**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

VANESSA ELISA PINHEIRO

**Produção de coquetéis enzimáticos com potencial no
biobranqueamento da polpa de celulose para a fabricação de
papel a partir de resíduos lignocelulósicos e fibras secundárias**

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2017**

VANESSA ELISA PINHEIRO

**Produção de coquetéis enzimáticos com potencial no
biobranqueamento da polpa de celulose para a fabricação de
papel a partir de resíduos lignocelulósicos e fibras secundárias**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências –
Área de Concentração: Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pinheiro, Vanessa Elisa

Produção de coquetéis enzimáticos com potencial no biobranqueamento da polpa de celulose para a fabricação de papel a partir de resíduos lignocelulósicos e fibras secundárias. Ribeirão Preto, 2017.

158 p : il.; 30 CM

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. Enzimas. 2. Micro-organismos. 3. Resíduos Lignocelulósicos. 4. Polpa de Celulose. 5. Biobranqueamento.

PINHEIRO, V. E. Produção de coquetéis enzimáticos com potencial no biobranqueamento da polpa de celulose para a fabricação de papel a partir de resíduos lignocelulósicos e fibras secundárias. 2017. 158 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

É muito bom dizer obrigada àqueles, que nesta jornada, acometida de tantos surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incertezas, cansaço e alegrias, conseguiu se manter presente. Por isso, agradeço....

A professora Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli pela orientação, paciência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

A todos os professores do departamento de Bioquímica da FMRP que auxiliaram em minha formação; e a Ivone da secretaria pela disponibilidade e paciência em responder todas as minhas dúvidas com competência e dedicação;

A todos os meus amigos e técnicos de laboratório pela, ajuda, discussões e compartilhamento de seus conhecimentos durante o desenvolvimento das atividades realizadas, além da companhia diária, dos momentos de descontração e risadas.

A minha mãe Ivani e a meu pai Valdecir, pelo apoio, amor, compreensão, conselhos e mais do que tudo, por estarem ao meu lado, fazendo-se presentes em cada etapa de minha formação e contribuindo assim para meu enriquecimento intelectual e moral. A vocês devo absolutamente tudo.

A minha amada irmã Lívia, pelo carinho e amor, por sempre torcer a meu favor e também por estar presente a cada conquista;

A meu querido Maxwell, pela paciência, carinho e dedicação, pelo amparo a qualquer momento e também por sempre acreditar em minha capacidade;

A FAPESP pela concessão de bolsa de Mestrado (Processo nº 2015/23200-0) e CNPq pelo suporte financeiro;

A Fibria (Aracruz-ES), pela concessão das polpas de celulose, as quais foram de fundamental importância para a realização dos testes de aplicação;

Ao Jorge H. A. Betini pela disponibilidade, apoio e ensinamentos quanto aos experimentos de biobranqueamento da polpa de celulose;

A FFCLRP pela estrutura necessária para realização deste trabalho.

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê*
Arthur Schopenhauer

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas.....	vi
Lista de abreviações e símbolos	viii
I. Introdução	1
I.1. Mercado de enzimas	2
I.2. Resíduos industriais	3
I.3. Composição da biomassa vegetal	5
I.4. Enzimas que atuam na degradação da biomassa vegetal	9
I.5. Fungos como produtores de enzimas e regulação de xilanases e ligninases	14
I.6. Aplicações biotecnológicas de enzimas	17
I.6.1. Aplicação biotecnológica na indústria de papel e celulose	17
I.6.1.1. Tradicional processo de fabricação da polpa de celulose	18
I.6.1.2. Biobranqueamento da polpa de celulose	21
I.7. Considerações sobre a produção industrial de enzimas e biorreatores	21
II. Objetivos	23
III. Material e Métodos	25
III.1. Micro-organismos utilizados	26
III.2. Manutenção dos fungos em laboratório	26
III.3. Pré-seleção de micro-organismos produtores de xilanase, amilase, CMCase, avicelase, FPase e β -glucosidase em fermentação submersa	26
III.4. Otimização da produção enzimática	27
III.4.1. Screening da fonte de carbono	27
III.4.2. Seleção do melhor meio de cultivo e tempo de produção	27
III.4.3. Otimização da concentração da fonte de carbono e temperatura por planejamento experimental e análise de superfície de resposta	28
III.5. Produção de lacase	28

III.6. Dosagens enzimáticas	29
III.7. Determinação de Proteínas	32
III.8. Caracterização bioquímica da xilanase, celulasas, amilase e lacase	32
III.8.1. Efeito da temperatura	32
III.8.2. Efeito do pH	32
III.8.3. Influência de compostos iônicos e EDTA na atividade enzimática	33
III.9. Caracterização dos extratos enzimáticos em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	33
III.10. Tratamento enzimático da polpa celulósica	33
III.10.1. Polpa marrom	33
III.10.2. Determinação da consistência da polpa celulósica	34
III.10.3. Seleção dos extratos enzimáticos	34
III.10.4. Efeito de diferentes proporções entre os extratos TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom	35
III.10.5. Tempo de tratamento	36
III.10.6. Efeito da temperatura e pH sobre a redução do número Kappa	36
III.10.7. Controle para análise dos experimentos de aplicação enzimática	37
III.11. Determinação do número Kappa em pasta química de madeira	37
III.12. Determinação da alvura da polpa celulósica	38
III.13. Determinação da viscosidade da polpa celulósica	39
III.13.1. Preparação da amostra para teste de viscosidade relativa	39
III.14. Estudo de Microscopia eletrônica de varredura	40
III.15. Aplicação do coquetel enzimático no bagaço de cana de açúcar e bagaço de cevada e no papel reciclado (de escritório)	41
III.16. Fermentação em Biorreator para produção de lacase por <u>Trametes versicolor</u>	41
III.17. Análise dos experimentos e repetibilidade dos ensaios	43
IV. Resultados	44
IV.1. Seleção dos micro-organismos produtores	45
IV.2. Seleção da fonte de carbono	47
IV.3. Seleção do meio de cultivo	48
IV.4. Seleção da melhor condição de cultivo: estacionário ou agitado	50
IV.5. Produção enzimática em função do tempo de cultivo	51

IV.6. Otimização da concentração da fonte de carbono e temperatura por planejamento experimental e análise de superfície de resposta	53
IV.7. Produção de Lacase	59
IV.8. Resumo das condições de cultivo para produção de cada enzima em estudo	61
IV.9. Caracterização enzimática	62
IV.9.1. Efeito da temperatura nas atividades enzimáticas	62
IV.9.2. Estabilidade térmica	64
IV.9.3. pH ótimo	68
IV.9.4. Estabilidade ao pH	70
IV.9.5. Efeito de íons	72
IV.10. Dosagem de enzimas do complexo lignocelulolítico	76
IV.11. Dados da produção e caracterização da xilanase bruta produzida por <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita	78
IV.12. Aplicação dos extratos enzimáticos nas polpas de celulose	79
IV.12.1. Extratos individualmente	79
IV.12.2. Efeito de diferentes proporções entre os extratos TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom	80
IV.12.3. Tempo de tratamento	83
IV.12.4. Otimização do pH e temperatura do tratamento por planejamento experimental e análise de superfície de resposta	84
IV.13. Caracterização dos extratos por géis SDS-PAGE	86
IV.14. Resumo das características do coquetel desenvolvido	87
IV.15. Análise das polpas de celulose em microscopia eletrônica de varredura	88
IV.16. Aplicação do coquetel no bagaço de cevada e bagaço de cana e papel reciclado	89
IV.17. Produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> em Biorreator	91
V. Discussão	96
VI. Considerações finais	110
VII. Referências Bibliográficas	112
ANEXOS	132

Resumo

PINHEIRO, Vanessa Elisa. **Produção de coquetéis enzimáticos com potencial no biobranqueamento da polpa de celulose para a fabricação de papel a partir de resíduos lignocelulósicos e fibras secundárias**. 2017. 158 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Este trabalho teve como objetivo a prospecção e caracterização de enzimas fúngicas, que degradam a biomassa, visando à aplicação no biobranqueamento da polpa de celulose. Para isto, foram selecionados 13 fungos filamentosos da Micoteca e entre estes *Aspergillus versicolor* e *A. brasiliensis* foram aqueles que se sobressaíram quanto à produção de xilanase, amilase, CMCase, avicelase e β -glucosidase. As melhores condições de produção enzimática corresponderam à utilização de bagaço de cevada como fonte de carbono em meio SR (Segato Rizzatti) para xilanase, amilase e β -glucosidase e meio M5 para CMCase, avicelase e FPase, nos cultivos incubados por tempos variáveis de 72 a 168 horas. Para otimizar a concentração da fonte de carbono e a temperatura nos cultivos foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional. Como resultante da otimização do bioprocessamento foram obtidos os extratos brutos: (i) meio BSR, para a produção de xilanase por *A. brasiliensis*, com 96 horas de cultivo estático, a 30°C, com bagaço de cevada 3% em meio SR; (ii) Meio VSR para amilase e β -glucosidase a partir do *A. versicolor*, com 120 horas de cultivo estático, a 35°C, com bagaço de cevada 3,41% em meio SR; (iii) Meio VM5 para CMCase, avicelase e FPase de *A. versicolor* com 120 horas de cultivo estático, a 30°C, com bagaço de cevada 2% em meio M5. Lacase foi produzida por *Trametes versicolor* (iv), cultivado por quinze dias em Fermentação Submersa estática, a 30°C, em meio contendo vinhaça e água destilada (1:5 v/v), 1% de algodão e 0,1% de peptona. Paralelamente, a produção de xilanases de *A. tamarii* Kita (v) com bagaço de cevada 2,9% foi otimizada em meio ADAMS por 129 horas (recebendo a denominação - meio TKADAMS). Quanto à caracterização das enzimas de *A. versicolor* (xilanase) e *A. brasiliensis* (demais enzimas) a temperatura ótima de xilanase foi 70°C; amilase 60-65°C; CMCase 65°C; avicelase 50°C; FPase e lacase 60°C e β -glucosidase 70-75°C. Quanto à estabilidade térmica, xilanase mostrou-se com 60% de atividade relativa por até 24 horas à 40°C e 30 minutos à 50°C. A 60°C mostrou-se pouco estável. A amilase mostrou-se estável por 24 horas a 40 e 50°C, com 80% da atividade relativa. CMCase e FPase mostraram-se pouco estável nas temperaturas citadas. Avicelase apresentou ativação quando exposta ao aquecimento de 40, 50 e 60°C. β -glucosidase foi estável a 40°C por até 24 horas, com atividade relativa de 80%; a 50°C apresentou 60% de atividade relativa por 180 minutos e a 60°C exibiu 40% por até 30 minutos. Lacase foi estável a 50°C, com um t_{50} de 60 minutos; a 60°C teve atividade relativa próxima de 30%, por até 240 minutos e a 70°C apresentou 40% de atividade por 30 minutos. Quanto ao pH, xilanase apresentou uma faixa ótima de 4,0-5,0 e também entre 7,0-8,0. Amilase, CMCase, avicelase, FPase, β -glucosidase e lacase apresentaram atividades mais expressivas na faixa de pH 4,0-5,5. Com relação à estabilidade ao pH em 24 horas, xilanase foi mais estável nos pH 5,5-7,0, amilase nos pH 5,0-6,5, CMCase, FPase e lacase em pH 4,5, avicelase em pH 3,0 e β -glucosidase em pH 5,0-5,5. Quanto ao efeito de íons, CMCase e β -glucosidase foram ativadas por K^+ , Zn^{2+} e Ba^{2+} ; CMCase, β -glucosidase e lacase foram ativadas por NH_4^+ e Ca^{2+} ; amilase, CMCase, β -glucosidase e lacase foram ativadas por Co^{2+} ; amilase, CMCase e β -glucosidase foram ativadas por Al^{3+} e Fe^{2+} ; xilanase, avicelase, CMCase e β -glucosidase foram ativadas por Mn^{2+} ; avicelase e CMCase foram ativadas por Ag^+ ; lacase por EDTA; β -glucosidase e lacase por Mg^{2+} , CMCase por Hg^{2+} e xilanase, β -glucosidase e lacase por Cu^{2+} . Os extratos foram utilizados na formulação de coquetéis enzimáticos para biobranqueamento da polpa de celulose. A aplicação dos extratos BSR, VSR, VM5 sobre a polpa marrom não resultou em uma redução significativa do número Kappa quando comparados ao controle, uma vez que todos os extratos apresentavam uma coloração muito escura, a qual fora originada por componentes e pigmentos provenientes dos meios de cultivo dos micro-organismos com bagaço de cevada e que, consequentemente, interferiram na determinação do número Kappa. Desta forma, o coquetel otimizado teve como formulação: 20,3 mL do meio TKADAMS e 10 mL do extrato do meio produtor de lacase para cada 4 gramas de polpa tratada, pH 5,5; 35,9°C, 48 horas. Este tratamento resultou na redução de 1,83 pontos no número Kappa da polpa marrom, representando uma eficiência de 20,3%, e aumento de 4,65 na alvura, em relação ao controle. A aplicação do coquetel nos resíduos lignocelulósicos ocasionou a formação máxima de 85 mg/mL de açúcares redutores, em 24 horas no tratamento do bagaço de cevada, e 25 mg/mL de açúcares redutores, em 3 horas no tratamento do bagaço de cana. A aplicação do coquetel nas polpas de papel reciclado ocasionou um maior destintamento. A aplicação do coquetel desenvolvido na polpa de celulose, nos resíduos lignocelulósicos e fibras secundárias mostrou-se promissora para biobranqueamento, biodegradação e destintamento destes, respectivamente. A aplicação de enzimas no processo de biobranqueamento da polpa de celulose é uma alternativa viável e que auxilia a redução de custos, água, energia e colabora com o meio ambiente. A lacase foi importante no biobranqueamento da polpa de celulose sendo que o aumento da escala de produção do *T. versicolor* para biorreator levou a uma produção 6,25 vezes maior comparada aquela em Erlenmeyer, provavelmente devido a aeração constante.

Palavras – chave: Enzimas, Micro-organismos, Resíduos Lignocelulósicos, Polpa de Celulose, Biobranqueamento

Abstract

PINHEIRO, Vanessa Elisa. **Production of enzymatic cocktails with potential into cellulose pulp biobleaching for paper production through lignocellulosic wastes and secondary fibres.** 2017. 158 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

This work aimed to prospect and characterize fungal enzymes, which break biomass, looking for the cellulose pulp biobleaching application. For this, 13 filamentous fungi of the Fungi Library were selected and among them *Aspergillus versicolor* and *A. brasiliensis* were those that stood out as inducers of xylanase, amylase, CMCase, avicelase and β -glucosidase production. The use of barley bagasse as carbon source was the best condition for xylanase, amylase and β -glucosidase production in SR medium (Segato Rizzatti) and M5 medium was the best for CMCase, avicelase and FPase production, in cultures incubated for 72-168 h. In order to optimize the concentration of the carbon source and the temperature of the cultures, a Central Composite Rotational Design was elaborated. (i) BSR extract, in SR medium for the xylanase production by *A. brasiliensis*, 96 hours, in static culture, at 30°C with barley bagasse 3%; (ii) VSR extract, in SR medium, for the amylase and β -glucosidase from *A. versicolor*, 120 hours in static culture, at 35°C, with barley bagasse 3.41%. (iii) VM5 extract, in M5 medium for CMCase, avicelase and FPase from *A. versicolor*, 120 hours of static culture, at 30°C with barley bagasse 2%. Lacase was produced by *Trametes versicolor* (iv), in a medium containing vinasse and distilled water (1:5 v/v), cotton 1% and peptone 0.1%, for 15 days at 30°C. In parallel, the production of a xylanase from *A. tamarii* Kita (v) with barley bagasse 2.9% was optimized in ADAMS medium for 129 hours (designated - TKADAMS medium). The thermal stability study showed that xylanase was stable with 60% of relative activity at 40°C for up to 24 hours and for 30 minutes at 50°C. At 60°C the enzyme was poorly stable. Amylase was stable for 24 hours at 40 and 50°C, with 80% of relative activity. CMCase and FPase was poorly stable at all temperatures tested. Avicelase was activated by the exposure at 40, 50 and 60°C. β -glucosidase was stable at 40°C for up to 24 hours, with 80% of relative activity; at 50°C it showed a relative activity of 60% for 180 minutes and at 60° it showed 40% of relative activity for 30 minutes. Laccase was stable at 50°C with t_{50} for 60 minutes. At 60°C it showed an activity of 30% for up to 240 minutes and at 70°C it showed 40% of activity for 30 minutes. As for pH, xylanase showed the best activity in a range of pH 4.0-5.0 and 7.0-8.0. Amylase, CMCase, avicelase, FPase, β -glucosidase and laccase showed expressive activities in a range of pH 4.0-5.5. The tests of pH stability in 24 hours showed that xylanase was stable at pH 5.5-7.0, amylase at pH 5.0-6.5, CMCase, FPase and laccase at pH 4.5, avicelase at pH 3.0 and β -glucosidase at pH 5.0-5.5. The effect of ions showed that CMCase and β -glucosidase were activated by K^+ , Zn^{2+} and Ba^{2+} ; CMCase, β -glucosidase and laccase were activated by NH_4^+ and Ca^{2+} ; amylase, CMCase, β -glucosidase and laccase were activated by Co^{2+} ; amylase, CMCase and β -glucosidase by Al^{3+} and Fe^{2+} ; xylanase, avicelase, CMCase and β -glucosidase by Mn^{2+} ; avicelase and CMCase by Ag^+ ; laccase by EDTA; β -glucosidase e laccase by Mg^{2+} , CMCase by Hg^{2+} and xylanase, β -glucosidase and laccase by Cu^{2+} . The extracts were used in the formulation of enzymatic cocktails for cellulose pulp biobleaching. The application of BSR, VSR and VM5 extracts on the brown pulp did not result on a significant reduction of the Kappa number when compared to the control, on account of the dark coloration of these extracts caused by the components and pigments from the cultivation with the microorganisms and barley bagasse, which as a consequence, interfered in the determination of the Kappa number. Thus, an optimized cocktail was formulated: for each 4 grams of treated pulp 20.3 mL of TKADAMS extract and 10 mL of laccase extract, pH 5.5; 35.9°C, 48 hours. This treatment resulted in the reduction of 1.83 points in the Kappa number of the brown pulp, representing an efficiency of 20.3%, and a brightness increase of 4.65 when compared to the control. The application of the cocktail in the lignocellulosic residues resulted in the formation of 85 mg/mL of reducing sugars in barley bagasse treatment for 24 hours and, 25 mg/ml of reducing sugars in sugarcane bagasse treatment for 3 hours. The application of the cocktail in the recycled paper pulps caused a greater deinking. The application of the formulated cocktail in the cellulose pulp, lignocellulosic residues and secondary fibres was promising for biobleaching, biodegradation and deinking, respectively. The enzyme application in cellulose biobleaching is a viable alternative, which helps reducing costs, water, energy and collaborates with the environment. Laccase was important in the cellulose biobleaching and the increase of its production by *T. versicolor* through bioreactor led to a production 6.25 times higher than that in Erlenmeyer, probably due to the constant aeration.

