144 horas em meio Vogel com bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Os valores de xilanase foram expressos para mostrar que essa enzima está presente em grande quantidade neste extrato enzimático, ficando inviável a não reportação neste estudo. Ênfase que os dados encontrados para a enzima em questão, são de grande importância para futuros pesquisadores que almejam estudar xilanases secretadas por *A. niger*.

4.1.3 Ensaios cinéticos da CMCase presente no extrato de *Aspergillus niger*

4.1.3.1 Perfil de hidrólise do substrato carboximetilcelulose

Para avaliar o perfil de hidrólise da enzima CMCase, foi realizado o ensaio em diferentes concentrações de viscosidade dinâmica da carboximetilcelulose, expresso

em centipoise (cps) (Tabela 5). Podemos observar que a enzima apresentou um perfil de hidrólise muito similar em todas as diferentes concentrações ensaiadas, mostrando a capacidade hidrolítica dessa enzima sob um derivado de celulose, como a carboximentilcelulose.

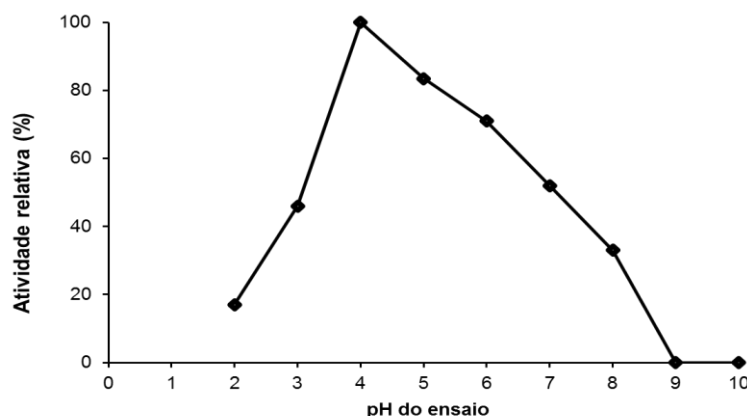
Tabela 5 – Perfil de hidrólise da carboximentilcelulose (CMC) pela CMCase de *Aspergillus niger*.

CMC 1% (Viscosidade (%) *CPS)	U.mL ⁻¹
1.000-2.000	13,0
6.000	12,0
30.000	14,0
50.000	12,0

Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. Os experimentos foram conduzidos a 50°C e os substratos preparados em tampão acetato de sódio 50 mmol/L⁻¹ pH 5. Para um volume de reação final de 1mL foi utilizado 10µl de extrato. *CPS- viscosidade dinâmica.

4.1.3.2 pH ótimo

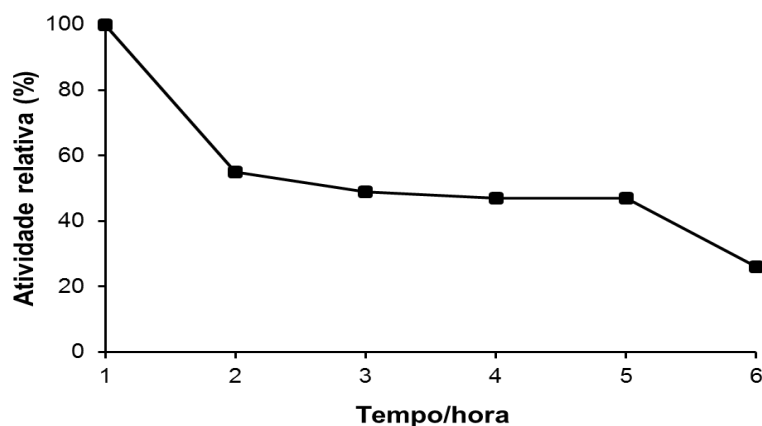
A máxima atividade da CMCase foi em pH 4,0 (Figura 13), valor semelhante aos demais encontrados para CMCase fúngicas (BANSAL et al., 2013; HURST et al., 1977). De acordo com Technische...(2014), celulasas apresentam uma ampla faixa de pH entre pH 2,8 a pH 10,0.

Figura 13 – Efeito do pH na atividade da CMCase do filtrado de *Aspergillus niger*.

Ensaio conduzido em pH apropriados de Mcllvaine pH 2-8 200 mmol/L⁻¹ para pH 9-10 tampão carbonato/borato 100 mmol/L⁻¹. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.1.3.3 Estabilidade ao pH

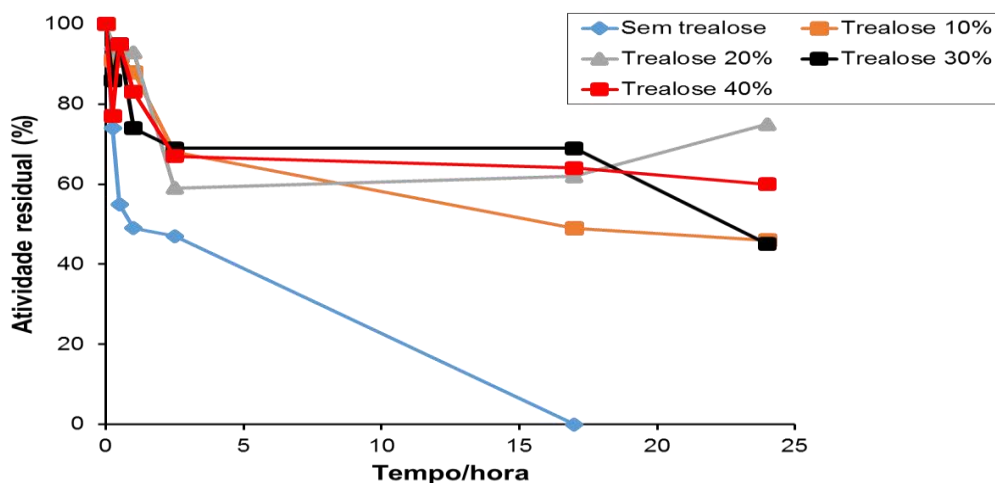
A CMCase mostrou-se bastante instável em pH 10,0. Na Figura 14, observa-se que há uma queda brusca de atividade em pouco tempo de incubação (0,5h), permanecendo com aproximadamente 26% de atividade em 6 horas. Os dados obtidos foram importantes para definirem alguns métodos de imobilização propostos neste trabalho, dados apresentados posteriormente.

Figura 14 – Estabilidade da CMCase do filtrado de *Aspergillus niger* em pH 10,0.

Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

Experimentos foram realizados para determinar a estabilidade frente ao pH 10,0 da enzima CMCase na presença de diferentes concentrações de trealose, agindo como um aditivo estabilizante, preservando a conformação do sítio ativo da enzima. Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que a concentração ideal foi de 20%, preservando cerca de 70 % da atividade enzimática em pH 10,0 por 24 horas. Observa-se, nesta mesma Figura, o perfil da enzima sem o aditivo estabilizante, onde ao longo do ensaio, diminui significativamente a sua atividade.

Figura 15 – Estabilidade da CMCase do filtrado de *Aspergillus niger* em pH 10,0 na presença de aditivo estabilizante.



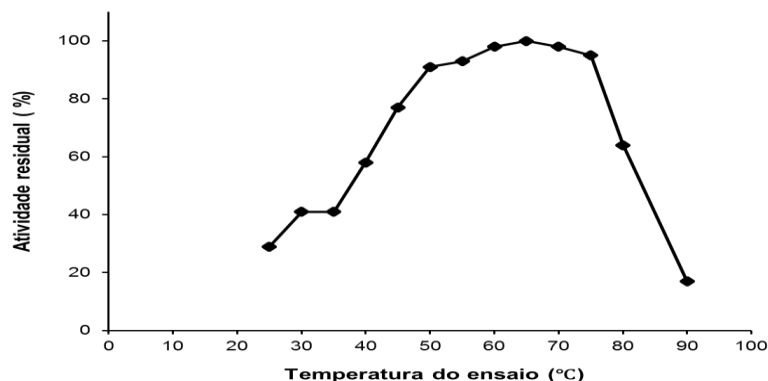
Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.1.3.4 Temperatura ótima

A temperatura ótima da CMCase presente no extrato bruto apresentou uma faixa ampla de atividade na temperatura que vai de 45°C a 75°C, tendo como temperatura ótima 65°C (Figura 16). Na literatura, poucos microrganismos secretam CMCases com temperatura ótima como a encontrada neste trabalho. Esse valor foi igual ao de *Bacillus strains* (MAWADZA et al., 2000), *Alicyclobacillus acidocaldarius* (MORANA et al., 2008) e *Bacillus subtilis* CK-2 (KARI et al., 1994). Celulases apresentam uma ampla faixa de temperatura de 25°C–100°C. O valor de energia de ativação foi de 1,83

Kcal.mol⁻¹, sendo a energia necessária para a hidrólise da carboximetilcelulose em 1%. Para estes cálculos as temperaturas 25°C a 70°C foram utilizadas.

Figura 16 – Efeito da temperatura na atividade da CMCase do filtrado de *Aspergillus niger*.

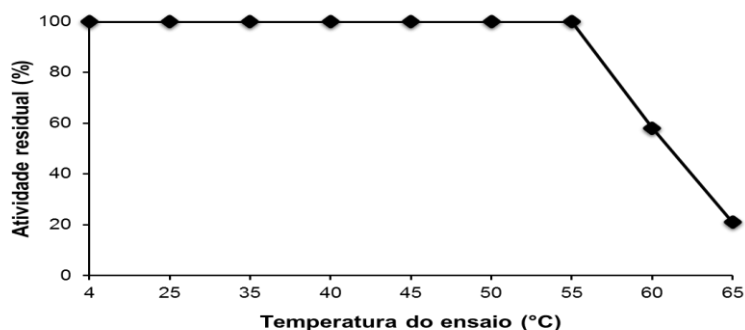


Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.1.3.5 Estabilidade térmica

A enzima celulase manteve 100% de sua atividade na faixa de temperatura de 4°C a 55°C por aproximadamente 30 minutos de incubação. A partir de 65°C, a celulase manteve 20% da atividade. Observa-se também que, conforme há um aumento da temperatura, a atividade diminui significativamente (Figura 17).

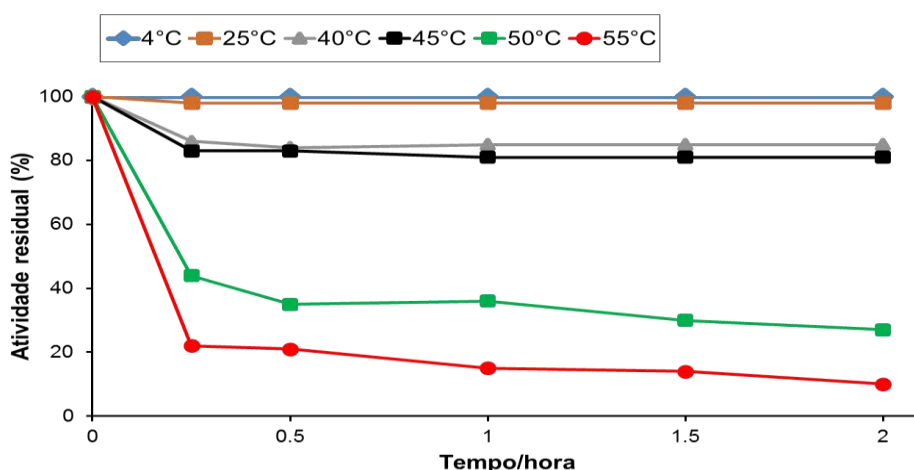
Figura 17 – Estabilidade térmica da CMCase de *Aspergillus niger*, após 30 minutos de incubação, nas diferentes temperaturas.



Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. Os experimentos foram conduzidos em tampão acetato de sódio 50 mmol/L ⁻¹ pH 5.

Quando o ensaio foi conduzido em pH 7,0 em diferentes temperaturas de 4°C a 55°C por pelo menos 2 horas, foi observado que a enzima manteve 100% de atividade em 4°C e 25°C (Figura 18). A 40°C e 45°C, a atividade enzimática foi preservada em torno de 80% por 2 horas. Já a 50°C e 55°C, houve uma rápida queda para ambas. Fica claro que a enzima é instável quando ensaiada com pH neutro em temperaturas elevadas. Quando se trata de imobilização, os dados obtidos são de grande importância, uma vez que, em alguns métodos, a enzima deverá permanecer em condições de pH neutro a variadas temperaturas.

Figura 18 – Estabilidade térmica da CMCase de *Aspergillus niger* a pH 7,0 incubada nas diferentes temperaturas.



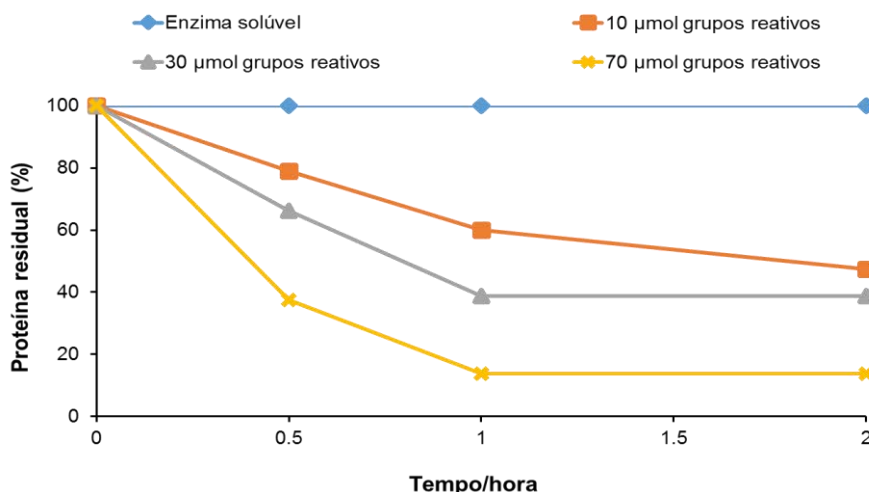
Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L ⁻¹ pH 7,0.

4.1.3.6 Estudos de imobilização das celulasas produzidas por *Aspergillus niger*

O suporte agarose 4 CL, ativado com 10, 30 e 70 µmol de grupos reativos por mL de gel foram testados para a imobilização de CMCases. O grau de ativação do suporte permite controlar a intensidade da interação entre a proteína e o suporte (MATEO et al., 2006). Uma vez obtido este suporte com o grau de grupos desejados, é possível substituir os grupos aldeídos em grupos amino primários. Foram oferecidas 33 U de enzima CMCase por grama de suporte.

A Figura 19 mostra o curso de imobilização em suporte agarose-glutaraldeído com diferentes concentrações em μmol de grupos reativos em relação ao tempo. Observa-se quanto maior a quantidade de grupos reativos na superfície do suporte, maior a interação entre a enzima e o suporte.

Figura 19 – Curso de imobilização da CMCase de *Aspergillus niger* em glutaraldeído-agarose 4 CL.



Ensaio realizado através da determinação de proteínas totais no sobrenadante do ensaio e enzima solúvel proposto por Bradford (1976). O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

Suportes com grupos amino primários (MANAE) orientam a imobilização da enzima através da área de superfície com maior densidade de carga negativa. Esta área é geralmente mais rica em aminoácidos com grupo ácido (glutamato e aspartato) como radical (FERNANDEZ-LAFUENTE, 1993). Este mesmo suporte, com grupos aminos primários em sua superfície, pode reagir com um reagente bifuncional.

O glutaraldeído é um reagente bifuncional muito versátil e reativo para imobilizar enzimas de forma covalente. A imobilização na presença desse reagente pode ocorrer de duas formas. No primeiro processo, podemos adicionar esse reagente diretamente ao suporte e, posteriormente, realizar a imobilização (ligação unipontual). O segundo processo, chamado de entrecruzamento, o reagente é adicionado diretamente ao derivado após o processo de imobilização, por exemplo, em MANAE.

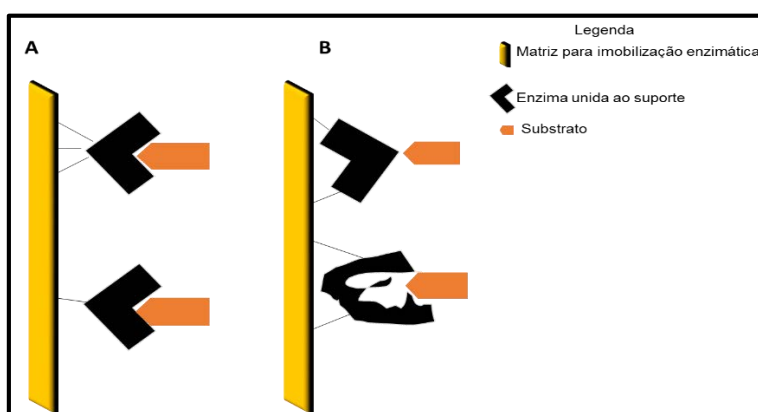
Segundo Gallego (2006), nos dois protocolos de imobilização a enzima primeiramente se adsorve ionicamente ao suporte e posteriormente ocorre a reação

com o glutaraldeído, nessa condição, a enzima se imobiliza covalentemente ao suporte.

De acordo com Fernandez-Lafuente (1995), a orientação da imobilização da enzima em suportes ativados com glutaraldeído ocorre através dos grupos amino de mais baixo pK. Estes grupos correspondem aos aminos terminais. De acordo com Khademi et al (2002), CMCase secretadas por *Aspergillus niger*, apresentam quantidades de 19 aminoácidos carregados negativamente e 11 carregados positivamente (lisina, arginina e histidina).

Um bom protocolo de imobilização deve manter alta atividade catalítica após o processo de imobilização (MATEO et al., 2007). No entanto, algumas enzimas acabam se imobilizando com o seu sítio catalítico voltado para o interior do suporte, ou até mesmo desestabilizando o sítio catalítico durante o processo de imobilização, a Figura 20 mostra o processo ideal de imobilização de enzimas na superfície de um suporte. Esses eventos foram observados neste trabalho. A medida adotada foi realizar a imobilização na presença do substrato carboximetilcelulose. Quando a imobilização ocorre nessas condições a tendência é que o substrato mantenha o centro ativo enzimático íntegro, dessa forma, o sítio catalítico se ocupará com o substrato, orientando favoravelmente a imobilização, deixando assim, o seu sítio catalítico livre após o processo de imobilização.

Figura 20 – Representação esquemática do processo de imobilização sobre a superfície de um suporte.



Fonte: Própria autoria. **A)** - Representação esquemática de um método favorável de imobilização, observa-se o sítio catalítico voltado para o exterior do suporte. **B)** - Representação esquemática de um método desfavorável de imobilização, observa-se o sítio catalítico voltado para o interior do suporte e desestabilização do mesmo.

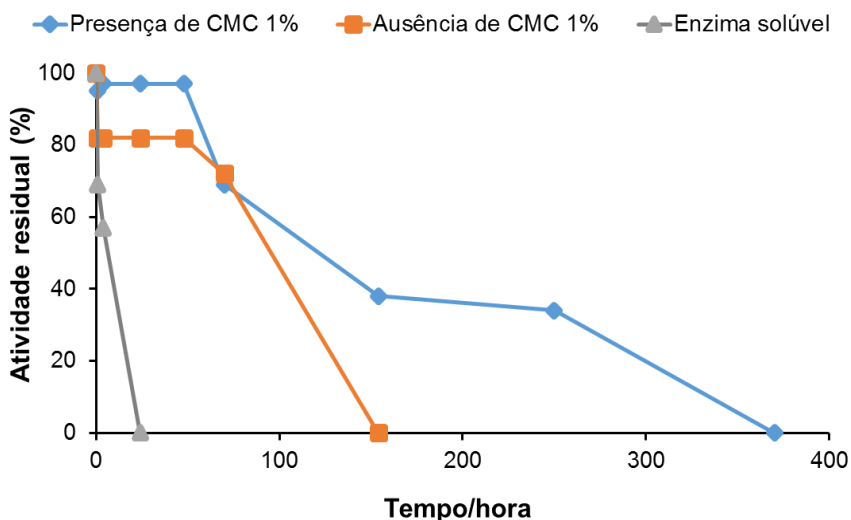
4.1.3.7 Estabilidade do derivado CM-agarose

Experimentos comparativos entre dois ensaios de imobilização em agarose ativada a glutaraldeído foram obtidos derivados ligados unipontualmente. Constatou-se que o derivado enzimático obtido com a presença do substrato, preservou em aproximadamente 35% em 250 horas a sua atividade catalítica a 60°C comparado com o derivado sem a presença do substrato.

A temperatura de 60°C foi eleita, pois é notório que através da inativação térmica a enzima solúvel se inativa quase por completo. Dessa forma, quando um derivado enzimático é testado a uma temperatura considerada desnaturante para a enzima solúvel, podemos avaliar a proporção de estabilidade térmica do derivado frente a mesma.

A Figura 21 mostra o perfil comparativo entre esses dois derivados e a enzima solúvel. Observa-se também que a enzima solúvel em 4 horas de reação perde aproximadamente 43% de sua atividade, chegando à inativação total em 24 horas.

Figura 21 – Inativação térmica a 60°C da enzima CMCase livre de *Aspergillus niger* em suporte glutaraldeído-agarose.



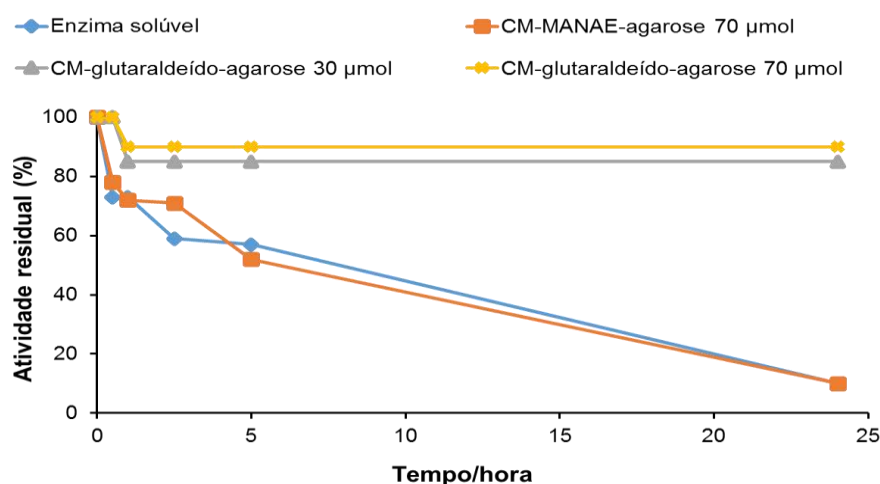
Ensaio de atividade enzimática conduzidos conforme descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

A Figura 22 mostra a inativação térmica dos derivados CM-glutaraldeído-agarose com 70 μmol ; CM-glutaraldeído- agarose com 30 μmol e CM-MANAE-agarose com 30 μmol de grupos aldeídos na superfície do suporte comparados a enzima solúvel.

Os resultados revelam, claramente, que os derivados CM-glutaraldeído com 30 e 70 μmol de grupos reativos toleraram condições mais elevadas de temperatura, quando comparados a enzima solúvel e ao derivado CM-MANAE-agarose. Este fato se deve pela interação enzima – suporte e ocorrerem através de ligação unipontual covalente, como explicado anteriormente.

Já em agarose-MANAE, a imobilização entre a enzima e o suporte se dá por interações iônicas, ou seja, ligações fracas, quando comparada a ligações covalentes.

Figura 22 – Inativação térmica a 60°C da CMCase de *Aspergillus niger* em suporte agarose com 30 e 70 μmol de grupos reativos.



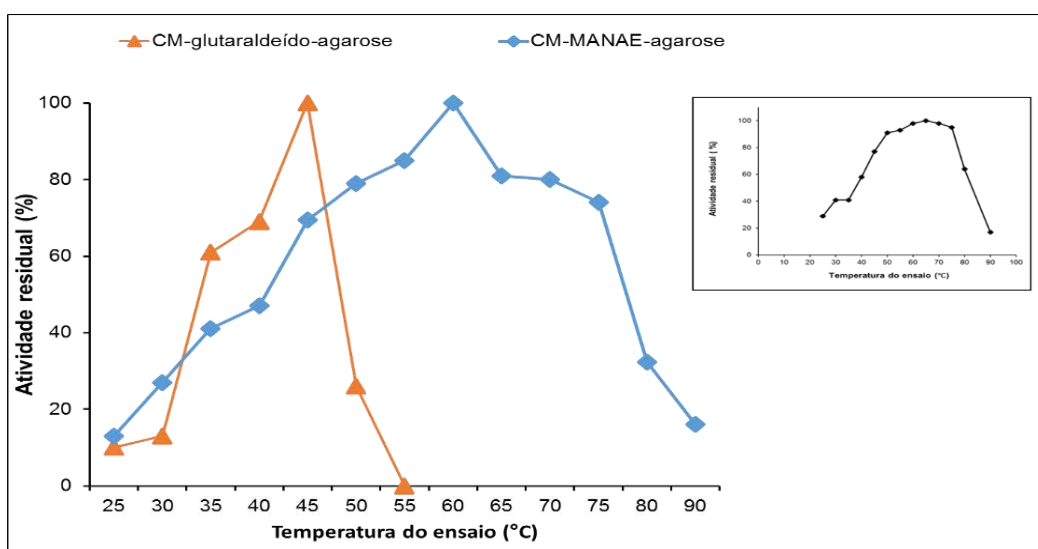
Ensaio de atividade enzimática conduzidos conforme descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

Após os resultados obtidos, determinou-se que os ensaios de imobilização seriam conduzidos sempre na presença do substrato e com 70 μmol de grupos reativos.

4.1.3.8 Temperatura ótima dos derivados CM-agarose

As atividades dos derivados glutaraldeído-agarose e MANAE-agarose foram também observadas em diferentes temperaturas (Figura 23). O derivado CM-glutaraldeído-agarose apresentou temperatura ótima a 45°C, abaixo daquela encontrada para a enzima livre (65°C). Esse fato deve-se a “Efeitos Difusionais”, que é a ocorrência de acúmulo de produto na proximidade do centro ativo, o que pode afetar a cinética da reação pela redução da velocidade de reação (BON et al., 2008). Já a temperatura ótima encontrada para o derivado CM-MANE-agarose foi de 60°C, bem próxima à encontrada para a enzima solúvel.