Keywords: Enzymes, Microorganisms, Lignocellulosic Wastes, Cellulose Pulp, Biobleaching

Lista de figuras

Figura 1. Exportações e importações de enzimas industriais	3
Figura 2. Molécula do polímero de celulose	6
Figura 3. Estrutura química da xilana	7
Figura 4. Estrutura química da lignina	8
Figura 5. Estrutura de uma fibra vegetal	8
Figura 6. Polímeros constituintes do amido	9
Figura 7. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático celulolítico sobre a celulose	10
Figura 8. Sistema enzimático envolvido na degradação da hemicelulose	12
Figura 9. Degradação do amido	13
Figura 10. Lacase de <i>Trametes versicolor</i>	14
Figura 11. Filograma dos principais grupos de fungos	15
Figura 12. Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas	16
Figura 13. Esquema representativo do processo de branqueamento da polpa de celulose	19
Figura 14. Biorreator: BioFlo 310 - New Brunswick	22
Figura 15. Fermentação do <i>Trametes versicolor</i> no biorreator BioFlo 310	42
Figura 16. Esquema do processo de fermentação	43
Figura 17. Atividades enzimática em diferentes fontes de carbono	48
Figura 18. Atividades enzimáticas relativas em diferentes meios de cultivo	50
Figura 19. Produção enzimática em função do tempo de cultivo	52
Figura 20. Superfície de resposta obtida dos modelos preditivos	58
Figura 21. Produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i>	60
Figura 22. Produção de lacase por <i>T. versicolor</i> sob em cultivo estático e sob agitação	60
Figura 23. Produção de lacase por <i>Trametes versicolor</i> em meio de cultivo com acréscimo de fonte de nitrogênio	61

Figura 24. Temperatura ótima de reação enzimática	63
Figura 25. Análise da estabilidade térmica da xilanase em extrato bruto produzido por <i>A. brasiliensis</i>	64
Figura 26. Análise da estabilidade térmica da amilase em extrato bruto produzido por <i>A. versicolor</i>	65
Figura 27. Análise da estabilidade térmica da CMCase em extrato bruto produzido por <i>A. versicolor</i>	65
Figura 28. Análise da estabilidade térmica da Avicelase em extrato bruto produzido por <i>A. versicolor</i>	66
Figura 29. Análise da estabilidade térmica da FPase em extrato bruto produzido por <i>A. versicolor</i>	66
Figura 30. Análise da estabilidade térmica da β -glucosidase em extrato bruto produzido por <i>A. versicolor</i>	67
Figura 31. Análise da estabilidade térmica da lacase em extrato bruto produzido por <i>Trametes versicolor</i>	67
Figura 32. Efeito do pH sobre as enzimas.....	69
Figura 33. Estabilidade ao pH por 24 horas	71
Figura 34. Influência de íons e EDTA sobre a atividade das enzimas xilanase, amilase, CMCase e avicelase	73
Figura 35. Influência de íons e EDTA sobre a atividade das enzimas FPase, β -glucosidase e lacase	74
Figura 36. Diagrama de Venn correlacionando os íons ativadores das enzimas em estudo	75
Figura 37. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por <i>Aspergillus brasiliensis</i>	76
Figura 38. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por <i>Aspergillus versicolor</i> em meio SR	77
Figura 39. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por <i>Aspergillus versicolor</i> em meio M5	77
Figura 40. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por <i>Trametes versicolor</i>	78
Figura 41. Redução do número Kappa após tratamento com os extratos enzimáticos	80

Figura 42. Superfície de resposta sobre o efeito da variação das proporções entre o meio TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom	82
Figura 43. Correlação entre as atividades residuais das enzimas xilanase e lacase e redução do número Kappa encontrados após os experimentos do planejamento experimental	84
Figura 44. Superfície de resposta obtida por meio do modelo de segunda ordem, para avaliação do efeito do pH e temperatura	86
Figura 45. Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE	87
Figura 46. Amostras de polpa marrom	88
Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura	89
Figura 48. Formação de açúcar redutor no tratamento dos bagaços	90
Figura 49. Polpa de papel reciclado proveniente de escritório	90
Figura 50. Atividade da lacase em biorreator e Erlenmeyer	91
Figura 51. Atividade específica da lacase em biorreator e Erlenmeyer	92
Figura 52. Massa seca do micélio encontrado nos cultivos em Erlenmeyer a cada 24 horas	93
Figura 53. pH do meio de cultivo em biorreator e Erlenmeyer	94

Lista de tabelas

Tabela 1. Balança comercial do Brasil referente às exportações e importações de enzimas no período de janeiro a dezembro de 2016	3
Tabela 2. Resumo das dosagens enzimáticas	31
Tabela 3. Ensaios utilizados para a construção do planejamento	35
Tabela 4. Ensaios para a construção do planejamento envolvendo pH e temperatura	36
Tabela 5. Quantidade de amostra por faixa de viscosidade	40
Tabela 6. Produção enzimática dos fungos filamentosos	46
Tabela 7. Produção enzimática em cultivo estático e sob agitação	51
Tabela 8. Planejamento experimental para avaliar o efeito da concentração do bagaço de cevada (fonte de carbono) e temperatura sobre a atividade das enzimas	53
Tabela 9. ANOVA para o Planejamento Experimental da Xilanase	54
Tabela 10. ANOVA para o Planejamento Experimental da Amilase	54
Tabela 11. ANOVA para o Planejamento Experimental da CMCase	55
Tabela 12. ANOVA para o Planejamento Experimental da Avicelase	55
Tabela 13. ANOVA para o Planejamento Experimental da FPase	56
Tabela 14. ANOVA para o Planejamento Experimental da β -glucosidase	56
Tabela 15. Resumo dos parâmetros de produção enzimática	62
Tabela 16. Temperatura ótima de cada enzima em estudo	64
Tabela 17. t_{50} das enzimas nas diferentes temperaturas	68
Tabela 18. Correlação entre os principais íons ativadores das enzimas	75
Tabela 19. Parâmetros de cultivo de <i>A. tamaritii</i> Kita para produção de xilanase	79
Tabela 20. Dados de caracterização da xilanase bruta produzida por <i>A. tamaritii</i> Kita	79
Tabela 21. Planejamento experimental para avaliar o efeito da variação das proporções entre os extratos TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom	81
Tabela 22. ANOVA para o Planejamento Experimental da variação das proporções entre os meios de cultivo TKADAMS e da lacase	82

Tabela 23. Redução do número Kappa em tratamentos contendo maiores quantidades de xilanase bruta	83
Tabela 24. Redução do número Kappa em função do tempo de tratamento	83
Tabela 25. Planejamento experimental para avaliar o efeito do pH e temperatura sobre a redução do número Kappa da polpa marrom	84
Tabela 26. ANOVA para o Planejamento Experimental da variação do pH e temperatura	85
Tabela 27. Condições padronizadas para o coquetel enzimático	87
Tabela 28. Biobranqueamento da polpa marrom com coquetel enzimático	88
Tabela 29. Produtividade em biorreator e Erlenmeyer	92

Lista de abreviações e símbolos

atm: atmosfera
BSR: meio de cultivo otimizado para produção de xilanase
DCCR: delineamento composto central rotacional
DO: demanda de oxigênio
EDTA: etilenodiaminotetraacetato
g: grama
kDa: kiloDaltons
L: litros
M: molar
MANAE: monoamino-N-aminoetil
MEV: microscopia eletrônica de varredura
mg: miligramas
min: minutos
mL: mililitros
mM: milimolar
MM: massa molecular
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
pH: potencial hidrogeniônico
q.s.p.: quantidade suficiente para
rpm: rotações por minuto
s: segundos
SDS: dodecil sulfato de sódio
TEMED: tetrametiletilenodiamina
TKADAMS: meio de cultivo otimizado para cultivo de xilanase de *A. tamarii* Kita
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
v/v: volume por volume
V: Volts
VM5: meio de cultivo otimizado para produção de CMCase, FPase e avicelase
VSR: meio de cultivo otimizado para produção de amilase e β -glucosidase
v.v.m.: volume de ar por volume de líquido por minuto
pNPG: p-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo
 μ g: Microgramas
 μ L: Microlitros
°C: grau Celsius
%: por cento
 α : alfa
 β : beta

I. Introdução

1.1. Mercado de enzimas

Avanços nas atividades de Pesquisa & Desenvolvimento, crescimento do consumo, necessidade de redução de custos e otimização de recursos em vários processos são alguns dos fatores que impulsionam o mercado mundial de enzimas industriais, o qual está projetado para atingir 7,1 bilhões em 2018 (BCC Research, 2014). Este mercado de enzimas é segmentado nas celulases, amilases, proteases, lipases, xilanases e outras enzimas, as quais podem ser aplicadas na fabricação de bioetanol, papel e celulose, têxteis e couro, ração animal, processamento de amido (MARKET AND MARKETS, 2016).

As principais empresas que dominam o mercado mundial de enzimas são BASF SE, E.I. du Pont de Nemours and Company, Associated British Foods plc, Koninklijke DSM N.V. e Novozymes A/S. A exploração do mercado em novas regiões por meio de novas aquisições, expansões, lançamentos de novos produtos e acordos, parcerias e colaborações, somado ao aumento de conhecimentos técnicos movidos por investimentos intensivos em P&D permitem a estas empresas melhorar as ofertas de produtos e captar uma maior quota de mercado, aumentando assim a procura de enzimas industriais (MARKET AND MARKETS, 2016).

O Brasil, em 2016, apresentou um perfil de comércio enzimático com valores de importação maiores do que de exportação na maioria das mercadorias envolvendo preparados enzimáticos (Alice Web) (**Tabela 1**). Adicionalmente, a partir da análise de dados obtidos em 2000, 2004, 2008, 2012 e 2016, referentes às exportações e importações enzimáticas (Alice Web), observa-se que neste período houve um aumento de exportação de enzimas produzidas no Brasil, no entanto o déficit ainda é predominante (**Figura 1**). Este dado corrobora com o cenário nacional quanto a venda e compra de produtos, uma vez que o país é caracterizado por exportações de bens não industriais, baixa tecnologia e importação de produtos tecnológicos (DAIHA *et al.*, 2016).

O mercado de enzimas industriais é pequeno no país, frente a demanda mundial. Deste modo, fica evidente a importância do incentivo e desenvolvimento de pesquisas relacionadas a produção e aplicação de enzimas nos diversos ramos industriais.

Tabela 1. Balança comercial do Brasil referente às exportações e importações de enzimas no período de janeiro a dezembro de 2016

Preparação Enzimática	Valores em US\$ FOB 2016		
	Exportação	Importação	Saldo
Amilases e seus derivados	1.223.707	8.223.930	-7.000.223
Proteases e seus derivados	12.231.788	8.536.861	3.694.927
Celulases e seus derivados	660.564	2.103.817	-1.443.253
Enzimas preparadas à base de transglutaminase	200.923	1.277.764	-1.076.841
Outras enzimas preparadas	31.021.633	89.671.317	-58.649.684
Medicamentos contendo enzimas, em doses	2.513.108	170.443.689	-167.930.581
Total	47.851.723	280.257.378	-232.405.655

Figura 1. Exportações e importações de enzimas industriais. Onde, ■ refere-se ao ano 2000, ▨ 2004, ■ 2008, ■ 2012, ▤ 2016. Valores expressos em dólares. Dados extraídos de Alice Web, 2017.

1.2. Resíduos industriais

O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, sendo que quase todos os estados brasileiros são tomados por este tipo de plantio, que ocupa cerca de 9% da superfície agrícola de todo país (BNDES & CGEE, 2008). A cana de açúcar é cultivo mais expressivo economicamente depois da soja (SUCCESSFULL FARMING, 2016), com uma produção prevista de 694,54 milhões de toneladas para safra de 2016/2017 (CONAB, 2016). A cada tonelada de cana são produzidos 260 kg de bagaço (considerando 50% de umidade) (SEABRA *et al.*, 2010).

A composição da cana de açúcar é majoritariamente de polímeros de açúcar

(hemiceluloses, celulose, pectina), deste modo, estes polissacarídeos podem ser reaproveitados para a produção de compostos de alto valor como, por exemplo, a produção de enzimas, ácidos orgânicos, etanol de segunda geração, polpa de celulose e papel (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

Além da produção de bagaço, o cultivo da cana para produção de etanol gera outro resíduo, a vinhaça, também conhecida por vinhoto, tiborna ou restilo. Este é um resíduo que sobra após a destilação fracionada do caldo de cana de açúcar (garapa) fermentado. Para cada litro de etanol produzido, cerca de 12 litros de vinhaça são deixados como resíduo (NOVACANA, 2013). É um líquido de odor forte, coloração marrom-escuro, pH ácido, elevado teor de potássio e alta demanda química de oxigênio (DQO) devido à grande carga de matéria orgânica (SILVA *et al.*, 2014). Sua composição química pode variar em função de diversos fatores, como a composição da matéria-prima, qualidade da água, método de fermentação e substâncias acrescentadas nos processos (produtos químicos, aditivos, ácidos, antibióticos e nutrientes), tipo de levedura e tipos de aparelhos usados na destilação (NICOCELLI, 2011).

Outra cultura agroindustrial que tem destaque no país é a produção de cevada, a qual está intimamente relacionada à cervejaria, e estima-se que o número de propriedades com este cultivo no país chegue a duas mil, as quais se concentram na região Sul (90% da produção) (EMBRAPA, 2015). Em São Paulo o cultivo vem crescendo a cada ano, uma vez que o consumo de cerveja faz parte da cultura brasileira e mundial e como consequência desta produção, há uma expressiva geração de resíduos (CHAVES *et al.*, 2014).

A cultura de Eucalipto é conhecida mundialmente por direcionar-se principalmente a indústria de celulose e papel. A maioria das espécies de eucalipto tiveram sua origem na Austrália e Tasmânia (BOLAND *et al.*, 1992), no entanto, estas foram introduzidas em outras regiões e estão amplamente distribuídas em largas plantações nas áreas temperada, subtropical e tropical (PIRRALHO *et al.*, 2014). Nas regiões tropicais e subtropicais são utilizadas espécies de eucalipto, como *E. grandis* e *E. nitens*, bem como híbridos diferentes, como o híbrido de urograndis (*E. grandis* × *E. urophylla*) extensivamente utilizado no Brasil (LITTLE & GARDNER, 2003). O país ocupa o quarto lugar no ranking dos países produtores de celulose de todos os tipos e como primeiro produtor mundial de celulose de eucalipto (IBÁ, 2015).

A indústria de papel e celulose também se destaca na produção de resíduos, como por exemplo, o lodo branco. Nas áreas onde localizam-se as máquinas de papel ocorre a geração de lodo branco, o qual é constituído por matérias primas excedentes do processo de fabricação de papel. Esta perda é acumulada no chamado efluente de máquina de papel, o qual antes de ser

descartado passa por um processo de remoção da matéria orgânica e demais produtos. Este tratamento ocorre por meio da decantação do lodo no tanque pulmão (tanque de lodo). Após este processo, o lodo é aspirado por bombas e direcionado às prensas ou centrífugas para retirada do excesso de líquido, para então ser disposto em aterros ou tratado em áreas de compostagem para produção de adubo. A composição básica de grande parte dos lodos de estações de tratamento de efluentes em fábricas de celulose e papel é de células microbianas, materiais lenhosos orgânicos e cinzas (BETINI, 2016).

A expansão da atividade agroindustrial tem levado a um grande acúmulo de resíduos, como por exemplo, o bagaço de cana de açúcar, bagaço de cevada, lodo branco (resíduos lignocelulósicos) e vinhaça. Muitos destes resíduos, que aparentemente não tem função, podem, e já são utilizados, em muitos processos industriais, servindo como matéria prima para produção biotecnológica de vários compostos, como por exemplo, a produção de enzimas por meio do cultivo de micro-organismos e produção de papel alternativo (a partir de resíduos lignocelulósicos). A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos além de proporcionar substratos alternativos, também ajuda a minimizar problemas ambientais (RIBEIRO, 2014; IBÁ, 2015).

1.3. Composição da biomassa vegetal

Resíduos lignocelulósicos apresentam em sua estrutura principalmente celulose, hemicelulose e lignina, os quais são polímeros associados entre si.

A celulose é um polímero linear biodegradável, renovável, fibroso, resistente e insolúvel em água. Está envolvida com a manutenção da estrutura das paredes celulares de plantas, oomicetos e algas (LISPERGUER *et al.*, 2008; SUHAS *et al.*, 2016).

A celulose e muitos produtos de celulose são inofensivos para o ambiente porque retornam ao ciclo natural do carbono por meio do simples processo de decomposição. Este polímero apresenta propriedades características como o potencial absorvente, não é tóxico e é de fácil modificação química (SUHAS *et al.*, 2016).

Com fórmula molecular $(C_6H_{12}O_6)_n$, a celulose é constituída por unidades de D-anidroglicopirranose (AGU), os quais são simplesmente designados como unidades de glucose. Estas unidades combinam-se por ligações do tipo β -1,4 (IOELOVICH & LEYKIN, 2008; SUHAS *et al.*, 2016) (**Figura 2**). A estrutura cristalina da celulose é mantida por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e forças van der Waals, uma vez que a conformação de cadeira da glucose presente na celulose força os grupos hidroxil para a orientação radial e os

átomos de hidrogênio alifáticos em posições axiais (HIMMEL *et al.*, 2007; SOREK *et al.*, 2014). Além desta estrutura cristalina, a celulose também apresenta regiões amorfas (LIN *et al.*, 1987; DE VRIES & VISSER, 2001). A celulose é sintetizada na natureza como moléculas individuais, por meio de complexos específicos ligados à membrana plasmática que auxiliam a formação das microfibras. Aproximadamente 30 moléculas de celulose são agrupadas e formam as fibrilas elementares (protofibrilas), que por sua vez são empacotadas formando as microfibrilas, e estas, por fim, constituem as fibras de celulose (HARRIS & DEBOLT, 2010)

Figura 2. Molécula do polímero de celulose.

A hemicelulose é um heteropolímero formado por cadeias lineares e ramificadas. É caracterizada por apresentar cadeias mais curtas de baixa massa molecular e está intimamente ligada a celulose dentro da estrutura dos tecidos vegetais. Constitui de 15 a 35% da biomassa vegetal e é composta por diferentes monômeros de açúcar (D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose, entre outros). Geralmente são encontradas na forma de O-acetil-4-O metilglucuranoxilanas e O-acetilgalactoglucomanas, dependendo da fonte de biomassa. Os ácidos urônicos, como glucurônico e galacturônicos também são encontrados em hemiceluloses (RAVINDRAN & JAISVAL, 2016; POLIZELI *et al.*, 2016).

A xilana é uma hemicelulose e o mais abundante heteropolíssacarídeo natural. Está localizada principalmente na parede celular secundária e na lamela média das plantas. Sua cadeia principal é composta por resíduos de xilose ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares (POLIZELI *et al.*, 2005, FREESE *et al.*, 2005; BETINI, 2016) (**Figura 3**).

Figura 3. Estrutura química da xilana: polímero de xilose com ramificações. Onde: (Ac) grupo acetil; (α -Araf) α -arabinofuranose, (α -4-O-Me-GlcA) ácido α -4-O-metilglucurônico (adaptado de SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

A lignina, por sua vez, tem uma natureza aromática e amorfa e sua estrutura varia de acordo com as espécies de plantas (RAVINDRAN & JAISVAL, 2016). É constituída de unidades de fenilpropano unidas por ligações C-O-C e C-C, com diferentes teores de grupos alcóolicos e metoxílicos dependendo da madeira (KLOCK *et al.*, 2005). O acoplamento das unidades de fenilpropano ocorre irregularmente e de forma não repetitiva, devido a polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (FERRAZ, 2004; BON *et al.*, 2008) (**Figura 4**). Esses grupos unidos formam a lignina, que devido a sua estrutura rígida, desempenha função estrutural, conferindo rigidez e proteção à parede celular (CARPITA *et al.*, 1993; VOGEL, 2008).

Figura 4. Estrutura química da lignina formada por seus três diferentes monômeros. Onde: **H** - álcool cumárico, **G** - álcool coniferílico, **S** - álcool sinapílico. (Adaptado de RUBIN, 2008).

Os componentes da parede celular mencionados se arranjam de forma que as cadeias de celulose e hemicelulose se fixem à lignina. A estrutura final é como uma rede fibrosa em que os componentes se interconectam (SANTOS *et al.*, 2012) (**Figura 5**), conferindo resistência e rigidez à planta.

Figura 5. Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem de MEV refere-se a fibra de eucalipto (SILVA *et al.*, 2009).

Além dos componentes da parede celular, as células vegetais também apresentam outros componentes importantes, como por exemplo, o amido. Este componente é o principal carboidrato de reserva das plantas. O amido é composto por amilose, polímero de cadeia linear constituído de unidades de D-glucose unidas por ligação α -1,4, e amilopectina, polímero de D-glucose, com ligações α -1,4, e ramificações com ligações α -1,6 a cada 17-26 resíduos de glicose (BON *et al.*, 2008) (**Figura 6**).

Figura 6. Polímeros constituintes do amido. Amilose (A), amilopectina (B).

1.4. Enzimas que atuam na degradação da biomassa vegetal

Resíduos lignocelulósicos podem ser utilizados como fonte de carbono em processos microbiológicos, que visem produções enzimáticas, as quais por sua vez, podem ser aplicadas a diversos processos industriais, de modo a substituir ou colaborar com processos agressivos ao meio ambiente. Um exemplo de produção poluente na qual pode se inserir o uso de enzimas a seu processo, é o biobranqueamento da polpa de celulose (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2015; BETINI, 2016; TORRE & KADOWAKI, 2017). Estudos bioquímicos revelam que a modificação das fibras vegetais para produção de papel requer a presença de vários tipos de enzimas (IBARRA *et al.*, 2012).

A degradação da celulose ocorre por meio de um complexo de enzimas formado por endoglucanase, exoglucanase ou celobiohidrolase, e β -glucosidase (HARRIS & DEBOLT, 2010) (**Figura 7**). As endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivam ligações β -1,4-glicosídicas internas, e sua atividade é frequentemente determinada sob uma cadeia de celulose com alto grau de polimerização, como carboximetilcelulose (CMC). Os produtos dessas enzimas incluem a glicose, celobiose e ciclodextrinas (VLASENKO *et al.*, 2010). As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) clivam as extremidades acessíveis das moléculas de celulose liberando glicose e celobiose (TULL & WITHERS, 1994). As β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), por sua vez, hidrolisam celobiose e outras celodextrinas, liberando glicose (PANDEY & SOCCOL, 2000). Além dessas celulasas, existem outras enzimas que atuam na degradação da

celulose, como as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (do inglês "copper dependent lytic polysaccharide monooxygenases – LPMOs), as quais aumentam a atividade celulolítica na medida em que clivam a celulose por oxidação dos C-1, C-4 e C-6 (WU *et al.*, 2014).

Figura 7. Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático celulolítico sobre a celulose (adaptado de POLIZELI *et al.*, 2016).

As celulasas atuam por meio da adsorção à superfície celulósica. Geralmente apresentam estrutura bimodular, formada por um domínio maior onde ocorre a hidrólise, chamado de domínio catalítico (CCD) e por um domínio menor, o domínio de ligação à celulose (CBM). Este último domínio está presente na maioria das endo e exoglucanases de estrutura conhecida, e é responsável por aumentar a concentração das celulasas na superfície celulósica (PRATES, 2013).

A hidrólise da hemicelulose em monômeros de açúcar ocorre através da ação de várias enzimas que trabalham em cooperação ou sinergismo. A xilana, hemicelulose composta principalmente de D-xilose, é a principal classe deste polímero. As enzimas mais importantes na degradação da xilana são as endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) e β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37). As endo- β -1,4-xilanases clivam as ligações glicosídicas internas da xilana, diminuindo assim o grau de polimerização e liberando xilose, e xilo-oligossacarídeos (GALLARDO *et al.*, 2010;

POLIZELI *et al.*, 2016).

A β -D-xilosidase não hidrolisa xilana, mas sim, β -1,4-D-xilana, xilo-oligossacarídeos, e xilobiose, liberando xilose (POLIZELI *et al.*, 2016).

O conteúdo de L-arabinose presente em heteropolissacarídeos é hidrolisado por arabinanases (EC 3.2.1.99) e arabinofuranosídeses (EC 3.2.1.55). Arabinanases hidrolisam ligações α -1,5-arabinofuranosídicas liberando arabinose ou oligômeros de arabino (CARAPITO *et al.*, 2009). As L-arabinofuranosídeses liberam monômeros terminais de arabinose a partir de oligo e polissacarídeos e são ativas sob *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosídeo (SAHA, 2000).

O ácido glucurônico presente nas hemiceluloses é hidrolisado por β -glucuronídeses (EC 3.2.1.31). O xiloglucano, hemicelulose composta por glicose e xilose, é clivado por endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.151). E a manana, um polissacarídeo linear composto por D-manose ou glicose e combinações de manose com grupos laterais de grupos galactosil é desconstruída pela ação da endo-1,4- β -manosídeo (EC 3.2.1.78) e β -manosídeses (EC 3.2.1.25) (DE VRIES & VISSER, 2001; ALSARRANI, 2011; POLIZELI *et al.*, 2016).

Além destas enzimas, outras acessórias ainda são necessárias na desconstrução da hemicelulose. Acetil xilana esterase (EC 3.1.1.6) remove os substituintes O-acetil a partir da posição C2 e/ou C3 dos resíduos de xilose na acetil xilana (BLUM *et al.*, 1999; CAUFRIER *et al.*, 2003). Feruloil esterase (EC 3.1.1.73) clivam ligações entre as cadeias laterais de arabinose e do ácido ferúlico (CREPIN *et al.*, 2004).

Figura 8. Sistema enzimático envolvido na degradação da hemicelulose (adaptado de POLIZELI *et al.*, 2016).

O amido, por sua vez, é degradado pelas enzimas, α -amilase (E.C. 3.2.1.1), β -amilase (E.C. 3.2.1.2), glucoamilase (E.C. 3.2.1.3), isoamilase (E.C. 3.2.1.68) e pululanase (E.C.3.2.1.41) (**Figura 9**). A α -amilase age exclusivamente nas ligações α -1,4 no interior da cadeia da amilose e da amilopectina liberando malto-oligossacarídeos. A β -amilase atua nas ligações α -1,4 das extremidades não redutoras da cadeia de amido liberando unidades de maltose; a glucoamilase age nas ligações α -1,4 e em menor velocidade nas ligações α -1,6 das extremidades não redutoras do amido liberando monômeros de glucose. A isoamilase hidrolisa ligações α -1,6 do amido em ramificações com no máximo três unidades de glucose; e a

pululanase, amilase desramificante, age nas ligações α -1,6 do pululano (polissacarídeo linear composto por maltotrioses unidas por ligações α -1,6), ocasionando a liberação de maltotrioses (PANDEY *et al.*, 2000).

Figura 9. Representação esquemática do sistema enzimático envolvido na degradação do amido.

E a lignina, finalmente, é degradada por ligninases, como por exemplo, a lacase (EC 1.10.3.2) (**Figura 10**). A reação de oxidação catalisada pelas lacases ocorre por meio de seus átomos de cobre. Os quatro átomos de cobre da lacase nativa apresentam estado de oxidação 2^+ , e à medida que a enzima promove a oxidação de seus substratos, os átomos de Cu^{2+} são reduzidos e transferem seus elétrons, através dos resíduos de aminoácidos His-Cis-His até o O_2 , reduzindo-o a H_2O (CLAUS, 2004). A oxidação de substratos fenólicos resulta na produção de quinonas ou radicais livres instáveis, os quais são estabilizados pela polimerização espontânea (BRYJAK *et al.*, 2007)

Figura 10. Representação tridimensional da lacase de *Trametes versicolor*. A disposição das cadeias polipeptídicas D1, D2 e D3, encontra-se ilustrada em cores diferentes. As esferas azuis representam os íons cobre do sítio catalítico. Carboidratos e pontes dissulfeto encontram-se ilustrados na forma de barras (A) (PIONTEK *et al.*, 2002). Sítio ativo das lacases (B) (RIVA, 2006).

1.5. Fungos como produtores de enzimas e regulação de xilanases e ligninases

Diversos organismos são capazes de produzir enzimas, sendo 50% da produção destas para a indústria ocasionada por fungos, 35% por bactérias, e 15% por plantas e organismos simbiotes de animais (SIROTEK *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005; ANISA & GIRISH, 2014).

Os micro-organismos despertam grande interesse de estudo em virtude de inúmeras vantagens apresentadas, já que não necessitam de amplos espaços para crescimento; apresentam rápido crescimento em condições favoráveis, degradam e crescem em diversos substratos e podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de mutantes desejados (BRAVO *et al.*, 2000). Dentro do domínio Eukarya, o reino Fungi possui uma enorme diversidade, onde se acredita existir aproximadamente 1,5 milhões de espécies. Estes organismos possuem diversos sistemas de sobrevivência nos mais diferentes ambientes, sendo descrita a tolerância até mesmo as condições ambientais extremas de temperatura e pH (FASANELLA, 2012).

A **Figura 11** traz um filograma contendo os principais grupos de fungos: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Chytridiomycota.

Figura 11. Filograma dos principais grupos de fungos e as relações filogenéticas entre eles (TORQUEMADA GUERRA *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, um grande número de micro-organismos não patogênicos, capazes de produzir enzimas por meio de fermentações utilizando principalmente recursos renováveis, tem sido pesquisado nos diversos ramos industriais (NASCIMENTO *et al.*, 2014), como por exemplo, representantes do gênero *Aspergillus*, pertencentes a família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, classe Eurotiomycetes e divisão Ascomycota.

O fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* espécie *brasiliensis* foi descrito em 2007 por Varga *et al.*, sendo caracterizado por colônias com coloração branca nos primeiros dias, que passa para o marrom escuro seguido do preto. Seus conídios variam de 3,5 a 4,5 µm e a vesícula de 30 a 40 µm (VARGA *et al.*, 2007). É um bom produtor enzimático; na literatura consta produção de β-xilosidase termoestável, com pH ótimo de 5 e temperatura ótima de 75°C (PEDERSEN *et al.*, 2007).

Aspergillus versicolor, outra espécie de fungo filamentoso, apresenta uma ampla distribuição nos diversos ambientes, uma vez que cresce em ambientes com temperaturas de 4-40°C, e é tolerante a uma grande variação de pH, sendo resistente principalmente a condições alcalinas. Apresenta no início do crescimento uma coloração branca que se torna amarelada (MYCOBANK DATABASE, 2016). É produtor de celulasas, principalmente β-glucosidase (ANDERSEN *et al.*, 2016).

Aspergillus tamarai Kita apresenta colônias de crescimento rápido com coloração marrom escuro. Seus conídios apresentam-se em média com 500-600 µm de diâmetro e conidióforos geralmente com 1-2 mm de comprimento (MYCOBANK DATABASE, 2016). É um bom produtor enzimático; na literatura consta sua produção de xilanases termoestáveis (HEINEN *et al.*, 2017).

Os fungos são organismos biodegradadores, que encontram as substâncias necessárias ao seu desenvolvimento na natureza, na forma de macromoléculas, as quais precisam ser

degradadas em unidades monoméricas, antes de serem incorporadas ao nível celular. Estes micro-organismos transportam nutrientes através de sua membrana plasmática, e para isso, secretam as exoenzimas, que hidrolisam as macromoléculas até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana celular (PUTZKE & PUTZKE, 2002).

A xilana, por exemplo, é um polímero que não atinge os níveis intracelulares dos micro-organismos, deste modo, faz-se necessário o desencadeamento de um mecanismo de sinalização celular para a expressão gênica de enzimas xilanolíticas, as quais são relatadas como responsáveis pela produção de xilo-oligossacarídeos como xilobiose e xilotriose (ARO *et al.*, 2005; POLIZELI *et al.*, 2005). Por meio de permeases, estes xilo-oligossacarídeos são então transferidos para o interior celular desencadeando a transcrição de genes do sistema xilanolítico (Figura 12).

Figura 12. Regulação da biossíntese de enzimas xilanolíticas. Xilanases constitutivas degradam xilana a xilo-oligossacarídeos, que por meio de permeases, entram no citoplasma desencadeando a transcrição de outros genes para a produção de xilanases e β-xilosidases. (Adaptado de POLIZELI *et al.*, 2005).

Para a completa assimilação da xilana, pelo menos três componentes são essenciais. Inicialmente faz-se necessário a ação de uma endo-1,4-β-xilanase extracelular, a qual ocasionará a liberação de xilo-oligossacarídeos maiores, os quais serão transportados para o interior celular na presença de uma β-xilosidase permease. No ambiente intracelular a ação de uma β-xilosidase ocasionará a formação da xilose a partir dos xilo-oligossacarídeos menores (PRADE, 1995; POLIZELI *et al.*, 2005).

Quanto a regulação do sistema lignolítico, a maior parte do conhecimento é proveniente de estudos com basidiomicetos. *Trametes versicolor* é um fungo pertencente a divisão dos Basidiomycota, descrito como fungo da degradação branca da madeira. É produtor de enzimas lignocelulolíticas de alto valor agregado, como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase (MARTÍNKOVA *et al.*, 2016). Segundo Aro *et al.* (2005) as ligninases têm um sistema de regulação semelhante ao das demais enzimas (celulases e hemicelulases) envolvidas da degradação da parede celular vegetal. Este controle ocorre em nível da síntese do RNAm onde há a expressão dos genes do sistema lignolítico na presença de lignina.

1.6. Aplicações biotecnológicas de enzimas

Enzimas são biocatalizadores que têm sido aceitos e empregados em diversos setores, devido entre vários fatores, por sua especificidade ao substrato e sua química verde. O uso de enzimas em processos industriais tem a capacidade de substituir produtos químicos convencionais, conservar água e energia (MADHU & CHAKRABORTY, 2017). Enzimas ocasionam reações mais específicas, o que resulta em um aumento de rendimento do produto final. Elas também possibilitam reações à temperaturas e/ou pressões mais amenas, acarretando assim uma diminuição nos custos de energia, volumes de água de arrefecimento, e ainda redução do capital necessário para os equipamentos e sistemas de controle. Estes biocatalizadores podem substituir produtos químicos nocivos que apresentam impacto ambiental negativo quando descartados (NOVOZYME).

1.6.1. Aplicação biotecnológica na indústria de papel e celulose

A indústria de papel e celulose ocupada uma posição desafiadora com relação ao meio ambiente. Pelo lado positivo, baseia-se no uso de recursos renováveis e fotossintéticos, ao mesmo tempo em que descarta uma grande quantidade de efluentes. Grandes volumes (mais de 70 m³) de águas residuais são geradas para cada tonelada métrica de papel produzido, dependendo da natureza da matéria-prima, tipo de produto final e reuso de água. Adicionalmente, como as operações de fabricação de polpa de celulose ocorrem em meio aquoso, as aplicações de vários aditivos químicos podem alterar consideravelmente as propriedades dos efluentes produzidos, tornando-os prejudicial ao meio ambiente (HUBBE *et al.*, 2016). Deste modo, a aplicação de enzimas neste processo de produção de polpa de celulose é uma alternativa viável e que auxilia a redução de custos, água, energia e colabora com o meio ambiente.

1.6.1.1. Tradicional processo de fabricação da polpa de celulose

O Brasil é um grande produtor de papel. Destaca-se mundialmente por produzir e abastecer os mercados com expressivos volumes deste produto. O desenvolvimento socioeconômico e o aumento de renda da população, com o aumento de consumidores no mercado, resultaram em maiores demandas por cadernos, livros, jornais, itens de higiene pessoal, embalagens de alimentos e remédios (IBÁ, 2015).

A fabricação e branqueamento de celulose para fabricação de papéis brancos é denominado de processo Kraft (ALVEZ *et al.*, 2015).

A produção da celulose baseia-se na obtenção da madeira para transformação desta em fibras ou polpa celulósica. A madeira é proveniente de florestas plantadas principalmente do gênero *Eucalyptus*, a qual propicia uma produtividade média de $45 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, com curtos ciclos de corte, entre 5 e 7 anos, sob baixos custos, representando 81,6% da produção de polpa celulósica total nacional (SILVA, 2011). As fibras de eucalipto são curtas, com 0,5 a 2 milímetros de comprimento, ideais para a produção de papéis de menor resistência, com alta maciez e boa absorção, como os de imprimir, escrever e de fins sanitários (papel higiênico, toalhas de papel, guardanapos) (IBÁ, 2015).

Da madeira à pasta de celulose várias etapas fazem-se necessárias: desfibração mecânica (processo mecânico) ou cozimento (processo químico), branqueamento e modificação das fibras. A desfibração mecânica ocorre quando a madeira é sujeita ao descascamento e sucessivos cortes das toras que liberam as fibras das estruturas lenhosas, enquanto o método químico (cozimento) envolve um tratamento da madeira, em que há a degradação da lignina pelo uso de licor de cozimento (solução aquosa alcalina). A pasta (polpa bruta ou polpa marrom) gerada nessa primeira etapa, obtida tanto pelo método mecânico quanto pelo químico, tem uma coloração castanha, devido, principalmente, a presença de xilana e lignina. A coloração escura da polpa é indesejável, uma vez que a sua utilização visa a fabricação de papel branco. Deste modo, realiza-se uma segunda etapa, o branqueamento (SOUSA, 2002) (**Figura 13**). Para alvejar a celulose, as indústrias utilizam diversos reagentes químicos oxidantes, álcalis e ácidos, tais como dióxido de cloro (ClO_2), oxigênio (O_2), ozônio (O_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hipoclorito de sódio (NaClO) e soda cáustica (NaOH). Há pouco tempo, esta segunda etapa era feita com cloro elementar, o qual foi substituído pelo dióxido de cloro na tentativa de se minimizar a formação de dioxinas, que são compostos organoclorados, classificados como agentes cancerígenos, e também associados a doenças dos sistemas endócrino, reprodutivo, nervoso e imunológico. O uso de dióxido de cloro diminuiu esta contaminação, no entanto, não

elimina totalmente as dioxinas (FERRAZ, 2009).

A terceira etapa da produção de pasta de celulose nas indústrias envolve as modificações das fibras, por meio da refinação ou o batimento das fibras, alcalinização e a combinação com aditivos. Esta etapa visa melhorar as características das fibras na tentativa de produzir um papel de melhor qualidade (SOUSA, 2002).

As sequências de branqueamento são diversificadas nas indústrias de celulose e papel, pois cada indústria possui estratégias distintas em seus processos, no que diz respeito às etapas sequenciais de branqueamento de polpa de celulose e grau de alvura desejado (BETINI, 2016).

Os métodos de tratamento convencionais da polpa de celulose são agressivos ao meio ambiente e, conseqüentemente, aos seres vivos, deste modo, investigações capazes de superar estes riscos vêm sendo desenvolvidas. A aplicação de enzimas na produção de papel a partir da pasta primária (fibras vegetais de espécies arbóreas e não arbóreas) ou secundária (papel reciclado) é uma alternativa que tem revelado bastante interesse.

Figura 13. Esquema representativo do processo de branqueamento da polpa de celulose. Em verde explicita-se o local do processo em que pode-se substituir o tratamento químico pelo enzimático.

Após a fabricação da pasta de celulose, esta é enviada à máquina de papel. Neste processo, as fibras de celulose são distribuídas em uma mesa de formação, onde a água é drenada através de uma tela, e o material celulósico é retido formando a folha de papel. Posteriormente, para maior retirada da água, a folha é prensada (por um conjunto de cilindros)

e seca (passagem por cilindros aquecidos) (SOUSA, 2002).

O papel, além das fibras resinosas e folhosas, também pode ser obtido, a partir de subprodutos agrícolas (resíduos), como bagaço de cana de açúcar ou bagaço de cevada (SAUVAGEAU & FRAYRET, 2015) ou ainda a partir de fibras secundárias, oriundas de papel reciclado. Em fevereiro de 2017, inaugurou-se em Lençóis Paulista/ SP, a primeira fábrica (FibraResist) capaz de produzir celulose a partir da palha da cana, com capacidade de produção de até 72 mil toneladas de pasta celulósica por ano (GLOBO RURAL, 2017).

Quanto ao papel reciclado, este é uma outra alternativa que visa colaborar com o meio ambiente. Uma enorme quantidade de resíduos de papel, que vem de escritórios, é inutilizada, submetida a biodegradação lenta ou queimada (JOSHI *et al.*, 2017). A extração de celulose e o processo de produção de uma única folha de papel A4 a partir de matéria celulósica fresca, é responsável pela produção de enormes quantidades de pegada de carbono (4,74 g de CO₂ equivalente/folha) (DIAS & ARROJA, 2012). Este dano ambiental pode ser superado reutilizando e reciclando o papel.

Os papéis que chegam na indústria de reciclagem passam pela triagem, para separação de impurezas e, em seguida, são picados e triturados em aparas. Posteriormente, essa massa de papel é posta de molho, a fim de se eliminar contaminantes e entumecer as fibras; depois é cozida, visando dispersão dos resíduos encontrados, e descolorida. Posteriormente essa massa é lavada para uma homogeneização, seca e prensada, alcançando a gramatura desejada (PINHEIRO *et al.*, 2013). O processo de destintagem é um dos principais desafios da indústria papelreira, uma vez que no processo de reciclagem além de modificar as fibras, há a necessidade de remoção de vários contaminantes, como agentes de revestimento e o desalojamento das partículas de tinta da superfície de impressão (SOUSA, 2002; IBARRA *et al.*, 2012). Jornais e revistas apresentam o que se denomina por tinta de impacto, que é de fácil remoção, enquanto papeis xerocados ou impressões a laser/jato apresentam a tinta sem impacto, a qual é mais difícil de ser removida. Os métodos convencionais de destintamento envolvem produtos à base de cloro, que são ambientalmente perigosos (MAITY *et al.*, 2012). O destintamento enzimático tem atraído a atenção, na medida em que reduz custos do processo e é mais ecologicamente viável (IBARRA *et al.*, 2012). Enzimas como celulasas, hemicelulasas, lacases e amilases podem ser empregadas no tratamento enzimático, na medida em que modificam a superfície das fibras e possibilitam a saída das partículas de tinta.

1.6.1.2. Biobranqueamento da polpa de celulose

O processo de branqueamento da polpa celulósica para a fabricação de papel a partir de produtos biológicos é denominado de biobranqueamento. O biobranqueamento utiliza enzimas produzidas por fungos. Estas enzimas alteram as quantidades de lignina e hemiceluloses presentes nas paredes celulares das células das fibras da madeira, as quais são indesejadas na polpa celulósica destinada a produção de papel branco (BETINI, 2016). O tipo de enzima utilizada para o biobranqueamento depende do tipo de papel, do método de impressão empregado e da afinidade das enzimas pelos constituintes e características das amostras.

Em 1986 foi publicado pela primeira vez o uso de enzimas no branqueamento de polpas de celulose, quando pesquisadores descobriram que a xilanase aumentava os efeitos neste processo, resultando em uma economia de 10-20% de produtos químicos. Pesquisas subsequentes descreveram a lacase como outra enzima influente no resultado de branqueamento (BOURBONNAIS *et al.*, 2000).

O branqueamento da polpa de celulose, como já visto, baseia-se na eliminação da lignina e hemicelulose presentes nas fibras. Os processos industriais envolvem vários estágios para atingir tal objetivo, os quais podem variar para cada fábrica de celulose, no entanto o objetivo final desejado é sempre o mesmo, redução do grau de alvura com uma menor degradação das fibras, uma vez que isso implica no rendimento madeira/químicos x celulose branqueada (BETINI, 2016).

Os principais parâmetros de controle de qualidade da polpa obtida são:

- Número Kappa, o qual determina a quantidade de lignina residual nas paredes celulares das fibras que compõem a polpa celulósica
- Viscosidade, que é uma variável usada para medir o grau de degradação das fibras na polpa celulósica, uma vez que quanto mais degradadas estiverem as fibras na polpa celulósica, menor é sua viscosidade
- Alvura, avalia-se a brancura e eficiência do branqueamento da polpa celulósica

1.7. Considerações sobre a produção industrial de enzimas e biorreatores

A produção industrial de enzimas ocorre principalmente por meio de fermentação submersa (em meio líquido), o qual envolve o crescimento de micro-organismos em um meio rico e com elevadas concentrações de oxigênio. O desenvolvimento de tecnologias de

fermentação em grande escala possibilitou o aumento da produção de enzimas microbianas nas indústrias de biotecnologia. Os processos de fermentação mais utilizados para a produção são o contínuo e em batelada alimentada, sendo o primeiro deles caracterizado por um sistema fechado sem adição de substrato, e o segundo por adição periódica de substrato. Parâmetros operacionais como temperatura, taxa de alimentação, formação de dióxido de carbono, consumo de oxigênio e pH são medidos e controlados de modo a otimizar os processos de fermentação (ALVES, 2010).

Os biorreatores são equipamentos usados para converter matérias-primas em produtos, utilizando micro-organismos, células animais ou vegetais. Estes instrumentos visam proporcionar as condições mais adequadas e constantes de temperatura, pH, concentração de substrato, vitaminas, sais minerais e oxigênio para que os micro-organismos e células cresçam e produzam metabólitos de interesse. Cada vez mais, modernos biorreatores têm sido construídos com sistemas de controle para todas as variáveis de processo e com um enorme número de acessórios (ALVES, 2010).

Muitos tipos de biorreatores são empregados em bioprocessos. O mais utilizado é o tanque agitado. A primeira aplicação data dos anos de 1940, quando foi utilizado durante a II Guerra Mundial para a produção do antibiótico penicilina por meio de cultivo aeróbico (ALVES, 2010).

O BioFlo 310 - New Brunswick (**Figura 14**), é um exemplo de biorreator presente no mercado, utilizado em laboratórios de pesquisa e indústrias. Sua capacidade de produção é de 3,3 a 5 litros, sendo o pré-inóculo do micro-organismo correspondente a 5 – 10% do volume final. Este biorreator tem como parâmetros controláveis a D.O. (Dissolved Oxygen), pH, temperatura, agitação, fluxo de gás, oxigenação, entre outros.

Figura 14. Biorreator: BioFlo 310 - New Brunswick. Modelo disponível no laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, do Departamento de Biologia da FFCLRP – USP.

II. Objetivos

Diante do grande potencial de aplicação de enzimas nas indústrias, este trabalho teve como objetivo principal o estudo dos sistemas xilanolíticos, celulolíticos, amilolíticos e lignolíticos produzidos por fungos selecionados utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono, com subsequente otimização da produção de um coquetel enzimático para aplicação no processo de biobranqueamento da polpa marrom, resíduos lignocelulósicos e papel reciclado.