Figura 23 – Influência da temperatura na atividade enzimática da CMCase imobilizada em glutaraldeído-agarose e MANAE-agarose.



Inserto: temperatura ótima da CMCase solúvel de *A. niger*. Ensaios da atividade enzimática conduzidos conforme descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.1.3.9 Atividade recuperada

Na Tabela 6 observa-se que os derivados MANAE apresentaram atividade recuperada acima de 87%. Para os derivados glutaraldeído, a atividade recuperada foi em torno de 21 e 12%. O fato da atividade recuperada ser menor não quer dizer

que o processo de imobilização tenha sido irrelevante, pois o primordial é a estabilidade desse derivado comparado a enzima solúvel. Como já visto, a ocorrência de múltiplas celulases é observada em diversos microrganismos como o *Aspergillus niger*, que pode secretar até três diferentes celulases (JUTURU; WU 2014). Isso pode explicar que o motivo de que nem toda enzima oferecida ao suporte é imobilizada, mesmo após duas horas de contato enzima-suporte.

Tabela 6 – Atividade recuperada da CMCase de *Aspergillus niger*, imobilizada em agarose com diferentes ativações.

Derivados enzimáticos	Atividade recuperada (%)
CM-MANAE-agarose 1	87
CM-MANAE-agarose 2	88
CM-glutaraldeído-agarose 3	21
CM-glutaraldeído- agarose 4	12

(1): CM-MANAE-agarose; (2): CM-MANAE-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização); (3): CM-glutaraldeído-agarose; (4): CM-glutaraldeído-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização). Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

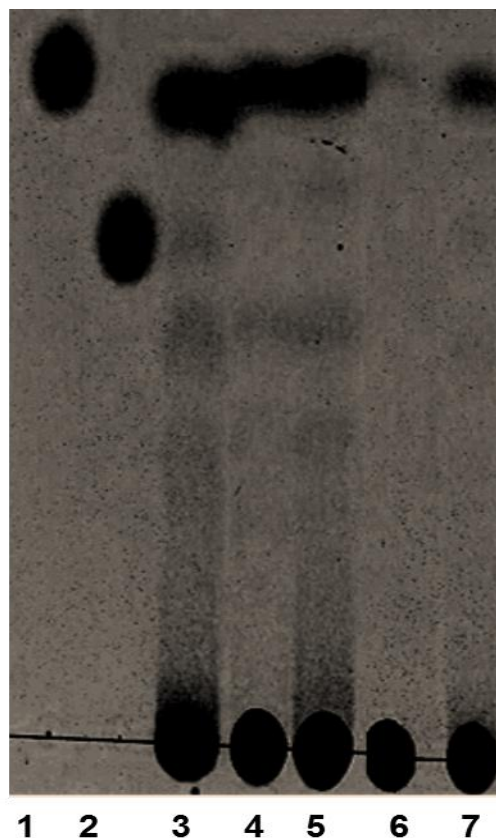
4.1.3.10 Análise dos produtos de hidrólise

Realizou-se cromatografia em camada delgada (TLC) com o objetivo de comparar qualitativamente os produtos de hidrólise da enzima solúvel e de seus derivados. Os ensaios foram conduzidos por 16 horas a 50°C em substrato carboximetilcelulose 1%.

A Figura 24 mostra os derivados produzidos com MANAE-agarose. Esses derivados apresentaram a mesma capacidade de hidrólise do substrato quando comparados à enzima solúvel. O produto de hidrólise observado foi glicose e alguns resquícios de celo-oligossacarídeos, mostrando a presença ativa da β -glicosidase na conversão de celobiose a glicose. Já para os derivados de glutaraldeído-agarose, somente o suporte que foi imobilizado na presença do substrato apresentou capacidade de hidrólise, esses dados mostram claramente que mesmo com baixa

atividade recuperada, o derivado CM-glutaraldeído-agarose preservou as suas características catalíticas.

Figura 24 – Cromatografia em camada delgada TLC representando produto de hidrólise de 1% carboximetilcelulose por enzimas livres e derivados de *Aspergillus niger*.



Legenda: 1-Padrão glicose; 2- Padrão celobiose; 3- Enzima solúvel; 4-CM-MANAE-agarose; 5- CM-MANAE-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização); 6: CM-glutaraldeído-agarose; 7: CM-glutaraldeído-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização). Os dados representam a média de dois experimentos independentes.

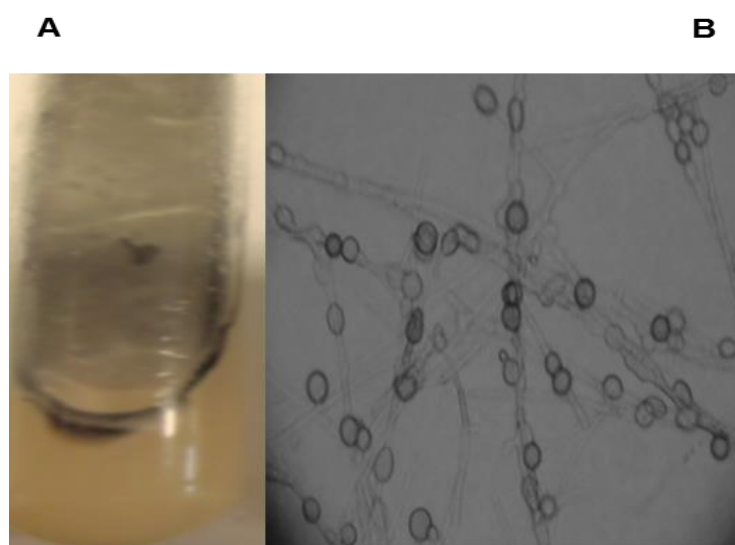
Os dados obtidos são importantes para a obtenção de derivados enzimáticos ativos e estabilizados, e promissores para a produção de açúcares, utilizando o substrato carboximentilcelulose.

4.6 Celulasas de *Humicola grisea*. var. *thermoidea*

4.6.1 Identificação do fungo

O fungo *Humicola* foi isolado do solo brasileiro e classificado como *H. grisea* var. *thermoidea*, de acordo com as características morfológicas e fisiológicas propostas por Cooney e Emerson (1964).

Figura 25 – Características morfológicas macroscópicas e microscópica através de microscopia óptica em aumento de 400x do conidióforo do fungo *H. grisea*.



A- Características morfológicas macroscópicas; B- Características morfológicas microscópicas.

4.6.2 Fermentação em meio-submerso

A CMCase foi produzida em fermentação submersa em meio M6, como descrito em métodos. Testada em diferentes tempos com temperatura fixada a 40°C. A Tabela 7 mostra que a utilização de fontes de carbono, como pó de sabugo de milho, pó de bagaço de cana-de-açúcar e xilana, em concentrações de 1%, não foram satisfatórias para a produção de CMCases nos distintos tempos. A atividade específica não ultrapassou 5,75 U.mg⁻¹.

Tabela 7 – Atividade da CMCase dos filtrados de cultura do fungo *H. grisea*, utilizando distintas fontes de carbonos em diferentes tempos.

Fontes de carbono									
Tempo (H)	Pó de sabugo de milho (1%)			Pó de bagaço de cana (1%)			Xilana (1%)		
	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	CMCase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	CMCase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	CMCase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹
24	0,200	1,05	5,25	0,185	1,06	5,73	0,141	0,17	1,20
48	0,490	1,67	3,41	0,460	2,42	5,27	0,295	0,17	0,57
72	0,672	2,60	3,90	0,675	2,63	3,90	0,295	0,16	0,54

Meio de M6 (descrito em Material e Métodos) em pH inicial 6,0. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

Quando os ensaios de fermentação foram conduzidos em fonte de carbono Avicel® 1%, observou-se uma produção relevante de enzimas celulolíticas e xilanolíticas. O tempo de escolha para a produção de CMCases foi de 24 horas, no qual revelou uma atividade específica de 14,8 U.mg⁻¹ (Tabela 8). Portanto, determinou-se que toda a produção dessas enzimas seria realizada em meio de cultivo M6 em pH 6,0, com Avicel® a 1% por 24 horas a 140 oscilações por minuto.

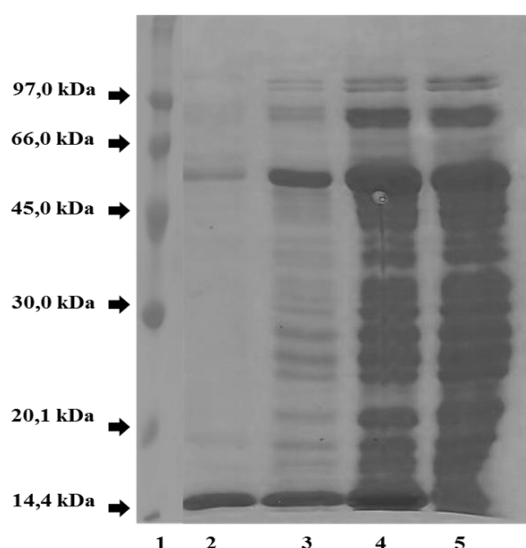
Tabela 8 – Atividade celulolítica e xilanolítica dos filtrados de cultura do fungo *H. grisea*, utilizando Avicel® 1% em diferentes tempos.

Tempo (h)	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	CMCase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Avicelase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	β glicosidase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹	Xilanase (U.mL ⁻¹)	U.mg ⁻¹
24	0,115	1,70	14,8	0,042	0,36	15,50	134	0,221	1,92
48	0,181	1,54	8,50	0,22	1,20	83,57	462	0,721	4,00
72	0,363	3,20	8,81	0,72	2,00	125	344	1,404	3,40
120	0,579	3,97	6,85	1,1	1,9	420	725	1,670	2,90

Meio de M6 (descrito em Material e Métodos) em pH inicial 6,0. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

A Figura 26 mostra o aumento de bandas proteicas em relação ao tempo de fermentação em cultura submersa em fonte de carbono Avicel® 1%. Conforme o tempo de fermentação é prosseguido, há um aumento significativo das bandas proteicas.

Figura 26 – SDS-PAGE do extrato bruto de *H.grisea* em diferentes tempos de fermentação, utilizando como fonte de carbono Avicel® 1%.



Legenda: (1) marcador de massa molecular; (2) extrato bruto em 24 horas; (3) extrato bruto em 48 horas; (4) extrato bruto em 72 horas; (5) extrato bruto em 120 horas.

A concentração proteica do extrato enzimático em etanol 3:1 (solvente: extrato) se fez necessária em determinados momentos. A Tabela 9 mostra que a precipitação preservou a atividade específica da CMCase e diminuiu significativamente a atividade para β glicosidase. Já para a avicelase, houve notável melhora, enquanto para xilanase, uma considerável diminuição da atividade enzimática.

Tabela 9 – Atividade da CMCase, β glicosidase e xilanase após a precipitação do extrato enzimático com etanol.

Enzimas				
	CMCase	β glicosidase	Avicelase	Xilanase
Atividade (U.mL⁻¹)	16,22	54,86	0,62	1,94
Proteína (mg.mL⁻¹)	1,21	1,21	1,21	1,21
Atividade específica (U.mg⁻¹)	13,40	45,34	0,51	1,60

Para um volume de reação final de 1mL foram utilizados: CMCase-10 μ l de extrato; β glicosidase- 10 μ l de extrato; avicelase- 10 μ l de extrato; xilanase- 10 μ l, nas condições descritas em métodos. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. O extrato utilizado para a concentração proteica foi aquele obtido em 24 horas em meio M6 com Avicel[®] como fonte de carbono.

4.2 Ensaios cinéticos da CMCase produzida por *Humicola grisea* var. *thermoidea*

4.2.1 Perfil de hidrólise do substrato carboximetilcelulose

A fim de avaliar perfil de hidrólise da enzima CMCase, foi realizado o ensaio em diferentes concentrações de viscosidade dinâmica da carboximetilcelulose expresso em centipoise (cps). Na Tabela 10, podemos observar um perfil de hidrólise muito similar em todas as diferentes concentrações ensaiadas. Estes resultados mostram a capacidade hidrolítica dessa enzima sob a carboximetilcelulose.

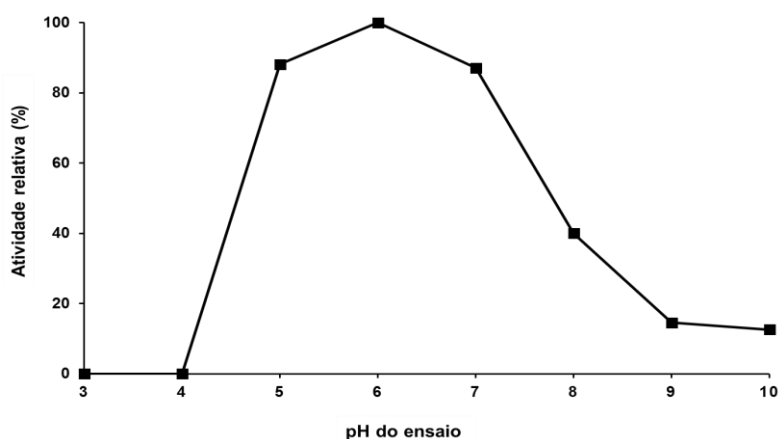
Tabela 10 – Perfil de hidrólise da carboximetilcelulose (CMC) pela CMCase de *H. grisea*.