Objetivos específicos:

- Screening de fungos produtores de xilanase, amilase, CMCase, FPase, avicelase, β -glucosidase;
- Screening da fonte de carbono (bagaço de cana de açúcar, bagaço de cevada e lodo branco);
- Determinação do melhor meio e tempo de cultivo para cada enzima;
- Estudo da produção enzimática em condições estática ou sob agitação;
- Otimização, por meio de um delineamento experimental, da concentração da fonte de carbono e temperatura dos meios de cultivo;
- Produção de lacase;
- Caracterização enzimática: efeito do pH, temperatura e íons;
- Otimização da produção de um coquetel enzimático para aplicação no biobranqueamento da polpa marrom;
- Aplicação do coquetel enzimático no bagaço de cevada, bagaço de cana de açúcar e papel reciclado de escritório;
- Produção em larga escala de lacase em biorreator.

III. Material e Métodos

III.1. Micro-organismos utilizados

Foram testados 13 fungos presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras-USP de Ribeirão Preto – SP, quanto à produção de xilanase, amilase, CMCase (endocelulase), avicelase (exocelulase), FPase (exo e endocelulases) e β -glucosidase. Os micro-organismos testados, com sua respectiva identificação, foram: *Aspergillus unguis* (CFF 1), *Neosartorya glabra* (CFF 51), *Trichoderma asperellum* (CFF 116), *Aspergillus thermomutatus* (CFF 69), *Eurotium chevalieri* (CFF 109), *Penicillium crustosum* (CFF 106), *Acremonium roseolum* (CFF 21), *Talaromyces pinophilus* (CFF 119), *Aspergillus versicolor* (CFF 158), *Aspergillus brasiliensis* (CFF 124), *Fusarium sporotrichioides* (CFF 99), *Fusarium lateritium* (CFF 108) e *Beauveria bassiana* (CFF 74).

III.2. Manutenção dos fungos em laboratório

A manutenção dos fungos em laboratório foi realizada inoculando-se os esporos dos fungos em meios de cultura estéreis compostos de 2 g de ágar, 4 g de BDA (ágar dextrose batata) e 0,2 g de glicose para cada 100 mL de água destilada, autoclavados a 1,5 atm, por 20 minutos. Foram realizados repiques periódicos mantendo-se os fungos em estufa a 30°C, por aproximadamente 5 dias, conservando as cepas em geladeira por um período de até 30 dias.

III.3. Pré-seleção de micro-organismos produtores de xilanase, amilase, CMCase, avicelase, FPase e β -glucosidase em fermentação submersa

Para a pré-seleção dos fungos produtores de enzimas, culturas líquidas (Fermentação submersa – FSbm) foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de uma solução de esporos (10^6) em 25 mL de meio em cultivo Segato Rizzatti (SR) (RIZZATTI *et al.*, 2001) (ANEXO I) contidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os meios foram suplementados com bagaço de cevada como fonte de carbono (resíduo) 1%, e incubados a 30°C, sem agitação, por 144 horas. A esterilização dos meios de cultivo ocorreu em autoclave, a 1,5 atm por 20 minutos.

Também foi realizado um teste de coprodução enzimática por *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus brasiliensis* (com 10^3 esporos de cada micro-organismo em 25 mL de meios de cultivo SR contidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL), sob as mesmas condições de cultivo

anteriores (FSbm, por 96 horas, a 30°C, estático, com bagaço de cevada como fonte de carbono 1%). Culturas obtidas na fermentação submersa foram filtradas a vácuo em funil de Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células e um micélio. O filtrado foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas extracelulares.

III.4. Otimização da produção enzimática

III.4.1. Screening da fonte de carbono

Definido os melhores produtores de cada enzima estudada, foi realizado um screening entre três diferentes fontes de carbono, para se verificar qual delas atuava como um melhor indutor enzimático nos micro-organismos selecionados. Dentre essas fontes de carbono estavam o bagaço de cevada, bagaço de cana-de-açúcar e lodo branco (livre de carbonato de cálcio).

O bagaço de cevada foi cedido pela cervejaria Colorado de Ribeirão Preto – SP. O bagaço de cana de açúcar, moído e lavado, foi gentilmente fornecido pela usina Guarani (São Paulo, Brasil).

O lodo branco foi cedido pela Indústria de Papel e Celulose International Paper do Brasil, Unidade de Luiz Antônio – SP. A amostra foi autoclavada para se evitar a proliferação de micro-organismos e armazenada em câmara fria dentro de sacos de polietileno.

III.4.2. Seleção do melhor meio de cultivo e tempo de produção

Definido os melhores produtores enzimáticos e a melhor fonte de carbono para produção de cada enzima em estudo, foram realizados testes visando a otimização desta produção. Foram testados diferentes meios de cultura: SR, Adams (ADAMS, 1990), Vogel (VOGEL, 1964), Czapeck (WISEMAN, 1975) e Meio 5 (M5) (PERALTA *et al.*, 1990) (ANEXO I). Posteriormente estudou-se o tempo de crescimento do micro-organismo necessário para maior produção enzimática; para isto foi verificada a cada 24 horas, durante um período de 168 horas, a atividade enzimática respectiva de cada cultivo.

III.4.3. Otimização da concentração da fonte de carbono e temperatura por planejamento experimental e análise de superfície de resposta

Foi realizado um planejamento experimental e análise de superfície de resposta, avaliando o efeito da concentração da fonte de carbono e temperatura de cultivo para produção de xilanase, amilase, CMCase, avicelase, FPase e β -glucosidase. Para cada uma destas enzimas, os níveis das variáveis independentes foram definidos de acordo com um planejamento experimental completo e um conjunto de 12 experimentos foi realizado, quatro dos quais foram repetições dos pontos centrais. A resposta para as variáveis, onde Y é a atividade enzimática relativa, pode ser aproximada pelas equações polinomiais **Equação 1a**, a qual representa o modelo de primeira ordem e **1b**, a qual representa o modelo de segunda ordem.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1a)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1b)$$

Onde β_0 é a intercepção, β_1 e β_2 são os coeficientes de primeira ordem do modelo, β_{12} é o coeficiente entre produtos, X_1 e X_2 são as variáveis independentes. Neste caso, X_1 é a variável concentração da fonte de carbono e X_2 é a temperatura. Um teste *t* de Student foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão. O software Statistica v.13.0 foi usado para analisar os dados experimentais.

III.5. Produção de lacase

Para produção de lacase a partir do basidiomiceto *Trametes versicolor*, diferentes meios de cultura foram testados. Meios de cultura líquida com 25 mL de meio SR contidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram suplementados com bagaço de cevada, bagaço de cana de açúcar ou lodo branco como fonte de carbono (resíduo) 1%, e incubados a 30°C, sem agitação, por 15 dias. Outra metodologia testada para produção de lacase ocorreu segundo Kahraman & Gurdal (2002) com algumas modificações, onde culturas líquidas contendo 25 mL de vinhaça e água destilada (1:5 v/v) em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram suplementados com 2% de hastes de algodão. Também foi testado a produção de lacase em meios (Erlenmeyer de 125 mL)

contendo 25 mL de vinhaça e água destilada (1:5 v/v) e algodão 1% ou ainda contendo apenas vinhaça (100%). Em todos os experimentos, os meios foram incubados a 30°C, sem agitação, por 15 dias.

A vinhaça utilizada foi coletada na Usina Biosev – Leme/SP.

O inóculo dos meios de cultivo ocorreu mediante separação e captura (com auxílio de um palito previamente autoclavado) do micélio crescido no pré-inóculo, o qual era composto por 25 mL de meio SDB (Sabouraud Dextrose Broth) (ANEXO II) inoculado com 4 cm² de micélio do *Trametes versicolor* em Erlenmeyer de 125 mL.

Culturas obtidas na fermentação submersa foram filtradas a vácuo em funil de Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células e um micélio. O filtrado foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas extracelulares.

III.6. Dosagens enzimáticas

As condições de ensaio e os substratos para dosagens das atividades de CMCase, avicelases, FPases, xilanases, pectinases, amilases, arabinanases, mananases, β -glucanases, arabinofuranosidases, celobiohidrolases, β -xilosidases, β -glucosidase e lipases encontram-se descritas na **Tabela 2**.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados a 50°C e em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. CMCase, avicelase, FPase, xilanase, pectinase, amilase, arabinanase, β -glucanase e mananase foram dosadas a partir de seus substratos naturais (**Tabela 2**). As misturas (ensaio enzimático + DNS) foram fervidas a 100°C por 5 minutos, posteriormente, após resfriado os tubos, foi adicionado 1 mL de água destilada a cada mistura e uma alíquota de 100 μ L foi retirada para a leitura em espectrofotômetro a λ 540 nm. Controles com a enzima fervida foram incluídos em cada experimento. A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Foram utilizadas curvas padrões de glicose (1 mg/mL) para as celulasas, amilases, β -glucanase; xilose (1mg/mL) para as xilanases; arabinose (1mg/mL) para arabinanases; manose (1 mg/mL) para mananase e ácido monogalacturônico (1mg/mL) para pectinases. β -glucosidase, β -xilosidase, arabinofuranosidase, lipase e celobiohidrolase foram dosadas a partir de substratos artificiais (**Tabela 2**). A unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um μ mol do substrato em um minuto por mL. Foram utilizadas curvas padrões de p-

nitrofenol (0,014 $\mu\text{mol/ mL}$). As reações foram incubadas em banho termostático a 50°C durante 5 minutos e foram interrompidas pela adição de 50 μL de solução Na_2CO_3 0,2 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a λ 405 nm. A lacase foi dosada a partir do substrato seringaldazina e ABTS. A mistura de reação utilizando o primeiro destes substratos foi composta de 0,6 mL de extrato bruto, 0,1 mL de tampão acetato de sódio pH 5,5, 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de seringaldazina (0,1% em etanol). A oxidação da seringaldazina ($\epsilon_{525} = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) até quinona foi acompanhada durante 5 min a 525 nm (SZKLARZ *et al.*, 1989). A dosagem com 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) como substrato, ocorreu mediante 0,9 mL da mistura de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 com solução de ABTS 0,03 % (p/v) e 0,1 mL de solução enzimática bruta (BUSWELL *et al.*, 1995). A oxidação do ABTS foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, utilizando o $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS & PAICE, 1988). A dosagem da α -glucuronidase ocorreu mediante o manual do fabricante do Kit Megazyme – D-glucuronic acid & D-galacturonic acid.

Tabela 2. Resumo das dosagens enzimáticas

Enzima	Substrato	Concentração de substrato	Volume de substrato (µL)	Tempo de reação (min)	Volume de extrato (µL)	Volume de tampão (µL)
Xilanase ^a	xilana beechwood (madeira de faia)	1 %	50	10	50	-
Amilase ^a	amido solúvel de batata Reagen	1 %	50	10	50	-
FPase ^a	papel filtro Whatman n°1 (celulose)	0,044 g/mL	-	60	250	250
CMCase ^a	carboximetilcelulose média viscosidade	1 %	50	60	50	-
Avicelase ^a	avicel (celulose microcristalina)	1 %	50	60	50	-
Arabinanase ^a	Arabinana linear	1%	50	10	50	-
Pectinase ^a	Ácido poligalacturônico (sal sódico)	1%	50	10	50	-
Mananase ^a	Alfarroba (Locust Bean Gun)	0,5%	10	5	5	-
β-glucanase ^a	β-glucano	1%	25	15	10	15
β-glucosidase ^b	pNPG ¹	4 mM	25	5	10	15
Arabinofuranosidase ^b	pNPA ²	2 mM	25	5	5	20
Celobiohidrolase ^b	pNPC ³	18 mM	25	5	5	20
β-xilosidase ^b	pNPX ⁴	18 mM	25	5	5	20
Lipase ^b	pNPP ⁵	8 mM	25	5	10	15

^a Enzimas dosadas a partir da metodologia de Miller (1959)

^b Enzimas dosadas a partir de seus substratos artificiais

¹ p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo

² p-nitrofenil-α-L -arabinofuranosídeo

³ p-nitrofenil-β-D-celobiosídeo

⁴ p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo

⁵ p-nitrofenilpalmitato

III.7. Determinação de Proteínas

A quantificação de proteína dos extratos enzimáticos decorreu por meio de Coomassie Brilliant Blue G-250 de acordo com a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a λ 595 nm, e a unidade proteica foi definida como mg de proteína por mL (mg/mL).

III.8. Caracterização bioquímica da xilanase, celulasas, amilase e lacase

III.8.1. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi analisado a partir de seu respectivo extrato bruto. As dosagens se procederam incubando as enzimas com seus respectivos substratos de 30 - 70°C.

A estabilidade térmica de cada enzima foi determinada a partir da incubação a 40, 50, 60 ou 70°C, dependendo da enzima, por até 24 horas. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 e 1440 minutos de incubação, com posterior dosagem da atividade enzimática.

III.8.2. Efeito do pH

A influência do pH sobre cada atividade enzimática foi verificada, variando-se o pH da reação entre 4,0 e 8,5 (com intervalos de 0,5). Os tampões utilizados foram: acetato de sódio (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5), citrato-fosfato (McILVAINE, 1921) (pH 6,0; 6,5) e Tris HCl (7,0; 7,5; 8,0; 8,5).

A estabilidade ao pH foi avaliada incubando-se cada enzima em tampão citrato-fosfato McIlvaine, em pH 2,5 a 8,0 (com intervalos de 0,5) por 24 horas, na proporção de 1:1 (enzima/tampão). Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram submetidas a seus respectivos ensaios enzimáticos.

III.8.3. Influência de compostos iônicos e EDTA na atividade enzimática

Com o intuito de avaliar quais compostos influenciam na atividade de cada enzima em estudo, EDTA e diferentes íons foram testados: NaCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, CoCl₂, CaCl₂, AlCl₃, Cl₂Fe, MnCl₂, ZnSO₄, AgNO₃, MgCl₂, BaCl₂, HgCl₂, CuCl₂.

A concentração final de cada composto testado foi 5 mM, acrescentados à reação. As reações enzimáticas foram realizadas conforme o **item III.6.**

III.9. Caracterização dos extratos enzimáticos em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis utilizados apresentavam a concentração de 10% de acrilamida e foram polimerizados em placas de vidro (7,2 x 10,2 cm). As amostras foram ressuspensas em 20 µL em tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,002%, Tris 0,12M, pH 6,75 e β-mercaptoetanol 10%) e aquecidas durante 5 minutos em água fervente. As eletroforeses foram realizadas em tampão composto por Tris 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, pH 8,3, durante 1-2 horas sob corrente de 40 mA e 120 V. Foram utilizados marcadores moleculares de 10 a 250 kDa Precision Plus Protein™ Standards da Bio-Rad. Após a corrida os géis foram corados com Blue Silver com 15% de ácido fosfórico (ANEXO III).

III.10. Tratamento enzimático da polpa celulósica

III.10.1. Polpa marrom

Para realização dos testes de aplicação do extrato enzimático foi utilizada a “polpa marrom”, a qual foi cedida pela empresa Fibria (Aracruz – ES).

Segundo a empresa, a polpa marrom concedida foi formada após processo de digestão (cozimento). Neste processo, os digestores foram preenchidos com cavacos e licor. O conteúdo foi aquecido de acordo com programa pré-estabelecido, sendo que o cozimento foi mantido a temperatura máxima (148-150°C) por cerca de 5 horas em pH 10-11,0 para completa reação de cozimento. Após a digestão, o conteúdo foi descarregado sob pressão em tanques, onde os

cavacos amolecidos foram desintegrados em fibras. A polpa cozida foi então separada do licor residual originando a polpa marrom, cujo número Kappa estava em 9,0 pontos.

III.10.2. Determinação da consistência da polpa celulósica

A polpa marrom foi lavada em água destilada e desagregada, utilizando um “mixer”. Após a desagregação, a consistência do material foi determinada. A consistência é a porcentagem de massa absolutamente seca a partir do material úmido. O objetivo desse procedimento é conhecer esse percentual, cujo valor é utilizado no preparo da polpa para o tratamento enzimático. Para isto, uma pequena quantidade da amostra foi transferida para a placa da balança de umidade do tipo “Moisture Analyzer” produzida pela A&D Weighing. A placa com a amostra foi colocada na balança onde realizou-se a secagem da amostra a 160°C, por 25 minutos, quantificando a porcentagem de massa seca.

III.10.3. Seleção dos extratos enzimáticos

Para o tratamento da polpa marrom foram utilizados coquetéis enzimáticos produzidos a partir dos extratos brutos obtidos nas fermentações submersas deste trabalho e um extrato bruto otimizado paralelamente pelo Paulo R. Heinen, doutorando do laboratório de Microbiologia e Biologia celular sob orientação do Professora Maria de Lourdes Polizeli, para produção de xilanase por *Aspergillus tamarii* Kita. Este extrato, aqui denominado como TKADAMS, foi produzido em meio ADAMS e água destilada (3:1 v/v), com bagaço de cevada (2,912%) como fonte de carbono, com 129 horas de cultivo estático a 30°C.

Primeiramente foi testado o efeito individual de cada extrato bruto sobre a redução do número Kappa da polpa marrom. Para isso, 30 mL de cada extrato e 20 mL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,5 foram adicionados a sacos de polietileno de 20 x 30 cm contendo 4 g de polpa de celulose. O tratamento ocorreu por 48 horas, a 50°C e a análise do número Kappa decorreu segundo a metodologia descrita no **item III.11.** após lavagem das polpas com água de torneira em abundância.

III.10.4. Efeito de diferentes proporções entre os extratos TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom

A partir de um planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta foi analisado a redução do número Kappa da polpa de celulose quando tratada com diferentes proporções dos extratos TKADAMS e da lacase. Foi realizado um conjunto de 12 experimentos, quatro dos quais foram repetições dos pontos centrais. Os tratamentos ocorreram em sacos de polietileno (20 x 30 cm), por 48 horas a 50°C. Para cada 4 gramas de polpa marrom, adicionou-se: (i) extrato TKADAMS (o qual continha 30 U/mL de xilanase), (ii) extrato bruto da lacase (contendo 1 U/mL desta enzima) e (iii) tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5. O volume de cada extrato adicionado variou conforme cada experimento, como mostra a **Tabela 3**, sendo o volume de tampão adicionado em q. s. p. 50 mL.

Tabela 3. Ensaios utilizados para a construção do planejamento

Experimento	Volume extratos enzimáticos (mL)	
	TKADAMS	Lacase
1	8,3 (-1)	5 (-1)
2	18,3 (+1)	5 (-1)
3	8,3 (-1)	15 (+1)
4	18,3 (+1)	15 (+1)
5	6,25 (-1,41)	10 (0)
6	20,35 (+1,41)	10 (0)
7	13,3 (0)	2,95 (-1,41)
8	13,3 (0)	17,05 (+1,41)
9	13,3 (0)	10 (0)
10	13,3 (0)	10 (0)
11	13,3 (0)	10 (0)
12	13,3 (0)	10 (0)

Os valores codificados das variáveis estão entre parênteses

A resposta para as variáveis, onde Y é a redução do número Kappa, pode ser aproximada pela equação polinomial **Equação 1** (descrita no **item III.4.3**), onde X₁ é o volume do extrato TKADAMS e X₂ é correspondente ao volume do extrato da lacase.

Um teste *t* de Student foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão. O software Statística v.13.0 foi usado para analisar os dados experimentais.

III.10.5. Tempo de tratamento

Analizada a melhor proporção dos extratos otimizados para xilanase e lacase quanto a redução do número Kappa, verificou-se qual o melhor tempo de tratamento, 24 ou 48 horas. Para isso, polpas de celulose marrom foram tratadas com a melhor proporção das enzimas a 50°C nos dois tempos determinados. Posteriormente ao tratamento, as polpas foram lavadas com água de torneira em abundância e submetidas ao teste do número Kappa (descrito no **item III.11**).

III.10.6. Efeito da temperatura e pH sobre a redução do número Kappa

Foi realizado um planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta, onde as variáveis independentes foram pH e temperatura e a variável dependente foi a redução do número Kappa das amostras de polpa celulósica tratadas. Os níveis das variáveis independentes foram definidos de acordo com um planejamento experimental completo e um conjunto de 12 experimentos foi realizado, quatro dos quais foram repetições dos pontos centrais (**Tabela 4**). Neste experimento foram utilizados os tampões acetato de sódio 100 mM para os experimentos com pH entre 4 e 6,0 e tampão ácido cítrico 100 mM para os experimentos com pH 3,6 e 6,4.

A resposta para as variáveis, onde Y é a redução do número Kappa, pode ser aproximada pela equação polinomial **Equação 1** (descrita no **item III.4.3**).

Tabela 4. Ensaios utilizados para a construção do planejamento envolvendo pH e temperatura

Experimento	Variáveis independentes	
	pH	Temperatura (°C)
1	4 (-1)	40 (-1)
2	6 (+1)	40 (-1)
3	4 (-1)	60 (+1)
4	6 (+1)	60 (+1)
5	3,59 (-1,41)	50 (0)
6	6,41 (+1,41)	50 (0)
7	5 (0)	35,9 (-1,41)
8	5 (0)	64,1 (+1,41)
9	5 (0)	50 (0)
10	5 (0)	50 (0)
11	5 (0)	50 (0)
12	5 (0)	50 (0)

Os valores codificados das variáveis estão entre parênteses

Neste planejamento, X_1 é a variável pH e X_2 é a temperatura. Um teste t de Student foi utilizado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão. O software

Statistica v.13.0 foi usado para analisar os dados experimentais.

III.10.7. Controle para análise dos experimentos de aplicação enzimática

Os resultados obtidos nos tratamentos foram comparados com análises das amostras de polpa marrom sem tratamento (controle) com o mesmo pH.