CMC 1% (Viscosidade (%) *CPS)	U.mL ⁻¹
1.000-2.000	16,22
6.000	15,12
30.000	15,40
50.000	16,00

Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. Os experimentos foram conduzidos a 50 °C e os substratos preparados em tampão acetato de sódio 0,05 mol/L⁻¹ pH 5. Para um volume de reação final de 1mL foi utilizado 10µl de extrato. *CPS- viscosidade dinâmica.

4.2.2 pH ótimo

A enzima CMCase secretada por *H. grisea* foi ensaiada em diferentes valores de pH. O pH ótimo encontrado para essa enzima foi pH 6,0, apresentando uma faixa considerável de atividade relativa entre o pH 5,0 - 7,0. De acordo com Takashima (1996), foram encontrados valores de pH idênticos para CMCases.

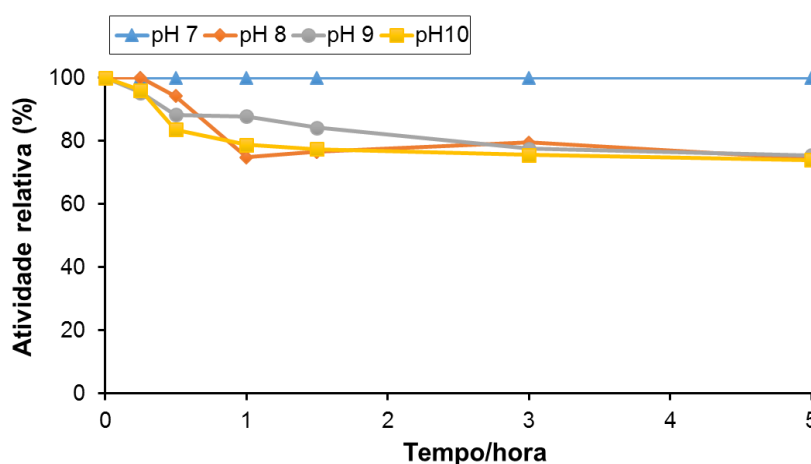
Figura 27 – Efeito do pH na atividade da CMCase do filtrado de *H. grisea*

Ensaio conduzidos em pH apropriados de McIlvaine pH 2-8 0,2 mol/L⁻¹ para pH 9-10 tampão carbonato/borato 0,1 mol/L⁻¹. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.2.3 Estabilidade ao pH

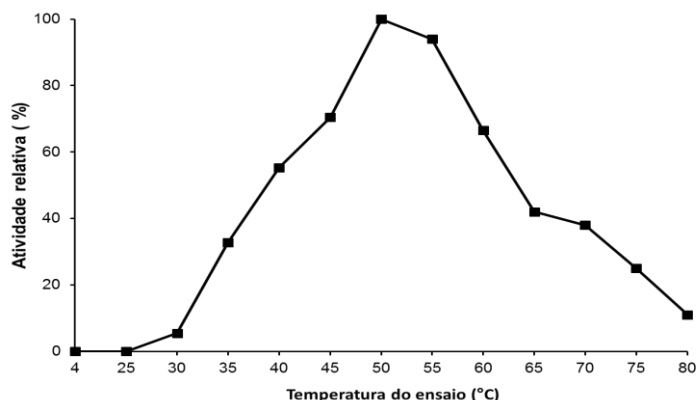
A CMCase secretada pelo *H. grisea* preservou 100% de sua atividade catalítica durante 5 horas de ensaio a pH 7,0. A Figura 28 mostra que nos demais valores de pH ensaiados (8, 9 e 10) foi possível preservar 80% de atividade relativa por até 5 horas de ensaio. A mesma faixa de estabilidade frente ao pH foi encontrada por Takashima (1995).

Figura 28 – Estabilidade da CMCase do filtrado de *H. grisea* em diferentes valores de pH a 25°C.



Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

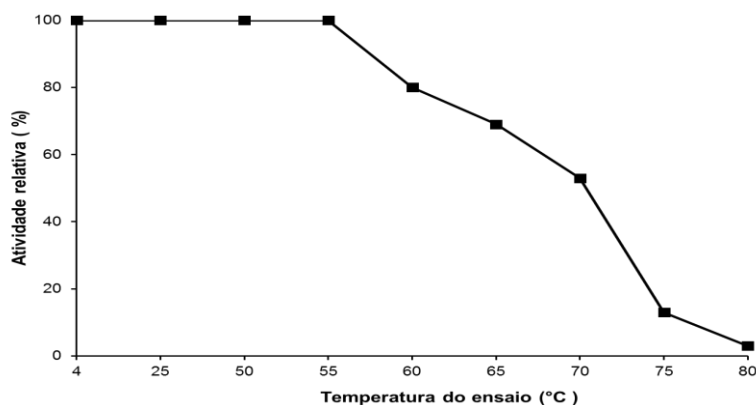
A temperatura ótima para CMCase de *H. grisea* foi de 50°C (Figura 29) em uma faixa de 45°C a 60°C, segundo Soudar e Chandra (1987) a faixa de temperatura ótima encontrada para celulase produzida por *H. grisea* foram as mesmas encontradas neste trabalho.

Figura 29 – Efeito da temperatura na atividade da CMCase do filtrado de *H.grisea*.

Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.2.4 Estabilidade térmica

A enzima CMCase manteve 100% de sua atividade na faixa de temperatura de 4°C a 55°C por aproximadamente 30 minutos de incubação. A partir de 65°C, a CMCase diminui constantemente, apresentando meia vida enzimática a 70°C (Figura 30). O valor de energia de ativação foi de 1,63 Kcal.mol⁻¹ (faixa de temperatura de 25 °C-50°C) sendo determinada como a energia necessária para a hidrólise da carboximetilcelulose em 1%.

Figura 30 – Estabilidade térmica da CMCase de *H.grisea*, após 30 minutos de incubação, nas diferentes temperaturas.

Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. Os experimentos foram conduzidos em tampão acetato de sódio 0,05 mol/L⁻¹ pH 5.

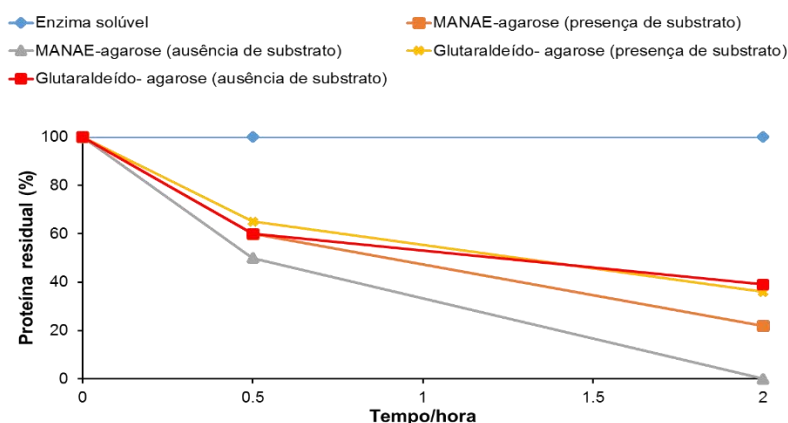
4.2.5 Estudos de imobilização

Estudos prévios de imobilização de CMCase secretada por *H. grisea* foram realizados. Iniciou-se a imobilização em agarose ativada a glicol e agarose ativada com grupos epóxidos, dados não apontados. Como a enzima se apresentou estável ao pH 10,0, inicialmente, objetivamos a imobilização covalente multipontual, promovendo a estabilização da estrutura tridimensional da enzima (GUISÁN, 1988; MATEO et al., 2005).

Embora a enzima tenha se apresentado estável ao pH 10,0, foi observado, ao acompanhar o curso de imobilização, que a enzima não se imobilizava ao suporte. Estes resultados nos fizeram concluir que a CMCase secretada por *H. grisea* apresentava o mesmo perfil da CMCase secretada por *A. Níger*, onde os ensaios de imobilização deveriam ser realizados em condições suaves, de pH e força iônica. Nestas condições, seria possível manter estável o sítio catalítico enzimático.

A CMCase foi imobilizada em agarose 6 CL ativada com 95 μ mol de grupos MANAE ou glutaraldeído por mL de gel. Foram oferecidas 13 U de enzima por grama de suporte. A Figura 31 mostra o curso de imobilização nos suportes iônicos MANAE-agarose e glutaraldeído-agarose. Para ambos, a presença do substrato junto ao extrato enzimático foi testada observando a orientação do processo de imobilização.

Figura 31 – Curso de imobilização da CMCase de *H. grisea* em MANAE-agarose e glutaraldeído-agarose 6CL.



Ensaios realizados através da determinação de proteínas totais no sobrenadante do ensaio e enzima solúvel proposto por Bradford (1976) Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

Os suportes MANAE-agarose apresentaram-se promissores para a imobilização dessas enzimas, onde observamos que na ausência do substrato carboximetilcelulose 1%, aproximadamente 100% da CMCase aderiam-se ao suporte. Já para MANAE-agarose na presença do substrato, houve 80% de ligação da CMCase ao mesmo.

Em glutaraldeído-agarose podemos observar que, tanto para os ensaios na presença ou ausência do substrato, houve aproximadamente 60% de ligação da enzima ao suporte em 2 horas de imobilização.

4.2.5.1 Atividade recuperada

A Tabela 11 mostra a atividade recuperada após o processo de imobilização. Podemos observar que para os derivados MANAE-agarose a atividade recuperada foi distinta, provando, mais uma vez, que a presença do substrato é de grande importância para a imobilização de CMCases, esse derivado apresentou 42% a mais de atividade quando comparado ao derivado conduzido sem a presença do substrato. O mesmo ocorreu para os derivados glutaraldeído-agarose, a presença do substrato foi essencial para preservar a atividade da CMCase.

Tabela 11 – Representação percentual de atividade recuperada dos derivados de *H.grisea*.

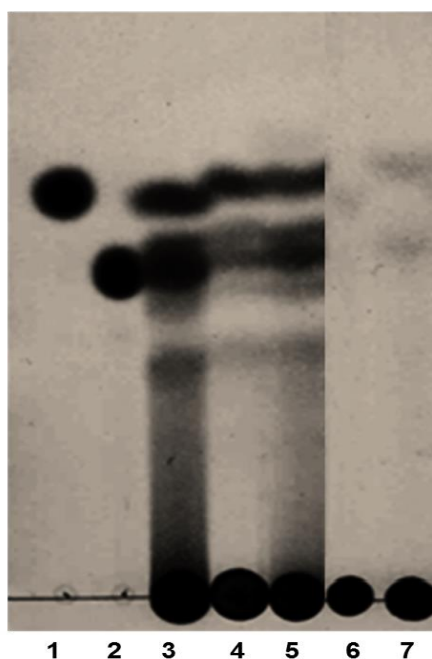
Derivados enzimáticos	Atividade recuperada (%)
CM-MANAE-agarose 1	58
CM-MANAE-agarose 2	100
CM-Gutaraldeído-agarose 3	NC
CM-Gutaraldeído- agarose 4	16,5

(1): CM-MANAE-agarose; (2): CM-MANAE-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização); (3): CM-glutaraldeído-agarose; (4): CM-glutaraldeído-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização). Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. *NC- não constatado.

Para analisar qualitativamente o perfil de hidrólise da carboximetilcelulose 1% foi realizado cromatografia em camada delgada (TLC). A Figura 32 revela que os

derivados obtidos através de suportes glutaraldeído apresentaram apenas resquícios de açúcares, quando comparado a enzima solúvel e derivados MANAE-agarose. Os produtos de hidrólise obtidos foram glicose, celobiose e celotriose. É importante ressaltar que o derivado enzimático não apresenta somente CMCases, mas sim, enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico. A grande influência do dissacararídeo celobiose se deve ao fato da baixa atividade de celobiase presente no extrato secretado pelo *H. grisea*.

Figura 32 – Cromatografia em camada delgada TLC representando produto de hidrólise de 1% carboximetilcelulose por enzimas livres e derivados de *H. grisea*.



Legenda: 1-Padrão glicose; 2- Padrão celobiose; 3- Enzima solúvel; 4-CM-MANAE-agarose; 5- CM-MANAE-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização); 6: CM-glutaraldeído-agarose; 7: CM-glutaraldeído-agarose (substrato adicionado ao extrato enzimático para imobilização).

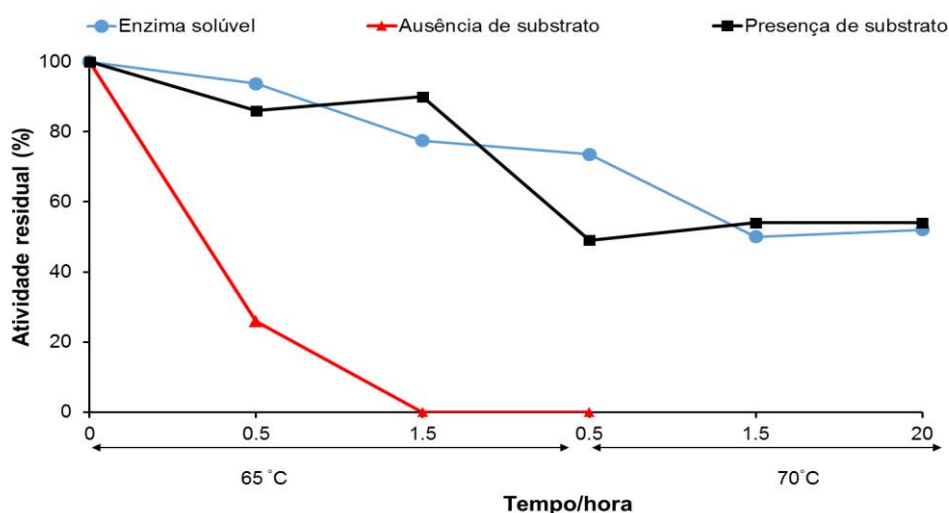
4.2.5.2 Estabilidade dos derivados CM-MANAE-agarose

Para avaliar o efeito da imobilização da CMCase foi realizado a inativação térmica dos derivados, comparando-os com a enzima solúvel. Os derivados selecionados foram aqueles que apresentaram boa capacidade hidrolítica quando comparados à enzima solúvel, dados mostrados anteriormente. O que se observa na Figura 33 é o perfil catalítico dos derivados quando ensaiados em uma faixa de

temperatura a 65°C por 1,5 horas. Nessas condições o derivado, na ausência do substrato, se inativa por completo. É possível que essa instabilidade se deve ao fato do processo de imobilização esconder totalmente o sítio catalítico enzimático.

A enzima solúvel e o derivado obtido através da presença do substrato, quando submetidos a elevação de 5°C na temperatura, apresentaram o mesmo perfil catalítico por 20 horas. Estes resultados mostram claramente a importância do substrato na condução da imobilização, mesmo que a enzima solúvel apresente perfil cinético semelhante.

Figura 33 – Inativação térmica a 65°C e 70°C dos derivados de CMCase de *H. grisea* em suporte Agarose-MANAE.



Ensaio de atividade enzimática conduzidos conforme descrito em materiais e métodos. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. As flechas indicam acréscimo de temperatura no mesmo ensaio.

4.3 Estudos de imobilização de celulases de *A. niger* e *H. grisea* e coquetel enzimático dos respectivos fungos

4.3.1 Estudo comparativo de imobilização através de entrecruzamento

Objetivando a produção de açúcares através do processo de sacarificação em compostos celulósicos, enzimas importantes desse complexo como CMCases, β -glicosidases e xilanases foram avaliadas em determinados experimentos.

O desenvolvimento de metodologia que pode aumentar a estabilidade da enzima é um objetivo importante na tecnologia enzimática (FERNANDEZ-LAFUENTE, 1994). Com o intuito da estabilização de enzimas celulasas secretadas por *A. niger* e *H. grisea*, foi realizado um estudo de imobilização por entrecruzamento, no qual primeiramente, as proteínas irão se adsorver ao suporte MANAE-agarose e posteriormente, entrecruzar (reticular) com o glutaraldeído. De acordo com Fernandez-Lafuente (1995), imobilizações em suportes que utilizam glutaraldeído devem ser conduzidos entre pH 7,0 e 8,0, devido à baixa estabilidade do glutaraldeído a valores altos de pH.

O extrato enzimático bruto de *A. niger*, *H. grisea* e o coquetel enzimático, composto por quantidades em mL1:1 desses extratos brutos, foram imobilizados em agarose 6 CL ativada com 95 μ mol de grupos MANAE por mL de gel. Após 2 horas de contato prévio entre o suporte e as enzimas, foi realizado o entrecruzamento com glutaraldeído. Segundo Fernandez-Lafuente (1995), a modificação dos grupos primários de superfície da proteína pelo entrecruzamento com glutaraldeído podem ser controlados pelo tempo, concentração e pH dessa solução. Concentrações muito elevadas de glutaraldeído podem desfavorecer a reticulação dos grupos amino das proteínas, portanto, concentrações mais suaves e tempo menos prolongado seria o protocolo mais indicado.

Em experimentos realizados foi constatado que ao utilizar 0,5 % de glutaraldeído por um período de 4 horas, a atividade das enzimas CMCase imobilizadas eram 50% menor quando comparado a derivados mantidos nesta mesma concentração por 1 hora. A partir desse resultado, determinou-se então a utilização das condições ditas anteriormente. A Tabela 12 mostra a carga de proteína em U/mg utilizadas para o ensaio de imobilização. Apesar da diminuição dos valores de atividade enzimática no coquetel em experimentos preliminares foi verificado que o coquetel, assim estabelecido, mostrou uma eficiente hidrólise quando comparado com os extratos separadamente.

Tabela 12 – Carga proteica de enzimas celulolíticas e xilanolíticas oferecidas ao suporte para imobilização.

U/mg/grama de suporte agarose 6 CL			
Fontes	CMCases	β -glicosidases	Xilanases
<i>H. grisea</i>	13	45	1,6
<i>A.niger</i>	33	419	303
Coquetel	18	260	200

Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.3.2 Rendimento de imobilização e Atividade recuperada

O processo de imobilização foi realizado com e sem a presença do substrato CMC1% para ambas as enzimas e o coquetel enzimático. O rendimento de imobilização (RI) foi determinando através de proteínas totais, portanto, não representa individualmente cada enzima. Os derivados obtidos com a utilização do extrato enzimático mostram que a presença do substrato é prejudicial à imobilização das enzimas CMCases e xilanases em determinados derivados. Esse efeito é mais sutil nos derivados obtidos com a utilização do extrato enzimático secretado pelo *A. níger*, onde as CMCases apresentaram atividade recuperada (AR) significativa quando na presença do substrato. As β -glicosidases mantiveram-se com 100% de AR nos dois derivados. As xilanases apresentaram um comportamento mais relevante quando na ausência do substrato. A Tabela 13 mostra o perfil de rendimento de imobilização em MANAE-agarose e atividade recuperada após o entrecruzamento com glutaraldeído.

Para os derivados obtidos através do coquetel enzimático (COQ) a atividade recuperada foi melhor notada quando na ausência do substrato. Essas diferenças de AR podem ser explicadas por tratar-se de glicoproteínas, nas quais cada enzima possui uma quantidade diferente de carboidratos, o que pode dificultar as interações iônicas entre o suporte e a regiões carregadas negativamente da superfície proteica.

Tabela 13 – Perfil do rendimento de imobilização em MANAE-agarose e atividade recuperada em glutaraldeído-agarose.

Derivados	RI (%)	AR (%) Enzimas CMCases	AR (%) Enzimas Xilanases	AR (%) Enzimas β -glicosidases
Hg-glutaraldeído-agarose 1	99	69	60	76
Hg-glutaraldeído-agarose 2	75	25	0	0
An-glutaraldeído-agarose 3	90	61	75	100
An-glutaraldeído-agarose 4	32	80	55	100
Coq-glutaraldeído-agarose 5	80	100	57	100
Coq-glutaraldeído-agarose 6	32	66	0	100

(1;3;5) - Imobilização sem o substrato carboximetilcelulose 1%. (2; 4;6) - Imobilização na presença do substrato. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. *AR (Atividade recuperada); RI (Rendimento de imobilização). Os dados obtidos do RI foram obtidos através da determinação de proteínas totais (BRADFORD, 1956).

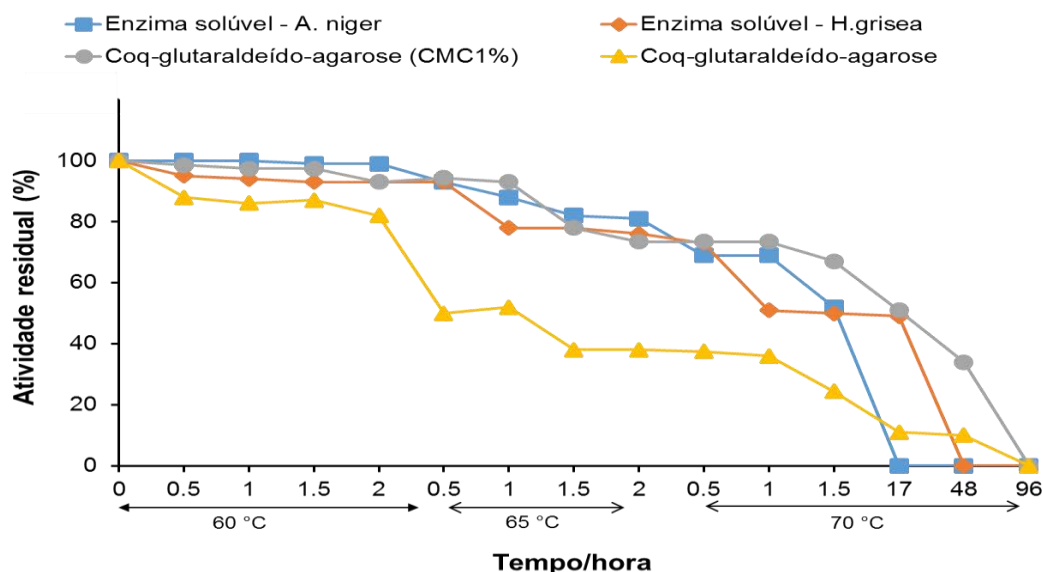
4.3.3 Inativação térmica

A enzima CMCase solúvel e os derivados Coq-glutaraldeído-agarose imobilizados na presença e ausência do substrato foram ensaiados em temperaturas de 60°C; 65°C e 70°C. A Figura 34 mostra o perfil dessas enzimas nestas temperaturas. Podemos observar que a CMCase solúvel de *A. niger* preservou sua atividade residual por até 2 horas de ensaio a 60°C, para CMCase de *H. grisea*, a atividade foi preservada em 50% a 65 °C por até 17 horas de ensaio.

O derivado Coq-glutaraldeído-agarose apresentou similaridade com o perfil cinético da CMCase solúvel de *H. grisea* no mesmo tempo e temperatura de ensaio. O respectivo derivado preservou 34% de atividade residual por até 48 horas de ensaio, garantindo vantagens sobre as enzimas solúveis. Em contrapartida, o derivado Coq-glutaraldeído-agarose obtido na ausência do substrato, apresentou perda de atividade enzimática a partir de 1 hora de incubação a 65°C, conferindo menor estabilidade quando comparado as demais enzimas solúveis e derivado.

Estes resultados demonstram a eficiência do substrato na condução da imobilização para a preservação da estrutura terciária enzimática pela temperatura.

Figura 34 – Inativação térmica em diferentes temperaturas de CMCases de *A. niger*; *H. grisea* solúveis: comparação entre os derivados Coq-glutaraldeído-agarose, na presença e ausência do substrato carboximetilcelulose 1%.



Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio padrão nunca foi maior que 5% em relação à média. As flechas indicam acréscimo da temperatura no mesmo ensaio.

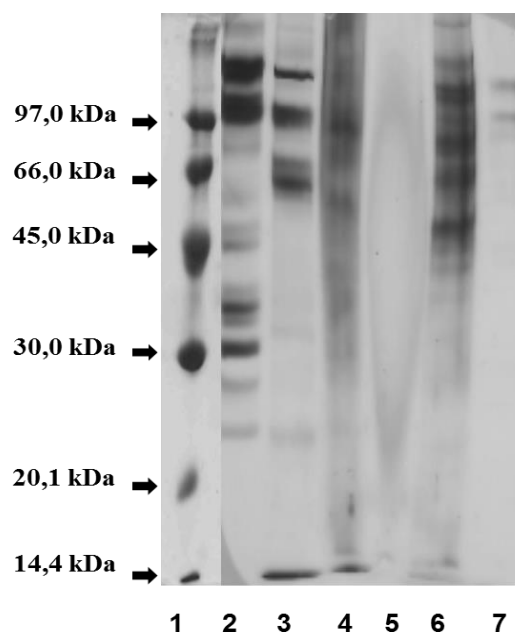
4.3.4 SDS-PAGE

A fim de comprovar a imobilização covalente das proteínas ao suporte, os derivados foram conduzidos à fervura com tampão de ruptura para SDS-PAGE/mercaptoetanol, que é um agente redutor de pontes dissulfeto de proteínas. O sobrenadante da reação de imobilização foi diluído no mesmo tampão. Na Figura 35 é exibida a SDS-PAGE dos produtos de imobilização dos derivados Coq-glutaraldeído-agarose na presença e ausência do substrato, com seus respectivos sobrenadantes. Os resultados mostraram que ao conduzir o processo de imobilização na presença do substrato, não era observado o aparecimento de banda proteica. Em contrapartida, o derivado sem a presença do substrato, quando submetido à mesma condição, revelou bandas proteicas acima de 97 kDa.