III.11. Determinação do número Kappa em pasta química de madeira

Número Kappa é uma grandeza empírica que permite avaliar o teor de lignina em uma pasta química de madeira (Método TAPPI “Technical Association of the Pulp and Paper Industry” - T 236 cm - 85 - modificado para 50 mL de permanganato de potássio). Quatro gramas de polpa de celulose foram transferidas para um béquer contendo 400 mL de água destilada, 50 mL de permanganato de potássio 0,02 M e 50 mL de ácido sulfúrico 4 M. Após 5 minutos de reação, a temperatura foi anotada e após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de iodeto de potássio 1 M. A titulação foi realizada com tiosulfato de sódio 0,1 M até a mudança de cor da solução para amarelo claro. Posteriormente, foram adicionadas algumas gotas de solução de amido 1% (atuando como indicador de coloração) e a titulação continuou até a mudança da cor para incolor. Foi realizada a determinação do branco sem polpa, utilizando-se água destilada, e seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Para calcular o valor do número Kappa foi utilizada a **Equação 2**.

$$\text{Número Kappa} = P \times FP \times FT / 2 \times Ms \quad (2)$$

Onde:

$$Ms = Mu \times \text{Consistência} / 100$$

$$P = (Vb - Va) \times 2$$

Mu: massa úmida (g);

Ms: massa absolutamente seca (g);

P: volume de permanganato de potássio 0,1 M (mL);

FP: fator de correção para um consumo de 50% de permanganato de potássio (ANEXO IV)

FT: fator de correção da temperatura (ANEXO V)

Va: volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

Vb: volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL);

O número Kappa é um indicador do conteúdo de lignina ou branqueabilidade da polpa. Nesta técnica, a polpa desintegrada reage com uma quantidade específica de permanganato de potássio por determinado tempo.

As principais reações são:

1) lignina residual + outros componentes oxidáveis + $\text{MnO}_4^- + 4\text{H}^+ \rightarrow$ lignina oxidada + outros compostos oxidados + excesso de $\text{MnO}_4^- + \text{MnO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

2a) $2\text{MnO}_4^- + 10\text{I}^- + 16\text{H}^+ \rightarrow 2\text{Mn}^{2+} + 5\text{I}_2 + 8\text{H}_2\text{O}$

2b) $\text{MnO}_2 + 4\text{H}^+ + 2\text{I}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{I}_2$

4) $2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{I}_2 \rightarrow \text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 2\text{I}^-$

Quando a reação de oxidação do permanganato termina e o iodeto de potássio é adicionado, o iodo livre formado nas reações é titulado com solução de tiosulfato de sódio. O valor assim obtido é corrigido para 50% de consumo da capacidade de oxidação total do permanganato (FP) (ETHIOPIAN STANDARD, 2012).

III.12. Determinação da alvura da polpa celulósica

Este estudo foi realizado no laboratório da Indústria de Papel e Celulose International Paper do Brasil, Unidade de Luiz Antônio – SP.

Para o ensaio, foram utilizados somente reagentes de grau analítico reconhecido e água destilada ou de igual pureza, livre de materiais coloridos e íons ferro e cobre.

Foi requerida uma quantidade suficiente de celulose para formar no mínimo quatro folhas de ensaio, de gramatura aproximada de 200g/m^2 (calculado sob base seca em estufa). Para preparação das folhas de ensaios, foi colocado em um béquer uma quantidade suficiente de amostra para formar uma folhinha, adicionado 1 mL de solução de EDTA 5g/L, e homogeneizada a suspensão de celulose. O pH da suspensão de celulose foi ajustado entre 4,0 e 5,5. A alvura da celulose não branqueada é afetada pelo pH. Por esta razão, a medida de alvura deve ser realizada sob folhas de ensaios formadas de suspensões com pH entre 4,0 e 5,5.

A suspensão de celulose foi colocada no funil de Büchner, montado com tela de aço e papel de filtro, e em seguida foi acionado o sistema de vácuo para a formação da folhinha. A folhinha foi retirada do funil e foram colocadas 2 folhas de papel mata-borrão, na face inferior e na face superior, 3 folhas de papel filtro, uma placa de fórmica e 2 folhas de papel mata-

borrão. As folhas foram prensadas por aproximadamente 120 segundos a $\pm 0,35$ Mpa, retiradas dos papéis mata-borrão e levadas a estufa, com circulação de ar forçada a $75 \pm 5^\circ\text{C}$ por 20 minutos. Após a secagem, foi retirado o papel de filtro da amostra. Esta foi dobrada ao meio e outra vez em um quarto, e cortada com auxílio de uma tesoura para se obter 4 folhinhas com tamanho suficiente para cobrir a área média de medição.

Expressou-se o fator de reflectância intrínseca média da celulose em percentagem, com aproximação de 0,5% do fator de reflectância conforme Norma ISO 2469-1980, determinação do fator de reflectância no azul difuso (alvura ISO) da celulose, nos aparelhos Datacolor Elrepho 2000, 3000 e SE 070R.

III.13. Determinação da viscosidade da polpa celulósica

A determinação da viscosidade intrínseca da celulose em solução de etilenodiamina (CED) diluída ocorreu no laboratório da Indústria de Papel e Celulose International Paper do Brasil, Unidade de Luiz Antônio – SP. As amostras foram analisadas utilizando-se um viscosímetro de tubo capilar equipado com um registro automático de tempo: aparelho viscosímetro Viscomat – 32020/ZW (Norma SCAN C15: 88 e TAPPI T 230).

A viscosidade da solução amostra e do solvente foi determinada medindo-se o tempo de efluxo para um volume específico de líquido. A viscosidade intrínseca foi calculada a partir da **Equação 3** (WETZEL *et al.*, 1953).

$$\text{Log } \eta_{\text{rel}} - 1 / c = \text{Log } [\eta] + K [\eta]c \quad (3)$$

Onde:

K: constante com valor 0,13

η_{rel} : η / η_0

η : viscosidade da solução teste

η_0 : viscosidade do solvente

c: concentração da polpa

III.13.1. Preparação da amostra para teste de viscosidade relativa

Uma folha de celulose foi preparada passando-se uma quantidade de polpa diluída com água através de papel filtro e funil de Büchner suficiente para cobrir todo o papel de filtro com

uma camada fina de celulose. A folha foi colocada na estufa a 105°C por 30 minutos para secagem total. A folhinha foi ambientada em dessecador.

Foram retiradas pequenas peças da amostra para determinar o conteúdo de material seco (consistência). Para a determinação da viscosidade intrínseca, pesou-se em um frasco de dissolução a quantidade de amostra indicada na **Tabela 5**.

Tabela 5. Quantidade de amostra por faixa de viscosidade

Viscosidade intrínseca [η] mL/g	Quantidade de amostra mg (base seca)
400 – 600	± 250
651 – 850	± 200
851 – 1100	± 150
1101 – 1400	± 120

Adicionou-se 25 mL de água destilada usando uma pipeta, e foram colocadas algumas peças de fio de cobre para ajudar na dissolução de grumos. Fechou-se o frasco e este foi agitado utilizando um dispositivo de agitação até a celulose estar completamente desagregada (30 minutos). Com uma pipeta, adicionou-se 25 mL de solução CED, e agitou-se o frasco novamente no dispositivo de agitação até a amostra estar completamente dissolvida.

A temperatura da solução de ensaio e do viscosímetro foi ajustada a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Drenou-se uma porção da solução para dentro do viscosímetro por sucção e permitiu-se a solução drenar. Quando o volume alcançou a marca de menisco superior, iniciou-se a marcação do tempo com o cronômetro. O tempo de efluxo foi o tempo entre o menisco superior e o menisco inferior. Para isso, suspendeu-se o frasco de amostra embaixo do tubo do viscosímetro de modo que o final do tubo estivesse abaixo da superfície da solução. Girou-se a válvula no topo do tubo para permitir a sucção para cima, dentro do viscosímetro. Girou-se a válvula a um ângulo de 90° para desconectar o vácuo. A medida então foi iniciada quando o nível da amostra passou no eletrodo inferior. O Viscomat contém um programa que calculou a viscosidade, baseado sobre o tempo de efluxo e fatores de calibração.

III.14. Estudo de Microscopia eletrônica de varredura

Este estudo foi realizado no laboratório de Microscopia Eletrônica no Departamento de Biologia Celular e Bioreagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Os materiais, polpa controle e polpa marrom tratada com coquetel enzimático, foram secos em estufa a 45°C durante uma noite. Posteriormente, foram montados em um stub metálico com fita adesiva condutora.

A análise do material ocorreu em Microscópio eletrônico Jeol JSM6610LV.

III.15. Aplicação do coquetel enzimático no bagaço de cana de açúcar, bagaço de cevada e no papel reciclado (de escritório)

Após o estudo e otimização do coquetel enzimático para o tratamento e consequente redução do número Kappa da polpa marrom, este foi aplicado aos resíduos bagaço de cana e cevada e papéis reciclados (papel de escritório).

Cada 4 gramas de bagaço ou papel reciclado foram tratadas sob as condições padronizadas do coquetel em sacos de polietileno 20 x 30 cm.

A análise do efeito dos tratamentos enzimáticos sobre o papel reciclado foi realizada por análise da diferença de coloração, enquanto os resultados obtidos do tratamento sobre os bagaços ocorreram mediante dosagem de açúcar redutor (mg/mL) – metodologia de Miller (MILLER, 1959), utilizando uma curva padrão de glicose e xilose (1 mg/mL).

III.16. Fermentação em Biorreator para produção de lacase por Trametes versicolor

A primeira fase do experimento realizado considerou a fermentação em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultura. Os meios de cultura foram compostos por vinhaça e água destilada (1:7 v/v), algodão (1%) e peptona (0,1%) inoculados com pré-inóculo de *Trametes versicolor*, o qual foi produzido como descrito no **item III.5**. Os Erlenmeyer foram incubados a 30°C, sob condição estática durante 12 dias, sendo a cada 24 horas verificada a atividade enzimática, produção de proteínas, pH e massa seca.

A segunda fase do experimento considerou a fermentação em biorreator. Para produção da enzima lacase pelo *Trametes versicolor* foi utilizado o biorreator BioFlo 310 - New Brunswick (**Figura 15**). Este biorreator apresenta uma dorna de vidro, com capacidade nominal de 5 litros e tampa de aço inox. Para medir oxigênio dissolvido durante o cultivo, o biorreator possui um eletrodo de vidro esterilizável, assim como um termômetro acoplado internamente para medir a temperatura. O conteúdo da dorna foi aquecido com o auxílio de uma manta

elétrica localizada na base do biorreator e o controle ocorreu por meio do resfriamento com circulação de água acoplada a um banho maria a 20°C.

Figura 15. Fermentação do *Trametes versicolor* no biorreator BioFlo 310 - New Brunswick presente no Laboratório de Microbiologia e Biologia celular do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP.

Neste experimento, o volume de trabalho foi de 3300 mL, operando em batelada simples. A temperatura de fermentação foi mantida em 30°C, estática e sem controle do pH. A aeração de 3,3 v.v.m., foi realizada por injeção contínua de ar comprimido filtrado por meio de um filtro estéril e a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada por meio de um controlador de DO com variação de 0 a 100%.

O meio de cultura foi composto por vinhaça e água destilada (1:7 v/v), algodão (1%) e peptona (0,1%), previamente esterilizado junto ao biorreator, em autoclave, a 121°C por 30 minutos. Ao meio de cultivo foram adicionados 330 µL de antiespumante. Para a preparação do inóculo foram feitos 16 pré-cultivos de *Trametes versicolor* em meio SDB, os quais foram produzidos como descrito no **item III.5**. Estes pré-inóculos foram adicionados ao biorreator por meio de um funil de alumínio previamente estéril.

A fermentação decorreu por 14 dias sendo que a cada 24 horas foi verificada a atividade enzimática, produção de proteínas e pH. A retirada de amostras ocorreu por uma saída própria composta por uma mangueira de silicone em cuja extremidade estava conectado um

amostrador.

A **Figura 16**, ilustra o processo de fermentação em biorreator empregado.

Figura 16. Esquema do processo de fermentação da lacase por *Trametes versicolor* em biorreator.

III.17. Análise dos experimentos e repetibilidade dos ensaios

Todos os experimentos e ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata. Os experimentos foram analisados com base na média e no desvio padrão. Para a análise dos experimentos e representação gráfica foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007.

IV. Resultados

IV.1. Seleção dos micro-organismos produtores

Para a seleção dos micro-organismos a serem utilizados neste trabalho, realizou-se um screening com treze fungos, já identificados e presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da FFCLRP. Inicialmente, para seleção dos fungos produtores enzimáticos, cada um dos 13 micro-organismos foi cultivado em fermentação submersa por 96 horas, a 30°C, em meio SR com bagaço de cevada (1%) como fonte de carbono. Destes cultivos dosaram-se as atividades extracelulares da xilanase, amilase, CMCase (endocelulase), avicelase (exocelulase), FPase (endo e exocelulase) e β -glucosidase e quantificou-se a proteína extracelular do cultivo. Na **Tabela 6**, pode-se observar a produção enzimática de cada fungo.

A maior produção de xilanase foi pelo *Trichoderma asperellum*, seguida pelas produções do *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus versicolor*, as quais foram, respectivamente, 3,4 e 12% menores com relação à primeira. A produção de amilase ocorreu em destaque por *A. versicolor* (3,737 U/mL), seguida pela de *A. brasiliensis* e *Acremonium roseolum*, as quais correspondem a 97% e 93%, respectivamente, da produção em destaque. O melhor produtor de CMCase foi *Aspergillus unguis*, com uma produção de 0,100 U/mL, seguido pelo *A. versicolor* (2% menor), *A. brasiliensis* (13% menor) e *Aspergillus thermomutatus* (14% menor). Quanto à produção de Avicelase, *Trichoderma asperellum* foi o micro-organismo que se destacou como produtor, seguido pelo *A. versicolor*, o qual produziu o correspondente a 64% da maior atividade encontrada e *A. thermomutatus* que produziu 60%. *A. versicolor* foi o maior produtor de FPase (0,095 U/mL), seguido por *A. thermomutatus*, o qual produziu 35% menos desta enzima. Por fim, *A. versicolor*, *Acremonium roseolum* e *A. brasiliensis* foram os maiores produtores de β -glucosidase, sendo que o primeiro deles apresentou uma produção de 0,928 U/mL, enquanto o segundo e terceiro produziram o correspondente a 87% e 75%, respectivamente.

Aspergillus versicolor foi o micro-organismo em destaque quanto a produção de todas as enzimas de interesse neste estudo. *Aspergillus thermomutatus* destacou-se quanto a produção das celulasas (CMCase, avicelase e FPase), e *Aspergillus brasiliensis*, por sua vez, destacou-se pelas produções de xilanase e amilase. Visto estes resultados, *A. versicolor*, por sobressair-se quanto à produção de todas as enzimas, foi selecionado para continuação dos estudos, assim como *A. brasiliensis*. O fato das xilanases serem importantes para hidrólise das hemiceluloses presentes nas polpas de papel e resíduos industriais, e celulasas serem importantes apenas para

o refino do tratamento destas polpas (uma vez que o intuito é manter uma polpa composta por celulose, livre de lignina e hemicelulose) corroborou para a escolha do *A. brasiliensis* (maior produtor de xilanases) e não *A. thermomutatus* (produtor de celulases) como o segundo micro-organismo para continuação dos experimentos. Adicionalmente, *A. brasiliensis* também apresentou uma boa produção quanto à amilase, a qual pode atuar sobre os aditivos adicionados às pastas durante a sua produção ou sobre os materiais de revestimento utilizados nas etapas de acabamento do papel.

Tabela 6. Produção enzimática dos fungos filamentosos

Fungo filamentoso	Enzimas (U/mL)						Proteína (mg/mL)
	Xilanase	Amilase	CMCase	Avicelase	FPase	β-glucosidase	
<i>A. unguis</i>	1,890±0,050	0,514±0,003	0,100±0,007	0,009±0,001	0,040±0,004	0,220±0,013	0,114±0,001
<i>N. glabra</i>	1,913±0,003	0,655±0,093	0,070±0,011	0	0,054±0,015	0,022±0,002	0,093±0,007
<i>T. asperellum</i>	2,404±0,189	0,325±0,127	0,076±0,020	0,069±0,007	0,050±0,002	0,015±0,001	0,160±0,007
<i>A. thermomutatus</i>	1,877±0,107	2,418±0,293	0,086±0,004	0,041±0,004	0,062±0,003	0,084±0,015	0,186±0,017
<i>E. chevalieri</i>	1,159±0,055	0,155±0,012	0,067±0,015	0,038±0,009	0,019±0,002	0,014±0,004	0,104±0,013
<i>P. crustosum</i>	1,781±0,155	0,455±0,099	0,066±0,016	0,030±0,003	0,027±0,001	0,041±0,013	0,062±0,002
<i>A. roseolum</i>	1,836±0,037	3,470±0,093	0,070±0,003	0,016±0,008	0,020±0,001	0,810±0,015	0,147±0,001
<i>T. pinophilus</i>	1,640±0,144	0,792±0,042	0,077±0,021	0,016±0,002	0,024±0,001	0,196±0,017	0,108±0,013
<i>F. sporotrichioides</i>	1,945±0,022	0,103±0,036	0,013±0,003	0,020±0,001	0,023±0,001	0,039±0,011	0,137±0,010
<i>F. lateritium</i>	0,800±0,059	0,074±0,012	0,008±0,003	0,001±0,008	0,014±0,002	0,409±0,034	0,124±0,001
<i>B. bassiana</i>	0,109±0,001	0,251±0,066	0	0	0	0	0,055±0,003
<i>A. versicolor</i>	2,122±0,063	3,737±0,069	0,098±0,011	0,044±0,005	0,095±0,121	0,928±0,030	0,132±0,004
<i>A. brasiliensis</i>	2,322±0,048	3,618±0,003	0,087±0,006	0,022±0,004	0,046±0,001	0,693±0,074	0,132±0,015
Cocultivo*	1,772±0,029	2,57±0,024	0,137±0,007	0,042±0,001	0,088±0,003	0,332±0,001	0,356±0,007

Micro-organismos cultivados por 96 horas, a 30°C, estático, com bagaço de cevada como fonte de carbono 1%

* Cocultivo dos micro-organismos *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus brasiliensis*

Selecionados os dois fungos produtores, *A. brasiliensis* e *A. versicolor*, realizou-se um teste de cocultivo (com 10³ esporos de cada micro-organismo), sob as mesmas condições de

cultivo anteriores. O cocultivo destes dois micro-organismos visou mimetizar o ambiente ecológico, onde a competição entre eles poderia provocar a biossíntese de genes silenciados ou super expressar outros. No entanto, nota-se que a coprodução não se mostrou promissora para as produções das enzimas de interesse. Desta forma, os experimentos seguintes partiram de complexos enzimáticos diferentes (de *A. versicolor* e *A. brasiliensis*) o que também é vantajoso, pois com ações complementares, diferentes extratos enzimáticos podem levar a um maior sinergismo de hidrólise sobre as polpas de papel.

Paralelamente ao screening de micro-organismos, testes de produção e caracterização enzimática realizados neste trabalho, o doutorando Paulo R. Heinen também do nosso grupo de pesquisa, desenvolvia sua tese acerca de fungos produtores de xilanase e subsequente caracterização da enzima (**item IV.11**). Resultados obtidos posteriormente levaram-nos a utilização das xilanases do trabalho de Tese supracitado.

IV.2. Seleção da fonte de carbono

Selecionado os micro-organismos de interesse, seguiram-se os experimentos para seleção da melhor fonte de carbono (1%), bagaço de cevada, bagaço de cana de açúcar e lodo branco, para indução da produção das enzimas. A partir da **Figura 17** pode-se observar que dentre os três resíduos agroindustriais testados como indutores enzimáticos, o bagaço de cevada foi aquele que se destacou quanto a produção de todas as enzimas dosadas. Deste modo, *A. brasiliensis* foi o micro-organismo selecionado para produção de xilanase em bagaço de cevada (**Figura 17A**), ao tempo em que *A. versicolor* foi o selecionado para produção de amilase, CMCase, Avicelase, FPase e β -glucosidase (**Figura 17B, 17C, 17D, 17E, 17F**) também em meio contendo bagaço de cevada como fonte de carbono.

Figura 17. Atividades enzimática em diferentes fontes de carbono. Onde, (A) atividade da xilanase, (B) amilase, (C) CMCase, (D) avicelase, (E) FPase, (F) β -glucosidase, (1) bagaço de cevada, (2) bagaço de cana, (3) lodo branco, ■ atividade enzimática produzida por *Aspergillus versicolor* e ■ atividade enzimática produzida por *Aspergillus brasiliensis*. Os micro-organismos foram cultivados em FSbm estática, a 30°C, em meio SR.

IV.3. Seleção do meio de cultivo

Selecionado os micro-organismos e a melhor fonte de carbono para produção das enzimas de interesse fez-se um teste para análise do melhor meio de cultivo. Foram testados os meios SR, Adams, Vogel, Czapeck, M5. Na **Figura 18**, pode-se observar o resultado da produção enzimática em cada meio. A produção de xilanase por *A. brasiliensis* foi em média

62% maior em meio SR quando comparada aos outros 4 meios testados (**Figura 18A**). A produção de amilase por *A. versicolor* (**Figura 18B**) mostrou-se maior em meio SR, embora os meios Adams, Vogel e Czapek também tenham induzido a produção desta enzima pelo micro-organismo, os quais apresentaram uma atividade correspondente a 91, 92 e 87% da produção em SR, respectivamente. O meio M5 por sua vez, apresentou uma produção amilolítica de apenas 47% com relação a em SR. A produção de CMCase por *A. versicolor* (**Figura 18C**) foi 8,6% maior em meio M5 quando comparada com o segundo melhor indutor, o meio Adams. Avicelase de *A. versicolor* (**Figura 18D**) também apresentou uma melhor atividade quando induzida em meio M5, sendo em média 87% maior quando comparada aos outros quatro meios. A produção de FPase por *A. versicolor* (**Figura 18E**) em meio M5 foi 46% maior quando comparada a produção em meio Adams, 63% maior quando comparada a produção em meio Czapek e 77% maior em relação a produção em meio SR. A produção desta enzima em meio Vogel foi reprimida. A atividade de β -glucosidase de *A. versicolor* (**Figura 18F**) nos meios de cultivo SR e Czapek foram as que mais se destacaram dentre os cinco meios testados, sendo o segundo, apenas 6% menor em relação ao meio SR.

Destes resultados encontrados foram selecionados os meios que melhor induziram a produção das enzimas em estudo. Foi selecionado o meio SR para indução da produção de xilanase por *A. brasiliensis*, meio SR para produção de amilase e β -glucosidase de *A. versicolor* e meio M5 para CMCase, Avicelase e FPase de *A. versicolor*.