Estes resultados, ressaltam a importância da utilização do substrato para a reação de imobilização, promovendo a orientação das proteínas com seu sítio catalítico voltado ao exterior do suporte e assim, preservando sua estrutura tridimensional e a mantendo estável. Fernández-Lorente et al. (2006), relatou a

utilização de substrato para a estabilização de enzimas lipases em suporte MANAE-agarose com entrecruzamento com glutaraldeído para a manutenção da conformação proteica e estabilização da mesma.

Figura 35 – SDS-PAGE dos produtos de imobilização dos derivados Coq-glutaraldeído-agarose secretadas por *A. niger* e *H. grisea*.



Legenda: (1) Padrão de massa molar; (2) Enzima solúvel de *A. niger*; (3) Enzima solúvel de *H. grisea*; (4) Sobrenadante da imobilização na presença de substrato; (5) Coquetel-glutaraldeído-agarose (presença de substrato); (6) Sobrenadante da imobilização sem substrato; (7) Coquetel-glutaraldeído-agarose (ausência de substrato).

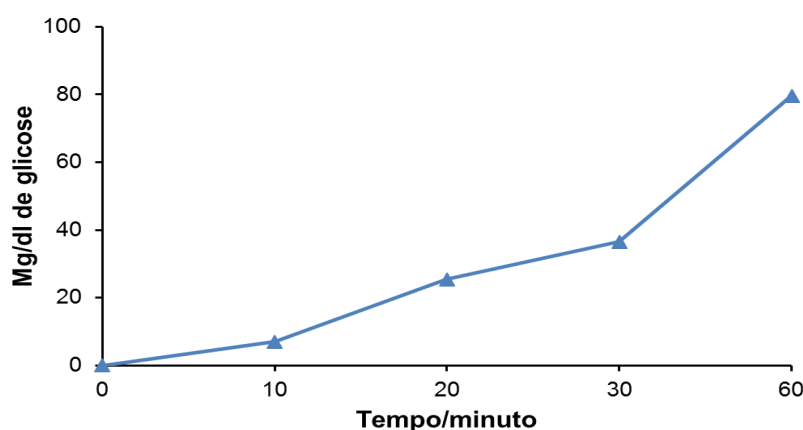
Apesar da instabilidade do derivado obtido na ausência do substrato, este se mostrou favorável para aplicação nos processos de sacarificação de materiais celulósicos, dados apresentados a seguir. O derivado elegido em questão, fornecerá para o processo de sacarificação uma quantidade mais elevada de atividade recuperada para todas as enzimas presentes no extrato. Uma vez que se faz necessário o complexo celulolítico e xilanolítico para a degradação completa da celulose para obtenção de mononossacarídeos, como a glicose e xilose.

4.4 Estudos de hidrólise de materiais celulósicos pelo coquetel enzimático e derivados enzimáticos obtidos através de extratos enzimáticos secretados por *A. niger* e *H. grisea*.

4.4.1 Hidrólise do substrato celobiose 1%

A celobiose é um dissacarídeo resultante da degradação parcial da celulose. É de conhecimento que a celobiose é um inibidor de celulases, assim, a celobiose resultante no processo de hidrólise de compostos lignocelulósicos deverá ser hidrolisada em glicose pela enzima celobiase (LYND et al., 2002). Fato este também confirmado por Wilkins et al. (2007) que a utilização de β -glicosidase promove a redução na inibição de endo e exoglicanase, aumentando glicose disponível. Em virtude da presença de enzima β -glicosidases detectada nos dois extratos, foi realizado ensaios enzimáticos utilizando o substrato celobiose pelo coquetel enzimático. A Figura 36 mostra o perfil de hidrólise da celobiose 1%, mostrando que a enzima β -glicosidase presente nos extratos também foi imobilizada e se manteve ativa.

Figura 36 – Hidrólise do substrato celobiose 1% pelo coquetel imobilizado em glutaraldeído-agarose.

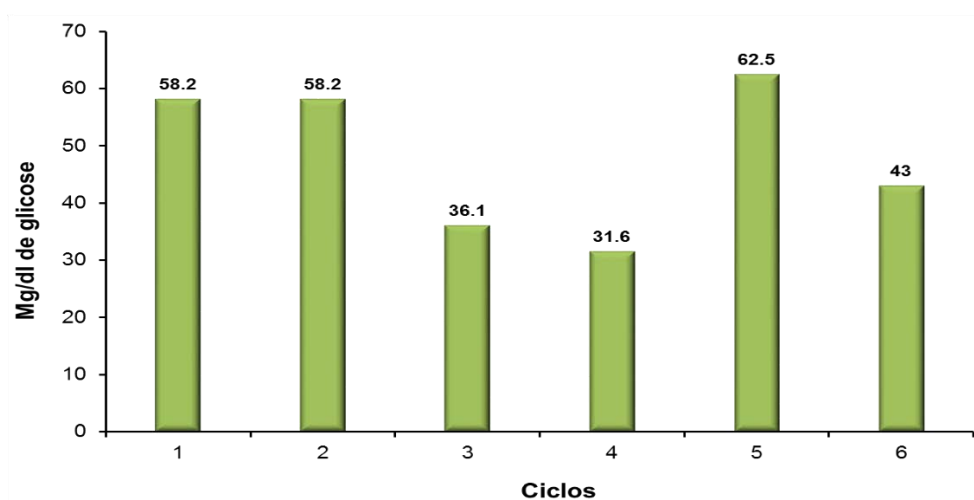


Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 50°C. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.4.2 Reuso do derivado na hidrólise da celobiose

Em estudos de reutilização do derivado, visando a hidrólise da celobiose a 1% em glicose, optou-se por realizar diversos ciclos de reação com duração de 30 minutos, quando ocorreu a liberação de aproximadamente 58,2 mg/dl de glicose por dois ciclos consecutivos. Após 6 ciclos, a taxa de hidrólise apresentou pequena diminuição (Figura 37).

Figura 37 – Ciclos consecutivos de hidrólise da celobiose 1% (m/v) pelo coquetel imobilizado em glutaraldeído-agarose.

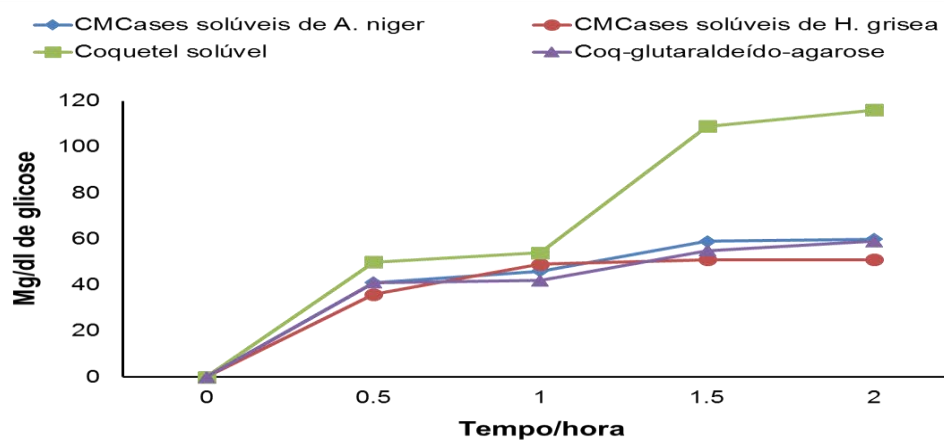


Cada ciclo de reação foi interrompido após 30 minutos de reação e realizada a quantificação de glicose. Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 50°C. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.4.3 Hidrólise do substrato carboximentilcelulose 1%

O coquetel de enzimas solúveis mostrou-se bastante promissor para a hidrólise do substrato carboximentilcelulose, revelando o sinergismo entre as CMCase secretadas pelo *A.niger* e *H.grisea*. Este coquetel de enzimas solúveis apresentou taxa de hidrólise 50% superior quando comparada as demais enzimas solúveis e derivado, que apresentaram comportamento cinético similar (Figura 38).

Figura 38 – Perfil de hidrólise do substrato carboximetilcelulose 1% (m/v) pelas enzimas celulases secretadas por *H. grisea* e *A. niger*.

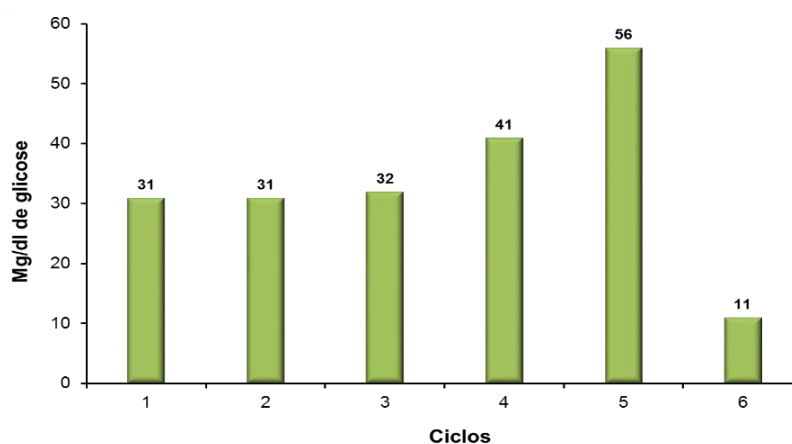


Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 50°C. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.4.4 Reuso do derivado na hidrólise da carboximetilcelulose

A Figura 39 mostra o perfil de reutilização do Coq-glutaraldeído-agarose para a hidrólise da carboximetilcelulose em glicose. O tempo de reação eleita para a hidrólise foi de 30 minutos por diversos ciclos de reação. O reuso do derivado foi eficiente por 5 ciclos consecutivos mantendo, ao final do ciclo, com liberação de 56 mg/dl de glicose.

Figura 39 – Ciclos consecutivos de hidrólise da carboximetilcelulose 1% (m/v) pelo coquetel imobilizado em glutaraldeído-agarose.



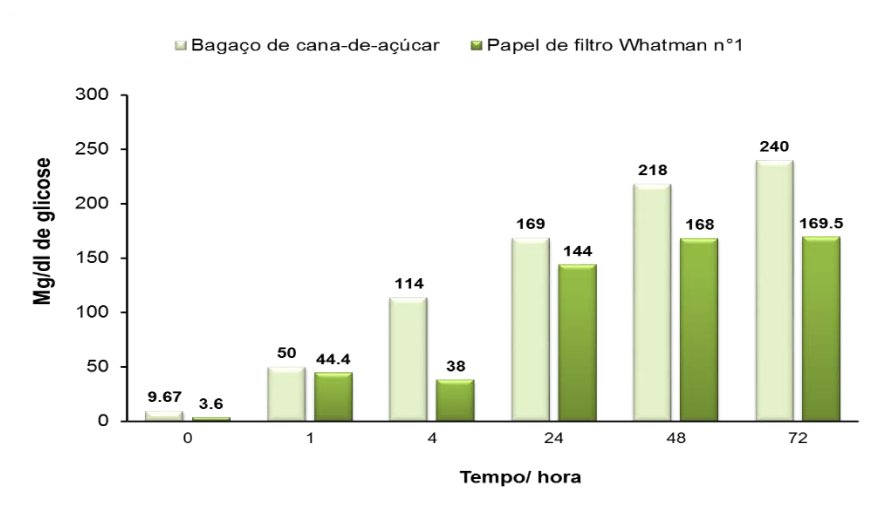
Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 50°C. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio nunca foi maior que 5% em relação à média.

4.4.5 Sacarificação de material celulósico

A utilização de celulases para a hidrólise enzimática da celulose é muito discutida na literatura para obtenção de açúcares, em especial, a glicose que serve como substrato para produção de etanol de segunda geração. Os estudos realizados neste trabalho foram realizados em condições brandas de temperatura, a 50°C, pH 5,0, sob agitação constante a 140 oscilações por minuto em mesa incubadora com circulação de ar.

Após o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, como descrito em material e métodos, foi possível utilizá-lo como substrato para a produção de monossacarídeos e dissacarídeos. A Figura 40 apresenta o processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar e papel de filtro Whatman n°1. Em relação à sacarificação do bagaço de cana explodido pelo coquetel enzimático solúvel, verificamos que foram obtidos ao final de 72 horas de sacarificação, 70% a mais de glicose em mg/dl quando comparado à hidrólise do papel de filtro.

Figura 40 – Processo de sacarificação de compostos celulósicos em diferentes tempos pelo coquetel enzimático solúvel.



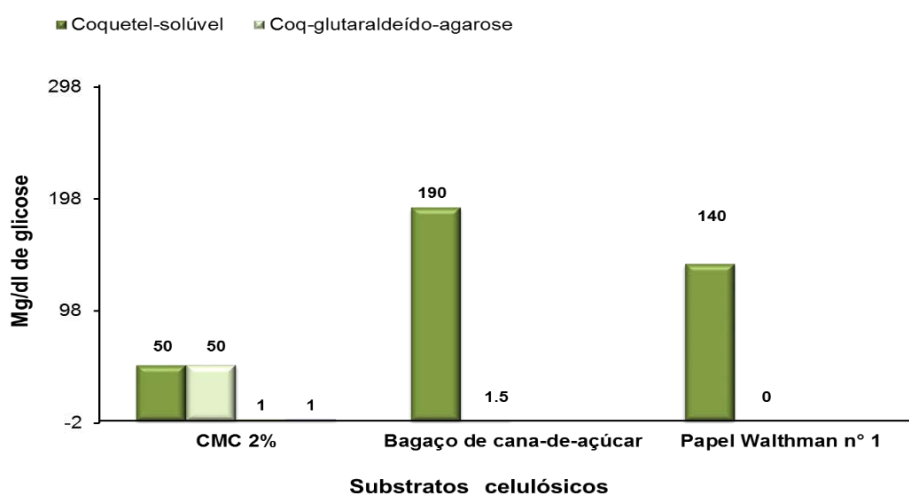
Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 50°C. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio nunca foi maior que 5% em relação à média.

SUN; CHENG (2002) apontam que a etapa do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é essencial quando se considera a hidrólise enzimática da biomassa tendo, como finalidade, alterar a sua estrutura nativa, facilitando a ação subsequente

dos biocatalisadores. De acordo com o pré-tratamento utilizado, pode ocorrer a remoção da hemicelulose ou da lignina em proporções variáveis; a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade. É notória que a quantidade excedente de glicose encontrada, se deve ao fato de uma maior disponibilidade de celulose para a hidrólise desse coquetel enzimático.

A Figura 41 mostra estudo comparativo entre os substratos celulósicos, utilizando o coquetel enzimático solúvel e seu respectivo derivado enzimático, submetidos à hidrólise por 20 horas. Podemos avaliar que ambos hidrolisaram igualmente a carboximetilcelulose a 2%. Para os demais substratos, o coquetel solúvel manteve seu perfil de hidrólise como mostrado anteriormente. Em contrapartida, o derivado não apresentou capacidade de hidrólise, sendo provável que as enzimas imobilizadas não tenham tido acesso ao substrato.

Figura 41 – Processo de sacarificação por 20 horas de compostos celulósicos pelo coquetel de enzimas solúveis e derivados.



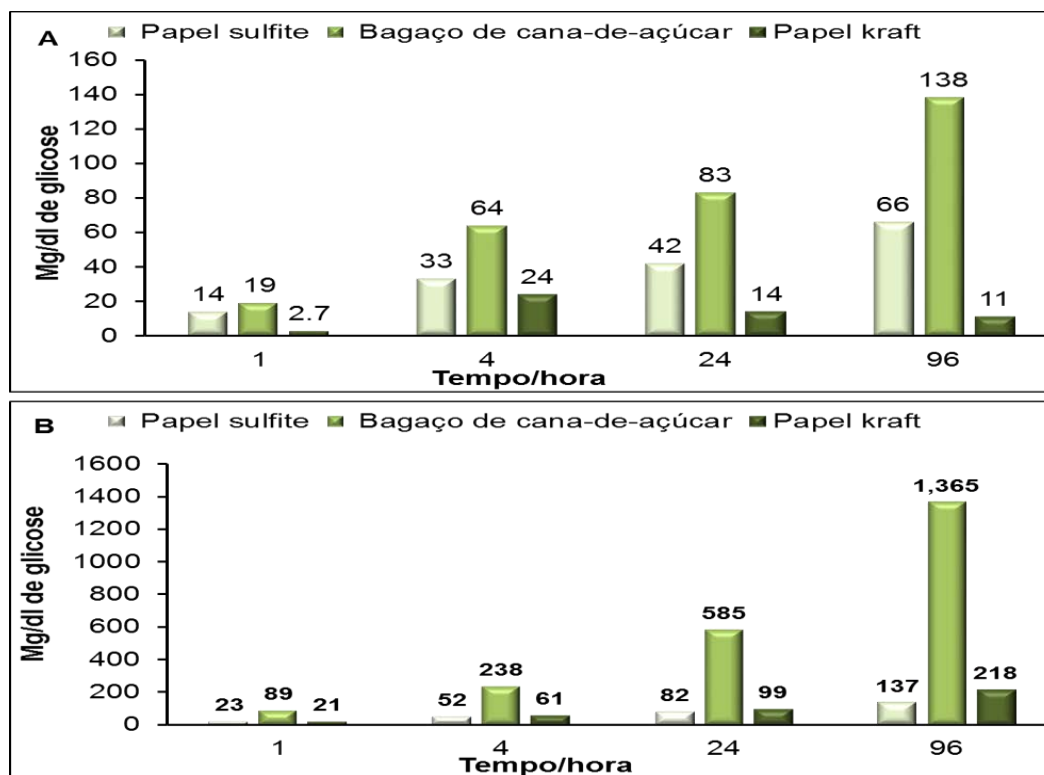
Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 50°C. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio nunca foi maior que 5% em relação à média.

Com o intuito de melhorar o acesso dessas enzimas imobilizadas ao substrato celulósico, realizou-se a tentativa do aumento da solubilidade desses compostos no meio reacional. Como estratégia de trabalho, polpas celulósicas a 1% foram elaboradas, não somente com bagaço de cana, mas também com diferentes fontes de substratos celulósicos, como o papel sulfite usado e papel kraft.

Após a trituração mecânica em meio aquoso composto de solução tamponante, as polpas celulósicas foram adicionadas ao derivado e coquetel solúvel nas mesmas condições descritas anteriormente. O derivado mostrou-se capaz de hidrolisar as polpas de papel sulfite, bagaço de cana e papel Kraft, demonstrando que o método proposto foi eficiente para a hidrólise desses compostos para obtenção de glicose (Figura 42 A).

Quantidades superiores foram obtidas para a polpa do bagaço de cana. A Figura 42 B mostra que a hidrólise dos substratos celulósicos não facilitou somente o acesso das enzimas imobilizadas aos substratos, mas também aumentou significativamente a taxa de glicose obtida pelo coquetel solúvel, em especial, para a polpa celulósica de bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 42 – Processo de sacarificação por diferentes tempos em distintas polpas de compostos celulósicos pelo derivado Coq-glutaraldeído-agarose e coquetel solúvel.



Os experimentos foram realizados em pH 5,0 e a 50°C. Os dados representam a média de dois experimentos independentes. O desvio nunca foi maior que 5% em relação à média.

A evidência da baixa taxa de glicose na polpa kraft se deve ao fato da presença de lignina residual, resultante do processo químico empregado para a produção de papel (BON et al., 2008). Este processo químico utilizado mundialmente na produção de polpa de celulose para a manufatura de papel é o denominado Kraft, que tem por função liberar as fibras de celulose através da deslignificação de cavacos de madeira (BON et al., 2008).

Embora a quantidade de glicose obtida com o coquetel solúvel tenha se mostrado mais eficiente do que o derivado, em termos de quantidades, não podemos descartar a importância da utilização de derivados enzimáticos em processos biotecnológicos pela sua capacidade de reutilização e recuperação após o processo de hidrólise enzimática, isto o torna promissor neste setor.

4.4.6 Cromatografia em camada delgada

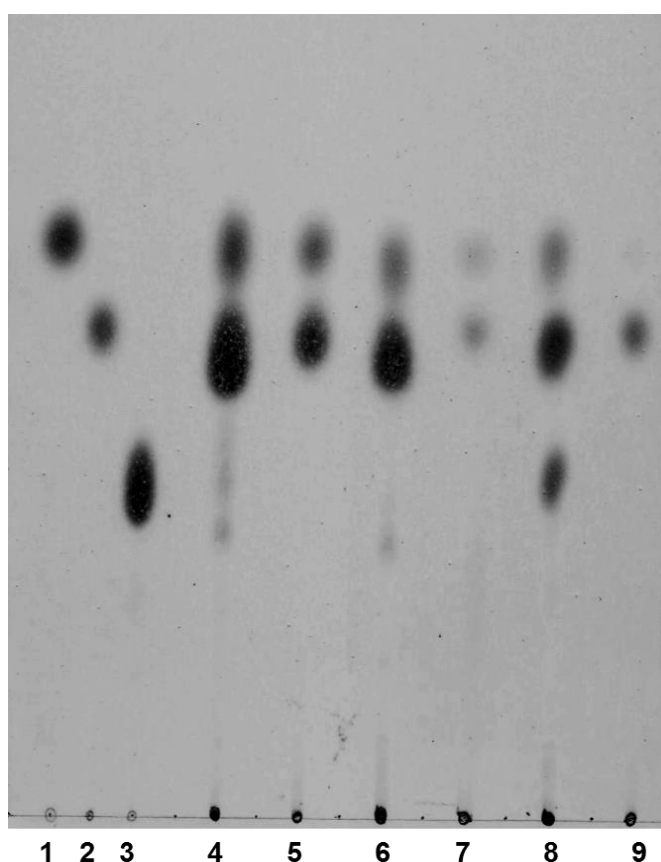
Comprovando a eficiência da aplicação do coquetel enzimático solúvel e imobilizado, foi realizada a análise dos hidrolisados através de cromatografia em camada delgada (TLC). Este método qualitativo nos revelou a composição dos hidrolisados obtidos neste trabalho com as polpas celulósicas. Ressalto que o coquetel enzimático apresenta enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico, como mostrado nas Tabelas 3, 9 e 12 anteriormente. As análises revelam alta preferência das enzimas solúveis a estas polpas, bem como o derivado, para a polpa de bagaço de cana-de-açúcar, dados estes confirmados anteriormente pela dosagem de glicose.

Os resultados apresentados na Figura 43 revelam a presença de xilose e glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar e do papel kraft para ambos, coquetel solúvel e Coq-glutaraldeído agarose. Entretanto, quando foi utilizado polpa de papel sulfite, revelou a presença de xilose, glicose e celobiose, para o coquetel solúvel e apenas glicose para o derivado.

Notavelmente a enzima do complexo xilanolítico e a β -glicosidase se fizeram presente neste coquetel, tanto para o solúvel quanto para o derivado. No entanto, na hidrólise da polpa do papel sulfite com o coquetel de enzimas solúvel, o tempo de reação utilizado não foi suficiente para a hidrólise total da celobiose.

Com a aplicação do coquetel enzimático solúvel e o derivado enzimático as obtenções de açúcares simples foram favoráveis. Estudos indicam que novas gerações de coquetéis enzimáticos tendem a ser formulados com a adição das enzimas essenciais em concentrações adequadas para um determinado material pré-tratado (BANERJEE et al., 2010). Estes resultados mostraram-se promissores na utilização de polpa celulósica para produção de açúcares, como a glicose.

Figura 43 – Cromatografia em camada delgada TLC representando produto de hidrólise de 96 horas da polpa de compostos celulósicos por enzimas solúveis e derivados do coquetel de *A. niger* e *H. grisea*.



Legenda: 1- Padrão xilose; 2- Padrão glicose; 3- Padrão celobiose; 4- Hidrolisado pó de bagaço de cana pelo coquetel de enzimas solúveis; 5- Hidrolisado pó de bagaço de cana pelo Coq-glutaraldeído-agarose; 6 - Hidrolisado do papel kraft pelo coquetel de enzimas solúveis; 7- Hidrolisado do papel kraft pelo Coq-glutaraldeído-agarose; 8 – Hidrolisado do papel sulfite pelo coquetel de enzimas solúveis; 9 - Hidrolisado do papel sulfite pelo Coq-glutaraldeído-agarose.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

A biodegradabilidade de biomassa lignocelulósica é limitada por alguns fatores, como cristalinidade da celulose; área de superfície disponível e quantidade de lignina. Pré-tratamentos tem efeitos em um ou mais destes aspectos. Neste trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a descompressão rápida após autoclavagem por 16 minutos à 120 °C. Após o resfriamento, 1 g deste material; 1 g de papel kraft e 1 g de papel sulfite foram triturados em liquidificador com 10 mL de solução tamponante acetato de sódio 50mm L⁻¹, para obtenção de pasta celulósica, facilitando a acessibilidade do coquetel solúvel e seu derivado para o processo de sacarificação. O fungo *H. grisea* var. *thermoidea* usado neste trabalho, para a produção de celulasas, é bastante conhecido e citado em diversos artigos científicos.

O fungo *Aspergillus niger* isolado no laboratório de enzimologia, também foi usado para a produção destas mesmas enzimas. Os resultados mostraram que extratos enzimáticos crus foram capazes de hidrolisar as polpas descritas anteriormente, e também, a carboximetilcelulose e celobiose. A caracterização bioquímica dos dois extratos crus, mostraram pequenas diferenças entre algumas características das enzimas produzidas, tais como: pH e temperatura ótima; estabilidade ao pH e temperatura. Estes resultados sugerem que os diferentes fungos produzem complexo celulolítico e xilanolítico distintos entre si.