Figura 18. Atividades enzimáticas relativas em diferentes meios de cultivo. Onde, (A) atividade relativa da xilanase, (B) amilase, (C) CMCase, (D) avicelase, (E) FPase, (F) β-glucosidase, (1) meio Adams, (2) Vogel, (3) M5, (4) SR, (5) Czapek, ■ atividade enzimática produzida por *Aspergillus brasiliensis*, ■ atividade enzimática produzida por *Aspergillus versicolor*. Os micro-organismos foram cultivados em FSbm estática, a 30°C, com bagaço de cevada (1%) como fonte de carbono.

IV.4. Seleção da melhor condição de cultivo: estacionário ou agitado

A agitação do meio também é um parâmetro que influencia a produção enzimática por um micro-organismo. Foi realizado um teste para análise da melhor condição: cultivo estático ou sob agitação (100 rpm). A **Tabela 7**, mostra os resultados encontrados para cada enzima em

estudo, sendo que 100% corresponde a somatória das atividades enzimáticas em cultivo estático e agitado. Nota-se que o cultivo estático foi promissor para a indução das enzimas de interesse produzidas por *A. brasiliensis* e *A. versicolor*.

Tabela 7. Produção enzimática em cultivo estático e sob agitação

Enzima	Atividade relativa (%) em meio de cultivo	
	Estático	Sob agitação
Xilanase	75,4	24,6
Amilase	60,3	39,7
β -glucosidase	66,5	33,5
CMCase	84,2	15,8
Avicelase	63,3	36,7
FPase	69,8	30,2

100% corresponde a somatória das atividades enzimáticas em cultivo estático e agitado. Xilanase foi produzida por *A. brasiliensis* em meio SR, amilase e β -glucosidase de *A. versicolor* em meio SR e CMCase, avicelase, FPase também de *A. versicolor* em meio M5. Ambos os micro-organismos foram cultivados em FSbm, a 30°C, com bagaço de cevada (1%) como fonte de carbono por 96 horas.

IV.5. Produção enzimática em função do tempo de cultivo

Para a determinação do tempo de cultivo em que houvesse maior produção enzimática foi realizado um teste para análise deste parâmetro. Para isto, foi verificada a cada 24 horas, durante um período de 168 horas, a atividade enzimática respectiva de cada cultivo (**Figura 19**).

A partir deste experimento observa-se que o *pool* de produção xilanolítica (**Figura 19A**) ocorreu entre 72 e 144 horas, mantendo em média uma produção de 95%. Amilase produzida por *A. versicolor* (**Figura 19B**) apresentou as maiores produções enzimáticas nos tempos 96, 120 e 144 horas, mantendo uma produção de 83, 100 e 87%. CMCase (**Figura 19C**) apresentou maior atividade em cultivos de 96 a 168 horas, mantendo a produção acima de 92% neste período. Avicelase (**Figura 19D**) apresentou uma faixa ótima de produção entre 120 e 168 horas de cultivo, FPase (**Figura 19E**) apresentou maiores produções por *A. versicolor* em cultivos de 72 a 120 horas e β -glucosidase (**Figura 19F**) apresentou maior atividade em cultivos de 96 a 168 horas.

Visto os resultados, alguns padrões foram estabelecidos de modo a diminuir o número de variáveis, mas que não comprometessem uma boa produção das enzimas. Foi estabelecido que a produção de xilanase ocorreria mediante meio de cultivo produzido por *A. brasiliensis* em meio SR, com 96 horas, amilase e β -glucosidase a partir de cultivo com *A. versicolor* em meio SR, com 120 horas e CMCase, avicelase e FPase a partir de *A. versicolor* em meio M5, com 120 horas.

Figura 19. Produção enzimática em função do tempo de cultivo. Onde, (A) atividade relativa da xilanase, (B) amilase, (C) CMCase, (D) avicelase, (E) FPase, (F) β -glucosidase, ■ atividade xilanolítica produzida por *Aspergillus brasiliensis* em meio SR, ■ atividade enzimática produzida por *Aspergillus versicolor*, sendo amilase e β -glucosidase produzidas em meio SR e

CMCase, Avicelase e FPase produzidas em meio M5. Ambos os micro-organismos foram cultivados em FSbm estática, a 30°C, com bagaço de cevada (1%) como fonte de carbono.

IV.6. Otimização da concentração da fonte de carbono e temperatura por planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta

A concentração da fonte de carbono (bagaço de cevada) e temperatura tem ampla influência na produção enzimática microbiana. Esses dois parâmetros foram investigados de forma conjunta por meio de planejamentos experimentais. Foi realizado um delineamento composto central rotacional para cada enzima em estudo, cujo intervalo de estudo da concentração da fonte de carbono variou de 0,59 a 3,41 gramas e o intervalo da temperatura estabelecido foi de 22,95 a 37,05°C.

Os cultivos para este experimento foram aqueles estabelecidos após o teste de curva de produção enzimática, ou seja, a produção de xilanase ocorreu mediante meio de cultivo produzido por *A. brasiliensis*, com 96 horas de cultivo estático em meio SR; amilase e β -glucosidase a partir de cultivo com *A. versicolor*, com 120 horas de cultivo estático em meio SR e CMCase, avicelase e FPase a partir de *A. versicolor* com 120 horas de cultivo estático em meio M5.

A **Tabela 8** apresenta as atividades enzimáticas obtidas nesse experimento.

Tabela 8. Planejamento de experimentos para avaliar o efeito da concentração do bagaço de cevada (fonte de carbono) e temperatura sobre a atividade das enzimas.

Ensaio	Variáveis		Xilanase	Amilase	CMCase	Avicelase	FPase	β -glucosidase
	Bagaço de cevada (%)	Temperatura (°C)						
1	1 (-1)	25 (-1)	0,875	1,4	0,004	0,084	0,075	0,70
2	3 (+1)	25 (-1)	1,493	2,219	0,095	0,036	0,061	0,609
3	1 (-1)	35 (+1)	1,006	2,395	0,141	0,042	0,162	0,401
4	3 (+1)	35 (+1)	1,912	6,600	0,103	0,064	0,122	0,66
5	0,59 (-1,41)	30 (0)	0,960	1,758	0,022	0,043	0,1	0,395
6	3,41 (+1,41)	30 (0)	2,278	2,80	0,123	0,051	0,09	0,995
7	2 (0)	22,95 (-1,41)	0,769	1,200	0,075	0,050	0,055	0,357
8	2 (0)	37,05 (+1,41)	1,163	2,604	0,043	0,065	0,1	0,699
9	2 (0)	30 (0)	1,733	2,360	0,13	0,100	0,159	0,618
10	2 (0)	30 (0)	1,733	2,281	0,104	0,110	0,154	0,62
11	2 (0)	30 (0)	1,718	2,360	0,129	0,120	0,152	0,607
12	2 (0)	30 (0)	1,720	2,351	0,135	0,115	0,159	0,615

Os valores codificados das variáveis estão entre parênteses

Foram feitas ANOVA para os modelos de primeira e segunda ordens para se verificar qual deles seria estatisticamente significativo. As análises dos resultados, com p de 0,05 esta explicitada nas tabelas seguintes (**Tabela 9 a 14**). Nas tabelas, BC e T correspondem aos valores

codificados da concentração do bagaço de cevada (fonte de carbono) e temperatura, respectivamente.

As **Tabelas 9 a 14** apresentam os resultados de ANOVA dos modelos de primeira e segunda ordem.

Tabela 9. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem da Xilanase

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} GL _R ,GL _r	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,677	3	0,225	2,75	6,59 (F95%; 3,4)	$= 1,523 + 0,381 (BC) + 0,137 (T) + 0,072(BC)(T)$
	Resíduo (r)	0,327	4	0,081			
	Total (T)	1,004	7				
	R ²	0,677					
Segunda ordem	Regressão (R)	2,468	3	0,822	128,732	9,28 (F95%; 3,3)	$= 1,689 + 0,424 (BC) + 0,138 (T) - 0,365 (T)^2$
	Resíduo (r)	0,051	8	0,006			
	Total (T)	2,519	11				
	R ²	0,99					

Tabela 10. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem da Amilase

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} GL _R ,GL _r	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,829	2	0,414	28,58	5,79 (F95%; 2,5)	$= 2,246 + 0,256 (BC) + 0,343 (T)$
	Resíduo (r)	0,072	5	0,014			
	Total (T)	0,902	7				
	R ²	0,91					
Segunda ordem	Regressão (R)	2,633	4	0,658	1053,638	4,12 (F95%; 4,7)	$= 2,327 + 0,312 (BC) + 0,420 (T) - 0,200 (T)^2 - 0,153 (BC)(T)$
	Resíduo (r)	0,004	7	0,0006			
	Total (T)	2,638	11				
	R ²	0,96					

Tabela 11. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem da CMCase

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} GL _R ,GL _r	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,009	2	0,004	5,39	5,79 (F95%; 2,5)	$= 1,105 + 0,036 (BC) - 0,032 (BC)(T)$
	Resíduo (r)	0,004	5	0,014			
	Total (T)	0,013	7				
	R ²	0,68					
Segunda ordem	Regressão (R)	0,008	1	0,008	4,586		$= 0,092 + 0,0245 (BC) - 0,03 (BC)(T)$ *
	Resíduo (r)	0,014	9	0,001			
	Total (T)	0,023	11				
	R ²	0,37					

Tabela 12. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem da avicelase

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} GL _R ,GL _r	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,001	3	0,0004	0,31	6,59 (F95%; 3,4)	$= 0,084 - 0,006 (BC) - 0,003(T) + 0,017(BC)(T)$
	Resíduo (r)	0,006	4	0,0015			
	Total (T)	0,007	7				
	R ²	0,19					
Segunda ordem	Regressão (R)	0,009	3	0,003	41,431	4,07 (F95%; 3,8)	$= 0,111 - 0,030 (BC)^2 - 0,025 (T)^2 + 0,017 (BC)(T)$
	Resíduo (r)	0,0006	8	0,00007			
	Total (T)	0,010	11				
	R ²	0,93					

Tabela 13. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem da FPase

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} GL _R ,GL _r	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,006	3	0,002	1,621	6,59 (F95%; 3,4)	$= 0,130 - 0,013 (BC) + 0,037(T) - 0,006(BC)(T)$
	Resíduo (r)	0,005	4	0,001			
	Total (T)	0,011	7				
	R ²	0,54					
Segunda ordem	Regressão (R)	0,009	3	0,003	41,431	4,07 (F95%; 3,8)	$= 0,155 - 0,025 (BC)^2 + 0,026 (T) - 0,034(T)^2$
	Resíduo (r)	0,0006	8	0,00007			
	Total (T)	0,010	11				
	R ²	0,85					

Tabela 14. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem da β -glucosidase

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} GL _R ,GL _r	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,053	3	0,017	52,621	6,59 (F95%; 3,4)	$= 0,602 + 0,09 (BC) + 0,006 (T) - 0,04 (BC)(T)$
	Resíduo (r)	0,001	4	0,0003			
	Total (T)	0,054	7				
	R ²	0,97					
Segunda ordem	Regressão (R)	0,248	2	0,124	15,287	4,26 (F95%; 2,9)	$= 0,605 + 0,151 (BC) + 0,090 (T) *$
	Resíduo (r)	0,073	9	0,008			
	Total (T)	0,321	11				
	R ²	0,87					

Para as respostas analisadas a atividade enzimática da CMCase e β -glucosidase por meio do planejamento, foi observado que o modelo de segunda ordem não apresentou nenhum coeficiente de regressão elevado ao quadrado estatisticamente significativo a 95% do limite de confiança. No caso da resposta β -glucosidase o modelo de primeira ordem foi estatisticamente

significativo, sendo, portanto, o que melhor se ajustou aos dados experimentais obtido, no caso da CMCase nenhum dos modelos analisados foi significativo.

A partir destes experimentos e análises pode-se notar que ao modelo estatístico varia para cada resposta obtida. É importante analisar qual equação ou modelo se ajusta melhor aos dados experimentais por meio do valor do coeficiente de determinação ou explicação (R^2) e pelo teste F ($F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado}).

Para as respostas xilanase, amilase, avicelase e FPase o modelo de segunda ordem foi o que melhor se ajustou aos resultados experimentais obtidos, uma vez que a partir dele encontrou-se um R^2 maior e a valor do F calculado maior que o F tabelado. Para β -glucosidase por sua vez, nenhum coeficiente de regressão de segunda ordem foi estatisticamente significativo, sendo o modelo de primeira ordem aquele mostrou-se significativo a 95% e dentro da faixa das variáveis analisadas de concentração de bagaço (%) e a temperatura (o C).

A **Figura 20** apresenta as superfícies de resposta, obtidas pelo modelo de segunda ordem para xilanase, amilase, FPase e avicelase e de primeira ordem para β -glucosidase.

Figura 20. Superfície de resposta obtida dos modelos preditivos. Onde, (A) xilanasase, (B) amilase, (C) avicelase, (D) FPase e (E) β -glucosidase.

Dos resultados apresentados para cada enzima, tem-se que para a produção de xilanase, uma maior concentração de bagaço de cevada foi vantajosa para a produção desta enzima, sendo a temperatura a 30°C a que levou a uma maior produção. Para a amilase, do mesmo modo, uma maior concentração de bagaço de cevada (3 e 3,41%) e temperaturas mais elevadas (35-37°C) levaram a uma maior produção enzimática pelo micro-organismo. Para avicelase e FPase, a média dos resultados encontrados nos pontos centrais mostraram que a concentração de 2% de bagaço de cevada e a temperatura de 30°C influenciaram de modo positivo suas produções pelo fungo. Os dados encontrados para β -glucosidase, por sua vez, mostraram que cultivos com concentrações mais elevadas de bagaço de cevada (3,41 gramas) juntamente com temperaturas mais elevadas (35-37°C) ocasionaram uma maior produção desta enzima.

IV.7. Produção de Lacase

A produção de lacase por *Trametes versicolor* pode ser vista na **Figura 21**. Foram testadas as fontes de carbono (resíduos), lodo branco, bagaço de cevada e bagaço de cana de açúcar na concentração de 1% em meio SR. Também foi testada a produção segundo a metodologia descrita por Kahraman & Gurdal (2002) com algumas modificações, utilizando hastes de algodão (2%) com vinhaça e água destilada (1:5 v/v). Foi testada ainda a produção desta enzima em meios contendo algodão (1%) e vinhaça diluída em água destilada (1:5 v/v) ou ainda somente meio de cultura contendo vinhaça (100%). As maiores produções de lacase ocorreram em meio contendo algodão (1%) e vinhaça diluída em água destilada (1:5 v/v). A dosagem desta enzima neste meio a partir do substrato seringaldazina, resultou em uma quantificação de 1161 U/L, enquanto por meio da metodologia que utiliza ABTS como substrato, resultou em 1587 U/L. Tanto a seringaldazina, quanto o ABTS são substratos específicos da lacase, no entanto, optou-se por continuar as dosagens enzimáticas com o ABTS, uma vez que este mostrou-se mais sensível a esta enzima.

Figura 21. Produção de lacase por *Trametes versicolor*. Onde, (1) meio SR com lodo branco (1%), (2) meio SR com bagaço de cevada 1%, (3) meio SR com bagaço de cana 1%, (4) vinhaça (20%) com 2% de hastes de algodão, (5) vinhaça (20%) com 1% de algodão, (6) vinhaça 100%, ■ atividade da lacase dosada com o substrato seringaldazina e ■ atividade da lacase dosada por ABTS. O micro-organismo foi cultivado em FSbm estática, a 30°C por 15 dias.

Assim como foi estudado para as outras enzimas, a agitação também foi um parâmetro analisado para a produção de lacase pelo basidiomiceto *T. versicolor*. Foi realizado um teste para análise da melhor condição para produção enzimática: cultivo estático ou sob agitação (25, 50 ou 100 rpm). A **Figura 22** mostra os resultados, sendo que 100% corresponde a atividade máxima encontrada. Nota-se que o cultivo estático foi promissor para a indução da lacase, uma vez que com 25 rpm houve uma queda de 54% na produção desta enzima e a 50 e 100 rpm houve uma queda de mais de 75%.

Figura 22. Produção de lacase por *Trametes versicolor* sob em cultivo estático e sob agitação. Onde, (1) meio de cultivo estático, (2) meio de cultivo com 25 rpm, (3) meio de cultivo com 50 rpm, (4) meio de cultivo com 100 rpm. O micro-organismo foi cultivado em FSbm, a 30°C por 15 dias.

O acréscimo de uma fonte de nitrogênio, peptona na concentração de 0,1%, ao meio de cultivo contendo água destilada e vinhaça (1:5 v/v) e algodão 1%, ocasionou um aumento de 30% na produção desta enzima (**Figura 23**).

Figura 23. Produção de lacase por *Trametes versicolor* em meio de cultivo com acréscimo de fonte de nitrogênio. Onde, (1) meio de cultivo contendo vinhaça diluída em água destilada (1:5 v/v) e algodão 1% e (2) meio de cultivo contendo vinhaça e água destilada (1:5 v/v), algodão 1% e peptona 0,1%. O micro-organismo foi cultivado em FSbm estática, a 30°C por 15 dias.

IV.8. Resumo das condições de cultivo selecionadas para produção de cada enzima em estudo

Visto a diversidade de enzimas em estudo, e seus variados parâmetros de cultivo; para a continuação dos estudos foram estabelecidos alguns padrões a fim de se facilitar a produção, e consequentemente, diminuir as variáveis. Quatro meios de cultivo foram padronizados para obtenção das enzimas: meio BSR, VSR, VM5 e meio específico de lacase. Como pode ser seguido pelas condições descritas na **Tabela 15**, decidiu-se por padronizar o fungo *A. brasiliensis* cultivado por 96 horas em FSbm estática, a 30°C, em meio SR contendo bagaço de cevada (3%) para produção de xilanase (meio de cultivo padronizado com a denominação de BSR). *A. versicolor* cultivado por 120 horas em FSbm estática, a 35°C, em meio SR contendo bagaço de cevada (3,41%) para produção de amilase e β -glucosidase (meio VSR). *A. versicolor* cultivado por 120 horas em FSbm estática, a 30°C, em meio M5 contendo bagaço de cevada (2%) para produção de CMCase, avicelase e FPase (meio VM5). E por fim *T. versicolor* cultivado por 15 dias em FSbm estática, a 30°C, em meio contendo vinhaça e água destilada (1:5 v/v), 1% de algodão e 0,1% de peptona para produção de lacase (meio específico para lacase). A **Tabela 15** resume os parâmetros de produção selecionados para cada enzima em estudo, de modo a facilitar a identificação destes.

Tabela 15. Resumo dos parâmetros de produção enzimática

Enzima	Micro-organismo	Fonte de carbono	Meio de cultivo	Tempo de cultivo	Concentração da fonte de carbono (%)	Temperatura (°C)
Xilanase	<i>A. brasiliensis</i>	Bagaço de cevada	SR	96 h	3	30
Amilase	<i>A. versicolor</i>	Bagaço de cevada	SR	120 h	3,41	35
β -glucosidase	<i>A.versicolor</i>	Bagaço de cevada	SR	120 h	3,41	35
CMCase	<i>A.versicolor</i>	Bagaço de cevada	M5	120 h	2	30
Avicelase	<i>A.versicolor</i>	Bagaço de cevada	M5	120 h	2	30
FPase	<i>A.versicolor</i>	Bagaço de cevada	M5	120 h	2	30
Lacase	<i>T. versicolor</i>	Algodão	Vinhaça (5x diluída)	15 dias	1	30

Todos os cultivos ocorreram em fermentação estática. O cultivo de lacase possui o acréscimo de 0,1% de peptona como fonte de nitrogênio.

IV.9. Caracterização enzimática

Após a otimização dos meios de cultivo para produção enzimática, foram estudados os efeitos da temperatura, pH e íons sobre as atividades enzimáticas.

IV.9.1. Efeito da temperatura nas atividades enzimáticas

A temperatura ótima da xilanase, amilase, celulasas e lacase foi determinada por meio de experimentos nos quais as dosagens enzimáticas foram realizadas em diferentes temperaturas (faixa que variou de 30 a 90°C dependendo da enzima).

A temperatura ótima de cada enzima pode ser observada na **Figura 24** e **Tabela 16**. A partir destes gráficos tem-se que as temperaturas ótimas das enzimas ficaram entre 50 e 70°C. A xilanase (**Figura 24A**) apresentou 70°C como temperatura ótima de atuação, amilase (**Figura 24B**) mostrou 60-65°C como uma faixa de temperatura ótima, CMCase (**Figura 24C**) apresentou 65°C como temperatura ótima, enquanto, avicelase (**Figura 24D**) e FPase (**Figura 24E**) mostraram 50°C e 60°C respectivamente. β -glucosidase (**Figura 24F**) apresentou 70-75°C como uma faixa de temperatura ótima, e por fim, os testes para lacase (**Figura 24G**) indicaram 60°C como a temperatura ótima de reação.

Figura 24. Temperatura ótima de reação enzimática. Os experimentos foram conduzidos em uma faixa de temperatura variável para cada enzima. Onde, (A) atividade da xilanase, (B) amilase, (C) CMCCase, (D) avicelase, (E) FPase, (F) β -glucosidase, (G) lacase. As produções enzimáticas ocorreram segundo parâmetros descritos na **Tabela 15**.

Tabela 16. Temperatura ótima de cada enzima em estudo

Enzima	Temperatura ótima (°C)
Xilanase	70
Amilase	60-65
CMCase	65
Avicelase	50
FPase	60
β -glucosidase	70
Lacase	60-70

IV.9.2. Estabilidade térmica

Quanto à estabilidade térmica, a xilanase produzida por *A. brasiliensis* mostrou-se estável a 40°C, com 60% de atividade por até 24 horas. A 50°C esta enzima mostrou atividade relativa de 60% por até 30 minutos, e após isso 40% por até 240 minutos. A 60°C a enzima mostrou-se pouco estável, com apenas 20% de atividade já nos primeiros 10 minutos (**Figura 25**).

Figura 25. Análise da estabilidade térmica da xilanase em extrato bruto produzido por *A. brasiliensis*. Onde, ■ 40°C, ■ 50°C e ■ 60°C. A atividade foi determinada conforme descrito na **Tabela 2**.

A amilase produzida por *A. versicolor* mostrou-se estável a 40°C e 50°C, com 80% de atividade por até 24 horas em ambas as temperaturas. A 60°C, esta enzima mostrou 80% de atividade por apenas 10 minutos e 50% de atividade até 60 minutos (**Figura 26**).

Figura 26. Análise da estabilidade térmica da amilase em extrato bruto produzido por *A. versicolor*. Onde, ■ 40°C, ■ 50°C e ■ 60°C. A atividade foi determinada conforme descrito na Tabela 2.

A CMCase de *A. versicolor* mostrou-se pouco estável nas três temperaturas testadas. A 40°C decaiu mais de 80% de sua atividade em apenas 20 minutos. A 50°C esta atividade caiu para 40% já nos 20 primeiros minutos, e em 90 minutos esta enzima já se mostrava inativa. A 60°C, CMCase mostrou uma atividade de 15% por 20 minutos, no entanto, com 90 minutos sua atividade já era nula (**Figura 27**).

Figura 27. Análise da estabilidade térmica da CMCase em extrato bruto produzido por *A. versicolor*. Onde, ■ 40°C, ■ 50°C e ■ 60°C. A atividade foi determinada conforme descrito na Tabela 2.

Avicelase, por sua vez, apresentou uma ativação quando exposta ao aquecimento de 40, 50 e 60°C. A 40°C a enzima apresentou uma ativação de 200% por até 60 minutos, e depois decaiu sua atividade. A 50°C, a enzima também apresentou uma ativação de mais de 200% nos primeiros 20 minutos, e após este tempo, foi decaindo gradativamente sua atividade, chegando

a inativação em 180 minutos. A 60°C, a avicelase também superativou-se por até 60 minutos de aquecimento, depois decaiu sua atividade e inativou-se em 180 minutos (**Figura 28**).

Figura 28. Análise da estabilidade térmica da Avicelase em extrato bruto produzido por *A. versicolor*. Onde, ■ 40°C, ■ 50°C e ■ 60°C. A atividade foi determinada conforme descrito na Tabela 2.

FPase mostrou-se pouco estável em 40, 50 e 60°C. Nas três temperaturas testadas a enzima apresentou uma atividade relativa menor que 20% desde os 10 primeiros minutos, inativando-se nos 20 minutos seguintes (**Figura 29**).

Figura 29. Análise da estabilidade térmica da FPase em extrato bruto produzido por *A. versicolor*. Onde, ■ 40°C, ■ 50°C e ■ 60°C. A atividade foi determinada conforme descrito na Tabela 2.

Outra enzima em estudo foi a β -glucosidase, que se mostrou estável a 40°C por até 24 horas, com uma atividade relativa de 60%. A 50°C, apresentou atividade relativa de 60% por até 180 minutos, e a 60°C apresentou atividade relativa de 50% por até 30 minutos, decaindo para 30% em 60 minutos, e inativando em 180 minutos (**Figura 30**).

Figura 30. Análise da estabilidade térmica da β -glucosidase em extrato bruto produzido por *A. versicolor*. Onde, ■ 40°C, ■ 50°C e ■ 60°C. A atividade foi determinada conforme descrito na Tabela 2.

A lacase, por sua vez, mostrou-se estável a 50°C, com atividade relativa de 50% por até 60 minutos. A 60°C a enzima mostrou-se parcialmente estável, com atividade relativa próxima de 30%, por até 240 minutos, e a 70°C apresentou 40% de atividade por 30 minutos (Figura 31).

Figura 31. Análise da estabilidade térmica da lacase em extrato bruto produzido por *Trametes versicolor*. Onde, ■ 50°C, ■ 60°C e ■ 70°C. A atividade foi determinada conforme descrito na Tabela 2.

A Tabela 17 indica o tempo em que cada enzima apresentou seu t_{50} nas temperaturas testadas.

Tabela 17. t_{50} das enzimas nas diferentes temperaturas

Enzima	t_{50} (min)			
	40°C	50°C	60°C	70°C
Xilanase	>1440	75	7	-
Amilase	>1440	>1440	57	-
CMCase	6	9	5	-
Avicelase	145	145	152	-
FPase	5	6	7	-
β -glucosidase	>1440	230	9	-
Lacase	-	71	12	12

IV.9.3. pH ótimo

Para avaliar o efeito do pH sobre as atividades enzimáticas, foram utilizados diferentes tampões em diferentes pH. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5), McIlvaine (pH 6,0; 6,5) e Tris HCl (7,0; 7,5; 8,0; 8,5). A **Figura 32** mostra os resultados encontrados para cada enzima estudada.

A xilanase apresentou uma faixa de pH ótimo entre 4,0 e 5,0 (pH ácido) e também entre 7,0 e 8,0 (pH alcalino) (**Figura 32A**). Amilase mostrou maior atividade em pH ácido, principalmente em pH 4,5, diminuindo sua atividade gradativamente conforme o pH foi aumentando (**Figura 32B**). CMCase apresentou pH 4,0 e 4,5 como ótimos de atuação (**Figura 32C**). Avicelase apresentou pH 5,5 como ótimo de atuação (**Figura 32D**), enquanto FPase apresentou maior atividade em pH 5,0 (**Figura 32E**). β -glucosidase mostrou maior atividade nos pH 5,0 e 5,5 (**Figura 32F**). E por fim, a lacase teve sua maior atividade em pH 5,0 (**Figura 32G**).

Figura 32. Efeito do pH sobre as enzimas. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5), McIlvaine (pH 6,0; 6,5) e Tris HCl (7,0; 7,5; 8,0; 8,5). Onde, (A) atividade da xilanase, (B) amilase, (C) CMCase, (D) avicelase, (E) FPase, (F) β -glucosidase, (G) lacase. As produções enzimáticas ocorreram segundo parâmetros descritos na **Tabela 15**. As dosagens enzimáticas ocorreram conforme descrito na **Tabela 2**.

IV.9.4. Estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH da xilanase, amilase, celulasas e lacase foi avaliada a 25°C com 24 horas de incubação utilizando tampão citrato-fosfato (McIlvaine) em diferentes pH. Foi realizado um controle, o qual corresponde à enzima em extrato bruto antes do tempo de incubação e sem influência de qualquer tampão, por isso considerada a atividade de 100%. A partir da **Figura 33A** pode-se observar que a xilanase comportou-se melhor nos pH 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 apresentando 84%, 86%, 89% e 83%, respectivamente, da atividade inicial, mesmo após 24 horas. Nos pH mais ácidos (2,5 a 5,0), assim como nos mais alcalinos (7,5 e 8,0) a enzima apresentou em média 70% da atividade inicial.

A amilase (**Figura 33B**) apresentou maior estabilidade em pH 5,0 a 6,5, com 97%, 104%, 107% e 97% da atividade inicial. A atividade desta enzima após 24 horas foi de 72% em pH 2,5, e cresceu na medida em que o pH aumentou, chegando a maior atividade (melhor estabilidade – 107%) em pH 6,0, no entanto, depois disso, conforme o pH aumentou ainda mais, sua atividade foi decaindo, chegando a 57% em pH 8,0.

CMCase (**Figura 33C**) foi estável em pH ácido, principalmente 4,5, com uma atividade relativa de 61%. Em pH acima de 6,0 a enzima mostrou-se instável.

Avicelase (**Figura 33D**) da mesma forma, mostrou-se mais estável em pH ácido, atingindo maior atividade relativa (38%) em pH 3,0. Em pH acima de 5,5 a enzima apresentou-se instável.

FPase (**Figura 33E**) apresentou em pH 2,5 a atividade relativa de 23%, chegando ao máximo (48%) em pH 4,5; a partir disto, conforme houve o aumento do pH a atividade relativa diminui, chegando a ser nula a partir do pH 7,0.

β -glucosidase (**Figura 33F**) apresentou maior atividade relativa quando exposta a pH ácidos 5,0 e 5,5. Em pH 7,0; 7,5 e 8,0 sua atividade relativa decaiu 70%, 80% e 90%, respectivamente, com relação a máxima atividade encontrada.

A lacase (**Figura 33G**), por sua vez, apresentou, após 24 horas em pH 2,5, a atividade relativa de 10% quando comparada a inicial. Com o aumento do valor do pH testado, a atividade relativa chegou ao seu máximo de 122% em pH 4,5, no entanto esta atividade decaiu em valores de pH superiores.

Figura 33. Estabilidade ao pH por 24 horas. O tampão utilizado foi citrato-fosfato McIlvaine nos pH 2,5 a 8,0. Onde, (A) atividade relativa da xilanase, (B) amilase, (C) CMCase, (D) avicelase, (E) FPase, (F) β -glucosidase, (G) lacase. As produções enzimáticas ocorreram segundo parâmetros descritos na **Tabela 15**. As dosagens enzimáticas ocorreram conforme descrito na **Tabela 2**.

IV.9.5. Efeito de íons

O efeito de alguns íons sobre a atividade das enzimas deste trabalho foi investigado. Pode-se observar pelas **Figuras 34 e 35**, o resultado deste estudo.

A xilanase foi ativada em 40% pelo Mn^{2+} e em 22% pelo Cu^{2+} , nenhum dos íons inibiu completamente sua atividade (**Figura 34A**).

A amilase foi ativada em 20% pelo Co^{2+} , e em 5% pelo Al^{3+} e Fe^{2+} , a Ag^+ por sua vez, inativou em 50% esta enzima (**Figura 34B**).

A CMCase foi ativada pela maioria dos íons testados, aqueles que mais se destacaram foi o Mn^{2+} , o qual ativou em 242% a atividade desta enzima e a Ag^+ que ativou a CMCase em 180% (**Figura 34C**).

A avicelase foi ativada em 25% pelo Mn^{2+} , e 36% pela Ag^+ . O Zn^{2+} , por sua vez, inibiu totalmente a atividade desta enzima (**Figura 34D**).

FPase teve sua atividade reduzida por muitos dos íons testados, destacando-se o Na^{2+} que diminuiu em 90% sua atividade e o Zn^{2+} que inibiu 85%. Os íons K^+ e Ba^{2+} inibiram 100% da atividade da FPase (**Figura 35A**).

β -glucosidase foi ativada principalmente por K^+ (22%), NH_4^+ (20%), Co^{2+} (30%), Ca^{2+} (30%), Al^{3+} (21%), Fe^{2+} (31%), Mn^{2+} (23%), Zn^{2+} (25%), Mg^{2+} (26%), Ba^{2+} e Cu^{2+} (22%). Ag^+ e Hg^{2+} inibiram totalmente a atividade desta enzima, enquanto EDTA inibiu 50% (**Figura 35B**).

A lacase, por fim, foi ativada em 46% por NH_4^+ e em 60% quando na presença de EDTA. Os íons Ba^{2+} e Hg^{2+} inativaram em 75% e 70%, respectivamente, a atividade desta enzima, enquanto o Cl^{2+} a inibiu totalmente (**Figura 35C**).

Figura 34. Influência de íons e EDTA sobre a atividade das enzimas em estudo. A concentração final de cada composto testado foi 5 mM. A amostra controle foi aquela dosada na ausência dos compostos testados, representada no gráfico como (1) e equivale, portanto, a 100%. Onde, (A) xilanase, (B) amilase, (C) CMCCase, (D) avicelase, (2) NaCl, (3) KCl, (4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (5) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (6) CaCl_2 , (7) AlCl_3 , (8) Cl_2Fe , (9) MnCl_2 , (10) ZnSO_4 , (11) AgNO_3 , (12) EDTA, (13) MgCl_2 , (14) BaCl_2 , (15) HgCl_2 , (16) CuCl_2 .

Figura 35. Influência de íons e EDTA sobre a atividade das enzimas em estudo. A concentração final de cada composto testado foi 5 mM. A amostra controle foi aquela dosada na ausência dos compostos testados, representada no gráfico como (1) e equivale, portanto, a 100%. Onde, (A) FPase, (B) β -glucosidase, (C) lacase, (2) NaCl, (3) KCl, (4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (5) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (6) CaCl_2 , (7) AlCl_3 , (8) Cl_2Fe , (9) MnCl_2 , (10) ZnSO_4 , (11) AgNO_3 , (12) EDTA, (13) MgCl_2 , (14) BaCl_2 , (15) HgCl_2 , (16) CuCl_2 .

As correlações entre os principais ativadores das atividades enzimáticas encontram-se na **Tabela 18** e **Figura 36**. A FPase foi a única enzima que não foi afetada positivamente por nenhum íon, sendo assim, não está representada no esquema de diagrama de Veen da **Figura**

36. CMCase e β -glucosidase foram ativadas por K^+ , Zn^{2+} e Ba^{2+} ; CMCase, β -glucosidase e lacase foram ativadas por NH_4^+ e Ca^{2+} ; amilase, CMCase, β -glucosidase e lacase foram ativadas por Co^{2+} ; amilase, CMCase e β -glucosidase foram ativadas por Al^{3+} e Fe^{2+} ; xilanase, avicelase, CMCase e β -glucosidase foram ativadas por Mn^{2+} ; avicelase e CMCase foram ativadas por Ag^+ ; lacase por EDTA; β -glucosidase e lacase por Mg^{2+} , CMCase por Hg^{2+} e xilanase, β -glucosidase e lacase por Cu^{2+} .

Tabela 18. Correlação entre os principais íons ativadores das enzimas

Enzima	Íons														
Xilanase	Na^+	K^+	NH_4^+	Co^{2+}	Ca^{2+}	Al^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Ag^+	EDTA	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}	Cu^{2+}
Amilase	Na^+	K^+	NH_4^+	Co^{2+}	Ca^{2+}	Al^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Ag^+	EDTA	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}	Cu^{2+}
FPase	Na^+	K^+	NH_4^+	Co^{2+}	Ca^{2+}	Al^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Ag^+	EDTA	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}	Cu^{2+}
Avicelase	Na^+	K^+	NH_4^+	Co^{2+}	Ca^{2+}	Al^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Ag^+	EDTA	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}	Cu^{2+}
CMCase	Na^+	K^+	NH_4^+	Co^{2+}	Ca^{2+}	Al^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Ag^+	EDTA	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}	Cu^{2+}
β -glucosidase	Na^+	K^+	NH_4^+	Co^{2+}	Ca^{2+}	Al^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Ag^+	EDTA	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}	Cu^{2+}
Lacase	Na^+	K^+	NH_4^+	Co^{2+}	Ca^{2+}	Al^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Ag^+	EDTA	Mg^{2+}	Ba^{2+}	Hg^{2+}	Cu^{2+}

As cores representadas na tabela correspondem àquelas utilizadas para representar os mesmos íons ativadores (atividade relativa acima de 100%) no diagrama de Venn a seguir.

Figura 36. Diagrama de Venn correlacionando os íons ativadores das enzimas em estudo. Onde, 0 corresponde a β -glucosidase, 1 a CMCase, 2 a avicelase, 3 a xilanase, 4 a amilase e 5 a lacase. Os números correspondem aos íons que ativaram concomitantemente as enzimas, sendo, 1 os íons K^+ , Zn^{2+} , Ba^{2+} ; 2 os íons NH_4^+ , Ca^{2+} ; 3 o Co^{2+} ; 4 o Al^{3+} e Fe^{2+} ; 5 o Mn^{2+} ; 6 o Ag^{2+} ; 7 o EDTA; 8 o Mg^{2+} ; 9 o Hg^{2+} e o 10 o Cu^{2+} .

IV.10. Dosagem de enzimas do complexo lignocelulolítico

Dosagens de diversas enzimas lignocelulolíticas foram feitas a partir dos extratos brutos produzidos neste trabalho. As **Figuras 37, 38, 39 e 40** mostram as proporções das enzimas encontradas em cada um dos quatro extratos brutos produzidos e otimizados para a produção das respectivas enzimas. Esses gráficos mostram que além das enzimas de interesse, outras delas também estão presentes. Em nenhum dos quatro extratos brutos produzidos foi detectada a atividade de α -glucuronidase.

Figura 37. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por *Aspergillus brasiliensis*. O micro-organismo foi cultivado em FSbm estática, a 30°C, em meio SR, com bagaço de cevada (3%) como fonte de carbono por 96 horas. Este extrato bruto fora otimizado para a produção de xilanase.

Figura 38. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por *Aspergillus versicolor*. O micro-organismo foi cultivado em FSbm estática, a 35°C, em meio SR, com bagaço de cevada (3,41%) como fonte de carbono por 120 horas. Este extrato bruto fora otimizado para a produção de amilase e β -glucosidase.

Figura 39. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por *Aspergillus versicolor*. O micro-organismo foi cultivado em FSbm estática, a 30°C, em meio M5 com bagaço de cevada (2%) como fonte de carbono por 120 horas. Este extrato bruto fora otimizado para a produção de CMCCase, avicelase e FPase.

Figura 40. Proporções das atividades enzimáticas dosadas no extrato bruto produzido por *Trametes versicolor*. O micro-organismo foi cultivado em FSbm estática, a 30°C, em meio contendo vinhaça e algodão como fonte de carbono por 15 dias. Este extrato bruto fora otimizado para a produção de lacase.

IV.11. Dados da produção e caracterização da xilanase bruta produzida por *Aspergillus tamarri* Kita

Em paralelo à produção e caracterização das enzimas brutas deste trabalho, o doutorando Paulo R. Heinen otimizou a produção e a caracterização da xilanase bruta de *A. tamarri* Kita. A otimização das condições de cultivo levou a uma produção máxima de 30 unidades de xilanase por mL de extrato bruto. Os dados encontrados pelo doutorando encontram-se nas **Tabelas 19 e 20**.

Tabela 19. Parâmetros de cultivo de *A. tamarii* Kita para produção de xilanase

Parâmetros de cultivo	
Fermentação	Submersa (estática)
Fonte de carbono	Bagaço de cevada
Concentração da fonte de carbono (%)	2,912
Meio de cultivo	meio ADAMS + H ₂ O (1:3 v/v)
Tempo (horas)	129
Temperatura (°C)	30

Tabela 20. Dados de caracterização da xilanase bruta produzida por *A. tamarii* Kita

Parâmetros	
Temperatura ótima (°C)	60
pH ótimo	4,5-6,5
Estabilidade térmica t ₅₀ a 55 °C (min)	45
Estabilidade ao pH 5,0-7,0, 24 horas (%)	90

O extrato otimizado para produção de xilanase de *A. tamarii* Kita também apresentou várias enzimas em sua composição. Dentre algumas que foram dosadas pelo doutorando estão: amilase ($6,5 \pm 0,158$ U/mL), pectinase ($0,191 \pm 0,017$ U/mL), 1,4- β -glucosidase ($0,04 \pm 0,003$ U/mL), exo-1,4- β -glucanase ($0,255 \pm 0,015$ U/mL) e endo-1,4- β -glucanase ($0,15 \pm 0,014$ U/mL).

Uma vez que a xilanase bruta de *A. tamarri* Kita apresentou condições de produção e padrões bioquímicos próximos àqueles encontrados para as enzimas deste trabalho, o extrato bruto produzido pelo doutorando foi selecionado para também compor os testes de aplicação no biobranqueamento da polpa de celulose. O meio de cultivo foi denominado neste trabalho como TKADAMS.

IV.12. Aplicação dos extratos enzimáticos nas polpas de celulose

IV.12.1. Extratos individualmente

Primeiramente foi testado o efeito individual de cada extrato bruto (BSR, VSR, VM5, extrato da lacase e TKADAMS) quanto a redução do número Kappa da polpa marrom. O resultado dos tratamentos (4 gramas de polpa de celulose tratadas por 48 horas a 50°C com 30 mL dos extratos brutos) encontram-se na **Figura 41**. Nota-se que os extratos brutos BSR, VSR

e VM5 não ocasionaram uma grande redução do número Kappa, enquanto os extratos da lacase e TKADAMS mostraram-se mais promissores na redução deste parâmetro.

Figura 41. Redução do número Kappa após tratamento com os diferentes extratos enzimáticos. O controle refere-se a polpa marrom não tratada.

IV.12.2. Efeito de diferentes proporções entre os extratos TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom

O extrato enzimático TKADAMS foi selecionado para os subsequentes testes de aplicação sobre a polpa de celulose marrom. Do mesmo modo, visto a importância e interesse pela lacase no biotratamento da polpa de celulose selecionou-se também o extrato desta enzima para continuação dos testes. O passo seguinte foi analisar por meio de um planejamento de experimentos qual a melhor proporção entre os extratos TKADAMS e da lacase para se obter uma maior redução do número Kappa da polpa marrom.

A **Tabela 21** apresenta as reduções dos números Kappa obtidas nesse experimento.

Tabela 21. Planejamento experimental para avaliar o efeito da variação das proporções entre os extratos TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom

Experimento	Extratos enzimáticos (mL)		Redução do número Kappa
	TKADAMS	Lacase	
1	8,3 (-1)	5 (-1)	0,84
2	18,3 (+1)	5 (-1)	1,35
3	8,3 (-1)	15 (+1)	0,84
4	18,3 (+1)	15 (+1)	1,48
5	6,25 (-1,41)	10 (0)	0,84
6	20,35 (+1,41)	10 (0)	1,53
7	13,3 (0)	2,95 (-1,41)	0,84
8	13,3 (0)	17,05 (+1,41)	1,35
9	13,3 (0)	10 (0)	1,09
10	13,3 (0)	10 (0)	1,09
11	13,3 (0)	10 (0)	1,09
12	13,3 (0)	10 (0)	1,09

Os valores codificados das variáveis estão entre parênteses.

As análises dos resultados pelos modelos de primeira e segunda ordem (**Tabela 22**), com p de 0,05, mostraram que no modelo de segunda ordem nenhum termo ao quadrado foi estatisticamente significativo e por isso o modelo de primeira ordem é o que se adequa melhor para descrever este experimento. Dos resultados apresentados na **Tabela 22**, juntamente com a superfície de resposta (**Figura 42**) nota-se que para a redução do número Kappa, a maior quantidade de extrato TKADAMS (20,35 mL, o qual contém 611,5 unidades de xilanase) e acima de 10 mL do extrato da lacase (sendo que neste extrato havia 1 unidade de lacase por mL) são parâmetros vantajosos para o tratamento de 4 gramas de polpa.