Os extratos crus constituídos das enzimas de interesse foram concentrados para facilitar as tentativas de imobilização. O processo de imobilização inicialmente foi conduzido com o extrato cru de *A. niger*, tendo sido feitas várias imobilizações no laboratório de enzimologia da Unesp de Araraquara e durante estágio sanduiche no instituto de Catalis y Petroleoquímica- Madrid. O extrato cru celulolítico de *A. niger* foi enviado para o laboratório espanhol, onde foi realizado vários experimentos de imobilização, utilizando diferentes ativações química, seguindo protocolos atualizados conforme, consta no Apêndice A. Os resultados obtidos mostraram que as enzimas celulolíticas apresentaram-se sensíveis a alterações para pH extremos; variações de força iônica e interações químicas. Verificamos que o complexo celulolítico foi desestabilizado por completo em processos de imobilização com força iônica de 100 mml. L⁻¹ e pH acima de 8,0. Foi verificado também que a redução de grupos

remanescente com boroidreto de sódio diminuía drasticamente a atividade enzimática. Por estes motivos, os resultados obtidos não foram bem sucedidos, entretanto, mostraram os principais inconvenientes no processo de imobilização de celulasas, conforme descrito no Apêndice A, chamando a atenção para futuros trabalhos científicos nesta área.

Este trabalho teve continuidade no laboratório de enzimologia onde foi possível a obtenção de um coquetel enzimático constituído dos extratos crus dos dois fungos utilizados, o qual apresentou capacidade hidrolítica da celulose com liberação de xilose, glicose e celobiose. A partir da obtenção do coquetel enzimático solúvel foi realizado vários experimentos de imobilização e como resultados, foi possível a obtenção de derivados ativos e estabilizados. Os melhores derivados obtidos foram a imobilização do coquetel enzimático por entrecruzamento com glutaraldeído 0,5% e com importante reutilização do mesmo. Com este derivado foi possível liberar açúcares simples a partir do bagaço de cana, polpa kraft e sulfite, conforme demonstrados nos resultados apresentados na Figura 43. O derivado obtido neste trabalho foi muito interessante, pois há pouquíssimos trabalhos que imobilizaram enzimas celulolíticas. No geral, o trabalho trouxe avanços nesta área e poderá futuramente dar continuidade a estes estudos, procurando otimização deste derivado com possibilidades de utilização em reatores enzimáticos.

REFERÊNCIAS

Referências

- ABARCA, M. et al. Ochratoxin a production by strains of *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2655, 1994.
- ABD EL-GAFFAR, M. A. A.; HASHEM, M. S. Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 507-516, 2010.
- ARAGON, C. A. **Imobilização multipontual covalente de xilanases**: seleção de derivados ativos e estabilizados. 2013. 120 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BANERJEE, G.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**, v. 3, p. 82-92, 2010.
- BANSAL, N. et al. Highly Thermostable and pH-stable cellulases from *Aspergillus niger* NS-2: properties and application for cellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 141-156, 2014.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JUNIOR, N. Aplicações industriais de biocatalisadores. In: _____. **Enzimas em biotecnologia**: Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1999. p.17
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protei-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENA, B. M.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of enzymes: literatura survey. In: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed. New Jersey: Humana Press, 2006. cap. 2, p. 15-30.
- CABRAL, J. M. S.; KENNEDY, J. F. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: TAYLOR, R. F. (Ed.). **Protein immobilization**: fundamentals and applications. New York: Marcel Dekker, 1991. cap.3, p. 73-138.
- CASTILLO, T. M. Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. **Avance y Perspectiva**, v. 21, p. 267-271, 2002.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*saccharum* spp.)**. 2006. 212 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. **Thermophilic fungi**: an account of their biology, activities and classification. San Francisco: W. H. Freeman, 1964.

CHANDRA, M. et al. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 805-811, 2010.

CHIM-ANAGE, P. et al. Properties os cellulase immobilized agarose gel with spacer. **Biotechnology and Bioenginerring**, v. 28, p.1876-1878, 1986.

DE VRIES, R. P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 10-20, 2003.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for enzyme satbilization by intramolecular crosslink with bifuncional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 517-523, 1995.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 9, p. 2610-2615, 2006.

FONTANA, I. D. et al. α - 4-O-Methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 560-571, 1988.

GALLEGO, F. L. **Dessarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semisintéticas a partir de cefalosporina c**. 2006. 156 f Tesis (Doctor in Ciencias) - Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Universidad Autónoma de Madrid, 2006.

GOKHALE, A. A.; JU, J.; LEE, I. Immobilization of cellulose on magnetoresponsive graphene nano-supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 76-86, 2013.

GUISÁN, J. M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge? In: GUISÁN, J. M. (Ed.). **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 2006. cap 1, p. 1-13.

GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

HURST, P. L. et al. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, v. 165, p. 33-41, 1977.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

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

KARI, A. et al. Characterization of production and enzyme properties of an endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* CK-2 isolated from compost soil. **Antonie van Leeuwenhoek Journal**, v. 66, p. 319-326, 1994.

KHADEMI, S. et al. Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. **Acta Crystallographica**, v. 58, p. 660-667, 2002.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspective. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEISOLA, M. et al. Industrial use of enzymes. In: HÄNNINEN, O. O. P.; ATALAY, M. (Ed.). **Encyclopedia of life support systems (EOLSS)**. Oxford: EOLSS, 2002. v. 2, cap. 10, p. 1-25.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAHESHWARI, R. et al. Enzymes thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MATEO, C. et al. Some special features of glyoxil supports to immobilize proteins. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 37, n. 4, p. 456-462, 2005.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 39, p. 274-280, 2006.

MATEO, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-satbilization. **Biochemistry Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1593-1601, 2007.

MAWADZA, C. et al. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus strains*. **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 177-187, 2000.

MERRIL C. R.; GOLDMAN D.; VAN KEUREN, M. L. Gel protein stains: silver stain. **Methods in Enzymology**, v. 104, p. 441-447, 1984.

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

MONTI, R. **Produção de celulase e xilanase pelo fungo termófilo *Humicola grisea* variedade *thermoidea* RP-17**: fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas. 1989. 169 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1989.

MORANA, A. et al. A novel thermoacidophilic cellulase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, p. 1017-1021, 2008.

NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHMIYA, K. et al. Structure of cellulases and their applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 14, p. 365-414, 1997.

OLIVEIRA, G. S.; ULHOA, C. J.; SILVEIRA, M. H. L. An alkaline thermostable recombinant *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates. **World Journal of microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 19-26, 2013.

PALVEJAC, M. et al. Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on silica gels at low and high pressures. **Journal Supercritical Fluids**, v. 43, p. 74-80, 2007.

QUIRINO, B. F. et al. Colocando a biodiversidade microbiana brasileira a serviço da indústria de biocombustíveis. In: SIMPÓSIO MICRORGANISMOS EM AGROENERGIAS, 2012, Brasília, DF. **Anais...** [Brasília, DF]: Embrapa Agroenergia, 2012.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2005.

SANTOS, A. F. dos. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SIGMA-ALDRICH. **Agarose**: bioreagent for molecular biology. 2014. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9539?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 28 maio 2014.

SILVA, J. C. R. da. **Estudos da degradação de materiais celulósicos por enzimas de *Scytalidium thermophilum* e do mutante *Trichoderma reesei* RP698**. 2013. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SILVA, J. C.; GOUVEIA, E. R. Algumas propriedades de endoglucanases produzidas por *Streptomyces* spp. em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, n. 2, p. 60-70, 2008.

SINEGANI, A. A. S.; EMTIAZI, G.; SHARIATIMADARI, H. Sorption and immobilization of cellulase on silicate clay mineral. **Journal Colloid and Interface Science**, v. 290, p. 39-44, 2005.

SINGHANIA, R. R. Production of cellulolytic enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: PANDEY, A. et al. (Ed.). **Biofuels**: alternative feedstocks and conversion processes. Amsterdam: Elsevier, 2011. cap. 8, p. 177- 201.

SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SOCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresour Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Microbial cellulases-production, applications and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 11, p. 832-844, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TAKASHIMA, S. et al. Purification and characterization os cellulases from *Humicola grisea*. **Bioscience Biotechnhnology Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 77-82, 1996.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG. Departament of Bioinformatics & Biochemistry. **Brenda**: the comprehensive enzyme information system. Release 2014.1. 2014. Disponível em: < <http://www.brenda-enzymes.org> >. Acesso em: 01 jun. 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbiology and Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WAGHMARE, P. R. et al. Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 136-141, 2014.

WANG, S. et al. Immobilization of celullase on: polyamidoamine dendrimer-grafted silica. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p.35-40, 2013.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1614-1619, 2007.

WU, L.; YUAN, X.; SHENG, J. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranesby electrospinning. **Journal Membrane Science**, v. 250, p. 167-173, 2004.

YAKOUT, S. M. Review on the bioremediation by *Aspergillus niger*: **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 109-116, 2014.

YU, Y. et al. Immobilization os cellulase using acrylamide graffed acrylonitrile copolymer menbranes. **Journal Membrane Science**, v. 155, p. 101-106, 1998.

YUTAKA, K. et al. Properties os celullase immobilized on agarose gel with spacer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p.1876-1878, 1986.

ZHANG, P. I. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineerering**, v. 88, n. 7, p. 777-824, 2004.

ZHANG, Y. et al. Artificial neural network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer Eudragit L-100. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3153-3158, 2010.

APÊNDICE A – Imobilização de CMCases em suporte agarose com diferentes ativações químicas: principais inconvenientes.

Suporte	pH do ensaio	Força iônica	*Grupos reativos	Condições de imobilização	Inconvenientes	Rendimento de imobilização	Tipo de união ao suporte
Agarose ativada com grupos aminos primários-MANAE	7	5 mmol/L ⁻¹	Aminos primários alifáticos	Extrato enzimático	Ausência do substrato (CMC 1%)	Desfavorável	Iônica
Agarose ativada com grupos aminos primários-MANAE	7	5 mmol/L ⁻¹	Aminos primários alifáticos	Extrato enzimático c/ CMC 1%	ND	Favorável	Iônica
Agarose ativada com glutaraldeído	7	5 mmol/L ⁻¹	Aldeídos cíclicos	Extrato enzimático c/ CMC 1%	ND	Favorável	Covalente
Agarose ativada com glutaraldeído	7	5 mmol/L ⁻¹	Aldeídos cíclicos	Extrato enzimático	Ausência do substrato (CMC 1%)	Desfavorável	Covalente
Agarose ativada com grupos aminos primários/entrecruzamento c/glutaraldeído 0,5%	7	5 mmol/L ⁻¹	Aminos primários alifáticos	Extrato enzimático	Ausência do substrato (CMC 1%)	Pouco favorável	1) Iônica 2) Covalente
Agarose ativada com grupos aminos primários/entrecruzamento c/ glutaraldeído 0,5%	7	5 mmol/L ⁻¹	Aminos primários alifáticos	Extrato enzimático c/ CMC1%	ND	Favorável	1) Iônica 2) Covalente
Agarose Ativada Com Glioxil	10	100 mmol/L ⁻¹	Aldeídos alifáticos	Extrato Enzimático Sem Aditivo	pH; distorção do sítio catalítico; força iônica.	Desfavorável	Covalente
Agarose ativada com glutaraldeído	7	5 mmol/L ⁻¹	Aldeídos cíclicos	Extrato enzimático	Ausência do substrato (CMC 1%)	Desfavorável	Covalente
Agarose ativada com grupos aminos primários/entrecruzamento c/glutaraldeído 0,5%	7	5 mmol/L ⁻¹	Aminos primários alifáticos	Extrato enzimático	Ausência do substrato (CMC 1%)	Pouco favorável	1) Iônica 2) Covalente

Continuação 1

Suporte	pH do ensaio	Força iônica	Grupos reativos	Condições de imobilização	Inconvenientes	Rendimento de imobilização	Tipo de união ao suporte
Agarose ativada com grupos aminos primários/entre-cruzamento c/ glutaraldeído 0,5%	7	5 mmol/L ⁻¹	Aminos primários alifáticos	Extrato enzimático c/ CMC1%	ND	Favorável	1) Iônica 2) Covalente
Agarose Ativada com Glioxil	10	100 mmol/L ⁻¹	Aldeídos alifáticos	Extrato Enzimático Sem Aditivo	pH; distorção do sítio catalítico; força iônica.	Desfavorável	Covalente
Agarose Ativada com Glioxil	10	100 mmol/L ⁻¹	Aldeídos alifáticos	Extrato Enzimático e Glicerol 30%	Distorção do sítio catalítico força iônica e NaBH ₄	Desfavorável	Covalente
Agarose Ativada com Glioxil	10	100 mmol/L ⁻¹	Aldeídos alifáticos	Extrato Enzimático e Trealose 10%	Distorção do sítio catalítico; força iônica e NaBH ₄	Desfavorável	Covalente

Fonte: GALLEGO (2006); ARAGON (2013); FERNANDEZ-LAFUENTE (1995); MATEO (2006). *Grupos reativos do suporte que irão reacionar com os grupos reativos de superfície da enzima. ND- não detectado.

FICHA CATALOGRÁFICA

S237p	Santos, Andréa Francisco dos Produção e imobilização de celulasas em matriz de agarose com diferentes ativações químicas / Andréa Francisco dos Santos. – Araraquara: [s.n], 2014 112 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Rubens Monti 1. Biotecnologia. 2. <i>Aspergillus niger</i>. 3.Celulase. 4.Enzimas imobilizadas. 5.Fungos filamentosos. I. Título.
-------	--