Tabela 22. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} GL _R ,GL _r	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,339	3	0,113	209,070	6,59 (F _{95%} ; 3,4)	= 1,11 + 0,287 (TKADAMS) + 0,032 (Lac) + 0,0325 (TKADAMS)(Lac)
	Resíduo (r)	0,002	4	0,0005			
	Total (T)	0,341	7				
	R ²	0,99					
Segunda ordem	Regressão (R)	0,815	2	0,407	34,760	4,26 (F _{95%} ; 2,9)	= 1,136 + 0,301 (TKADAMS) + 0,106 (Lac)
	Resíduo (r)	0,105	9	0,01			
	Total (T)	0,921	11				
	R ²	0,88					

No modelo de primeira ordem o F_{calculado} foi maior que o F_{tabelado}, o que significa que o modelo é preditivo e estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95%.

Figura 42. Superfície de resposta obtida por meio do modelo de primeira ordem, a partir de um planejamento experimental, para avaliação do efeito da variação das proporções entre o meio TKADAMS e da lacase sobre a redução do número Kappa da polpa marrom.

Como o planejamento mostrou uma tendência, em que uma maior quantidade de meio TKADAMS no tratamento da polpa marrom é vantajosa para a redução do número Kappa, foram realizados tratamentos (4 gramas de polpa marrom tratadas por 48 horas a 50°C) com maiores volumes do meio TKADAMS (26,5; 33,3 e 40 mL, o que corresponde a 800, 1000 e 1200 unidades de xilanase, respectivamente), sendo que a concentração da lacase foi mantida em 10 mL (10 unidades totais). Deste experimento, não foram encontradas reduções significativamente maiores do número Kappa quando comparadas à redução com 20,3 mL de meio TKADAMS, contendo 611,5 unidades de xilanase (valor máximo no planejamento) (**Tabela 23**).

Tabela 23. Redução do número Kappa em tratamentos contendo maiores quantidades de xilanase bruta

Tratamento	Xilanase (Unidades)	Lacase (Unidades)	Redução do número Kappa
1	800	10	1,58
2	1000	10	1,58
3	1200	10	1,58

Os tratamentos ocorreram por 48 horas a 50°C, sendo o volume final de 50 mL, o qual foi completado com tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5 conforme os volumes de extratos variaram.

IV.12.3. Tempo de tratamento

Foi analisado qual o melhor tempo de tratamento da polpa marrom, 24 ou 48 horas, com os extratos enzimáticos selecionados. A **Tabela 24** traz os resultados encontrados quanto a redução do número Kappa e as atividades residuais das enzimas. O tempo de 48 horas foi aquele se destacou para o tratamento, uma vez que apresentou a maior redução do número Kappa e ainda apresentou uma boa porcentagem de enzimas ativas neste período.

Tabela 24. Redução do número Kappa em função do tempo de tratamento

Tempo de tratamento (horas)	Redução do número Kappa	Atividade Residual Xilanase (%)	Atividade Residual Lacase (%)
Controle	0	100	100
24	1,05	70,83	60
48	1,82	66,66	50

Os tratamentos ocorreram a 50°C com 20,3 mL de meio TKADAMS e 10 mL de meio da lacase.

IV.12.4. Otimização do pH e temperatura do tratamento por planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta

Por meio de um Planejamento experimental foi estudado qual o melhor pH e temperatura em que a xilanase e lacase brutas pudessem atuar e consequentemente ocasionar a redução do número Kappa da polpa marrom (**Figura 43**). Foram realizados testes cuja temperatura variou de 35,9 a 64,1°C e o pH de 3,6 a 6,4.

A **Tabela 25** apresenta as reduções dos números Kappa obtidas nesse experimento.

Tabela 25. Planejamento de experimentos para avaliar o efeito do pH e temperatura sobre a redução do número Kappa da polpa marrom.

Experimento	Variáveis		Redução do número Kappa
	pH	Temperatura (°C)	
1	4 (-1)	40 (-1)	0,86
2	6 (+1)	40 (-1)	1,16
3	4 (-1)	60 (+1)	0,78
4	6 (+1)	60 (+1)	0,9
5	3,59 (-1,41)	50 (0)	0,52
6	6,41 (+1,41)	50 (0)	1,4
7	5 (0)	35,9 (-1,41)	1,83
8	5 (0)	64,1 (+1,41)	1,03
9	5 (0)	50 (0)	1,41
10	5 (0)	50 (0)	1,41
11	5 (0)	50 (0)	1,41
12	5 (0)	50 (0)	1,41

Os valores codificados das variáveis estão entre parênteses. O tratamento ocorreu por 48 horas com 4 gramas de polpa marrom, 20,3 mL de meio TKADAMS e 10 mL do meio da lacase.

Figura 43. Correlação entre as atividades residuais das enzimas xilanase e lacase e redução do número Kappa encontrados após os experimentos do planejamento. Onde: os experimentos (1 ao 12) representados no eixo x da figura correspondem respectivamente àqueles do planejamento representado na **Tabela 25**, ■ atividade residual da lacase, □ atividade residual da xilanase e ● valor de redução do número Kappa. A atividade de 100% corresponde a atividade enzimática no início do tratamento.

Os resultados foram analisados por modelos de primeira e segunda ordem (**Tabela 26**). Como pode se ver, o modelo de segunda ordem foi aquele que mais se ajustou as análises, uma vez que apresentou um $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} e apresentou um R^2 maior do que aquele encontrado no modelo de primeira ordem.

Dos resultados apresentados, tem-se que para a redução deste número, um pH em torno de 5,5 e uma temperatura mais baixa (35,9°C) são condições vantajosas para o tratamento da polpa marrom.

Tabela 26. ANOVA para o Planejamento Experimental de primeira e segunda ordem quanto ao pH e temperatura para o coquetel enzimático

Modelo	Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	$F_{\text{calculado}} QM_R/QM_r$	$F_{\text{tabelado}} GL_R, GL_r$	Equação
Primeira ordem	Regressão (R)	0,081	3	0,027	0,229	6,59 (F95%; 3,4)	$= 1,16 + 0,105 (\text{pH}) - 0,085 (\text{Temp}) - 0,045 (\text{pH})(\text{Temp})$
	Resíduo (r)	0,470	4	0,117			
	Total (T)	0,551	7				
	R^2	0,14					
Segunda ordem	Regressão (R)	1,144	3	0,381	9,052	4,07 (F95%; 3,8)	$= 1,364 + 0,208 (\text{pH}) - 0,282 (\text{pH})^2 - 0,184 (\text{Temp})$
	Resíduo (r)	0,337	8	0,042		,	
	Total (T)	1,481	11				
	R^2	0,77					

A **Figura 44** apresenta a superfície de resposta obtida pelo modelo.

Figura 44. Superfície de resposta obtida por meio do modelo de segunda ordem, para avaliação do efeito da variação do pH e temperatura sobre a redução do número Kappa da polpa marrom.

O resultado deste planejamento mostrou que uma menor temperatura é vantajosa para o tratamento da polpa marrom pelas enzimas brutas em estudo. Deste modo, foi realizado um tratamento a 30°C (por 48 horas, com 4 gramas de polpa marrom, com as proporções dos extratos brutos selecionados anteriormente, pH 5,5). Neste experimento, não houve uma maior redução do número Kappa, o qual ficou em 1,5 pontos, sendo menor que aquela encontrado no planejamento com 35,9°C.

IV.13. Caracterização dos extratos por géis SDS-PAGE

As enzimas xilanase e lacase aplicadas nos testes de redução do número Kappa da polpa de celulose marrom eram brutas, desta forma haviam outras enzimas presentes nos extratos que poderiam estar agindo sinergicamente na quebra da polpa. Para uma melhor caracterização dos extratos e confirmação da presença de outros componentes, foi feito uma análise eletroforética dos extratos em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Na **Figura 45** encontram-se os géis com os extratos aplicados, o da lacase (**Figura 45A**) e xilanase (**Figura 45B**). Em ambas as amostras pode ser visto a presença de várias bandas, as quais representam as várias moléculas presentes nos extratos.

Figura 45. Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE 10% pH 8,9 dos extratos enzimáticos. Onde: (M) Marcador molecular; (A) extrato bruto da lacase, (B) extrato bruto da xilanase. Ao lado esquerdo de cada gel, encontram-se os pesos moleculares correspondentes aos marcadores em kDal. Coloração com Blue Silver com 15% de ácido fosfórico (ANEXO V).

IV.14. Resumo das características do coquetel desenvolvido

Na tabela seguinte (**Tabela 27**) estão os dados correspondentes as melhores condições encontradas para o tratamento de 4 gramas de polpa de celulose marrom.

Tabela 27. Condições padronizadas para o coquetel enzimático

Parâmetros	Melhores condições
Meio TKADAMS (mL)	20,3
Meio da lacase (mL)	10
Tempo (horas)	48
pH	5,5
Temperatura (°C)	35,9

O volume final é completado com tampão acetado de sódio 0,1M q.s.p 50 mL para cada 4 gramas de polpa marrom

A aplicação deste coquetel enzimático na polpa marrom resultou nos dados da **Tabela 28** quanto ao biobranqueamento desta.

Tabela 28. Biobranqueamento da polpa marrom com coquetel enzimático

	Polpa controle	Polpa tratada
Número Kappa	9,0	7,17
Eficiência Kappa (%)	-	20,3
Alvura (ISO)	38,67	43,32
Viscosidade	998	808

A consistência da polpa marrom estava em 9,75% de umidade (dato necessário para o cálculo do número Kappa).

O resultado da aplicação do coquetel enzimático pode ser ainda corroborado pela visível diferença de coloração da polpa não tratada (mais escura) (**Figura 46A**) e tratada (mais clara) (**Figura 46B**).

Figura 46. Amostras de polpa marrom. Onde: polpa controle – sem tratamento enzimático (**A**) e polpa tratada com coquetel enzimático (**B**).

IV.15. Análise das polpas de celulose em microscopia eletrônica de varredura

A polpa marrom foi submetida à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi analisada a polpa antes do tratamento (controle) e após o tratamento com o coquetel enzimático.

Na **Figura 47** vê-se que, na polpa de celulose controle a fibra encontra-se intacta, com estrutura íntegra (**Figura 47A e 47B**), enquanto após o tratamento enzimático há dissociação das fibras e exposição das camadas de polissacarídeos mais íntimas (**Figura 47C e 47D**). Os resultados observados por meio de MEV corroboram com aqueles encontrados na **Tabela 28** quanto a redução do número Kappa e alvura da polpa marrom tratada.

Figura 47. Microscopia Eletrônica de Varredura da polpa marrom antes e depois do tratamento enzimático. Onde: controle (A e B) e polpa tratada com coquetel enzimático (C e D).

IV.16. Aplicação do coquetel no bagaço de cevada, bagaço de cana e papel reciclado

O coquetel desenvolvido foi testado sobre outras três fontes de materiais passíveis de formarem polpas de celulose para a produção de papel, o bagaço de cevada, bagaço de cana de açúcar e papel reciclado proveniente de escritório. Para análise do efeito do coquetel enzimático sobre os bagaços, foi utilizada a metodologia de dosagem de açúcar redutor, a qual possibilita quantificar os açúcares simples formados pela quebra dos resíduos lignocelulósicos por ação das enzimas. Na **Figura 48** é possível acompanhar a formação dos açúcares redutores ao longo do tratamento. O bagaço de cevada foi notavelmente mais hidrolisado do que o bagaço de cana, apresentando um máximo de açúcar redutor formado em 24 horas de tratamento de 85 mg/mL. O bagaço de cana, por sua vez, apresentou um máximo de açúcar redutor formado com 3 horas de tratamento (25 mg/mL).

Figura 48. Formação de açúcar redutor no tratamento dos bagaços com o coquetel enzimático. Onde: ■ bagaço de cana de açúcar e ■ bagaço de cevada. O controle corresponde a quantidade de açúcar redutor presente nas amostras no tempo 0. O tratamento ocorreu nas condições descritas da **Tabela 27**.

O resultado do tratamento enzimático do papel reciclado proveniente de escritórios foi analisado por meio de diferenças de coloração apresentadas antes e depois do tratamento. A **Figura 49** mostra as polpas de papel reciclado antes e depois da aplicação do coquetel enzimático. O tratamento ocasionou uma maior limpeza do papel, uma vez que a polpa controle apresentou uma coloração mais acinzentado, enquanto a polpa de papel tratada com o coquetel ativo mostrou-se mais limpa, com uma coloração mais clara.

Figura 49. Polpa de papel reciclado proveniente de escritório. Onde: polpa controle (A) e polpa tratada com coquetel enzimático (B). O tratamento ocorreu nas condições descritas da **Tabela 27**.

IV.17. Produção de lacase por *Trametes versicolor* em Biorreator

A produção em Erlenmeyer de lacase por *Trametes versicolor* foi comparada àquela produzida pelo fungo em biorreator.

A **Figura 50** mostra a atividade da lacase a cada 24 horas em ambos os cultivos (Erlenmeyer e biorreator). Nota-se que a produção da enzima de interesse nas condições utilizadas foi 6,25 vezes maior em biorreator quando comparada aquela encontrada em Erlenmeyer, uma vez que em biorreatores houve uma produção máxima de 5000 U/L e em Erlenmeyer houve uma produção máxima de 800 U/L. Outro parâmetro que se observa neste gráfico é o tempo de produção. Em biorreator a atividade máxima ocorreu com 12 dias de cultivo decaindo gradativamente no 13º e 14º dia, enquanto em Erlenmeyer este tempo de produção máxima ocorreu com 7 dias de cultivo, decaindo a atividade nos períodos subsequentes.

Figura 50. Atividade da lacase. Onde: ● produção em biorreator, ● produção em Erlenmeyer.

Quanto a produtividade da lacase por *Trametes versicolor*, a **Tabela 29**, mostra que o pico de produtividade em Erlenmeyer ocorreu no 5º dia de cultivo, com a produção de 7 unidades de lacase por hora. Em biorreator o pico de produtividade (19 unidades por hora de cultivo) corresponde ao pico de produção da enzima, que ocorreu no 12º dia.

Tabela 29. Produtividade em biorreator e Erlenmeyer da lacase por *Trametes versicolor*

Tempo de cultivo (dia)	Produtividade (U/h)	
	Erlenmeyer	Biorreator
1	0	0
2	2,19	0,56
3	1,96	1,25
4	6,75	3,06
5	6,97	5,29
6	5,62	6,11
7	5,67	8,64
8	4,03	10,01
9	2,19	10,86
10	2,19	11,97
11	1,59	16,25
12	0,85	18,96
13	-	10,64
14	-	9,06

A **Figura 51** mostra a atividade específica da lacase ao longo do cultivo. Nos picos de produção da enzima, 7 dias em Erlenmeyer e 12 dias em biorreator, a atividade específica em biorreator chega a ser 10 vezes maior que aquela encontrada em Erlenmeyer.

Figura 51. Atividade específica da lacase. Onde: ● cultivo em biorreator, ● cultivo em Erlenmeyer.

No cultivo em biorreator não foi possível analisar a massa do fungo ao longo do crescimento, uma vez que este envolvia um sistema fechado e o *Trametes versicolor* quando em fermentação submersa forma pellets, os quais fazem com que a cultura não seja homogênea,

de modo a não permitir a determinação direta da concentração da biomassa. No entanto, dos cultivos em Erlenmeyer foi possível construir uma curva de crescimento do basidiomiceto em estudo. A **Figura 52** ilustra a massa seca encontrada a cada 24 horas de cultivo. Nota-se por meio da formação de biomassa que o micro-organismo apresentou várias fases de crescimento, uma fase lag (do primeiro ao terceiro dia) onde não há aumento significativo da biomassa, seguida de uma fase log (do terceiro ao quarto dia) com aumento exponencial desta, uma fase estacionária (do quarto ao décimo dia) no qual a biomassa se mantém constante, e finalmente uma fase de declínio.

Figura 52. Massa seca do micélio encontrado nos cultivos em Erlenmeyer a cada 24 horas. Os cultivos ocorrem em Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio (vinhaça e água destilada (1;7 v/v), algodão 1% e peptona 0,1%) a 30°C.

Deste teste de cultivo em biorreator pôde-se ainda analisar o pH do meio, o qual foi levemente alterado em consequência do próprio metabolismo do micro-organismo. O pH manteve-se entre 5,0 e 6,0 tanto no cultivo prévio (em Erlenmeyer) como no biorreator (**Figura 53**).

Figura 53. pH do meio de cultivo. Onde: ● cultivo em biorreator, ● cultivo em Erlenmeyer.

V. Discussão

A biotecnologia aplicada à indústria é um ramo emergente e de enorme importância socioeconômica. A aplicação de biocatalisadores propicia bioprocessos limpos, com economia de água e energia e que substituem processos químicos padrões e poluentes. Micro-organismos e suas enzimas têm sido aplicados há séculos para diferentes propósitos biotecnológicos, como por exemplo, a fabricação de pães e bebidas alcoólicas. Hoje, na biotecnologia moderna, as enzimas são aplicadas a reações desafiadoras, de modo a propiciar maiores benefícios, como maior pureza enantiomérica, sustentabilidade ambiental e baixos custos. Esses benefícios fazem das enzimas um potencial altamente desejável (HILTERHAUS *et al.*, 2016; MADHU *et al.*, 2017; CHANG & WEBB, 2017). A identificação de novas enzimas aplicáveis às indústrias pode ser alcançada mediante screening de micro-organismos (HILTERHAUS *et al.*, 2016). Neste trabalho foram testados 13 fungos presentes na micoteca do laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto quanto à produção de enzimas. Dos 13 fungos filamentosos testados, *Aspergillus brasiliensis* e *A. versicolor* foram aqueles que se destacaram quanto a produção das enzimas de interesse. *A. brasiliensis* foi selecionado para a produção de xilanase e *A. versicolor* para a produção de amilase, CMCase, FPase, avicelase e β -glucosidase. Após a seleção dos melhores fungos produtores, realizou-se um teste de coprodução enzimática, no entanto este cocultivo não se mostrou promissor para as produções das enzimas de interesse. Desta forma, os experimentos seguiram-se a partir dos complexos enzimáticos diferentes (de *A. versicolor* e *A. brasiliensis*), uma vez que, estes, com ações complementares, podem levar a um maior sinergismo de hidrólise sobre as polpas de papel. Consta na literatura a produção por *A. brasiliensis* de uma β -xilosidase termoestável (PEDERSEN *et al.*, 2007), xilanase com palha de arroz como fonte de carbono (DA SILVA MENEZES *et al.*, 2017). Também encontram-se trabalhos descrevendo a produção de celulasas (ANDERSEN *et al.*, 2016) e amilase (GOPINATH *et al.*, 2017) por *A.versicolor*.

Dentre os três resíduos agroindustriais (bagaço de cana e cevada e lodo branco) testados como fonte de carbono para a produção de enzimas, o bagaço de cevada, foi aquele que se destacou como indutor destas pelos dois micro-organismos selecionados, ambos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, o qual já vem sendo usado em vários processos para a direta desconstrução da biomassa lignocelulósica (CHANG & WEBB, 2017). Um fator que pode ter sido determinante para esse resultado foi a composição lignocelulose dos resíduos. A partir da análise do bagaço de cana de açúcar e bagaço de cevada realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo, pela Professora Dra.

Carem Gledes Vargas Rechia, o bagaço de cevada apresenta aproximadamente 28% de lignocelulose, enquanto que o bagaço de cana de açúcar apresenta 38%. A partir dessa composição pode-se inferir que a menor quantidade de lignocelulose (lignina e celulose) do bagaço de cevada possibilitou um maior acesso aos polímeros de açúcar pelos micro-organismos. A lignina está normalmente presente na parede celular vegetal, conferindo rigidez, impermeabilidade, e resistência ao ataque microbiano e ao stress oxidativo (PÉREZ *et al.*, 2002; SÁNCHEZ, 2009). Desta forma, quanto menos lignina na constituição do resíduo, mais fácil é o acesso aos polímeros de xilose e glicose que servem para o crescimento dos fungos e indução da produção de enzimas. O lodo branco utilizado, por sua vez, continha 40% de carboidratos totais, sendo 76% celulose, 8% de hemicelulose e 16% de lignina, além de agentes de enchimento, argilas inertes e componentes minerais (CARLOS *et al.*, 2013; BETINI, 2016). A baixa produção enzimática neste resíduo pode ser devido a presença destes 3 últimos compostos, os quais podem ter servido como inibidores para a produção de enzimas, assim como a elevada quantidade de lignina, que pode ter dificultado o acesso aos polímeros de xilose e glicose.

Selecionada a fonte de carbono, o próximo passo foi o estudo do melhor meio de cultivo em fermentação submersa. Esta variável influencia o crescimento e a produção enzimática. Deste modo, foram testados diferentes meios, que variaram na composição de íons, no tipo e na concentração de fonte de nitrogênio. Os resultados mostraram que o meio SR foi o mais adequado para produção de xilanase, amilase e β -glucosidase, enquanto o meio M5 foi mais adequado para a produção de CMCase, avicelase e FPase. Carlos *et al.* (2013) descreveram uma xilanase produzida por *A. aculeatus* em meio SR. Valera *et al.* (2011) descreveram a produção de inulinases por *Aspergillus* sp em meio M5. Há ainda outros trabalhos que relatam a produção de xilanases por fungos filamentosos em meios complexos contendo compostos como extrato de levedura e/ou peptona (RIZZATTI *et al.*, 2001 e 2004; XU *et al.*, 2008).

Outro parâmetro de estudo relevante para o crescimento do micro-organismo e consequente produção de enzimas é a agitação do meio. O teste de cultivo agitado ou estático mostrou que para a produção das 6 enzimas de interesse, a condição estática foi a melhor, enquanto os parâmetros de agitação utilizados as afetaram negativamente. Segundo Büchs (2001) mais de 90% de todas as experiências em biotecnologia envolvem cultivos em frascos agitados, no entanto ele mesmo afirma que cada micro-organismo reage de maneira diferente a cada tipo de cultivo. O tipo de frasco, a sua geometria e dimensão, o tamanho, as propriedades da superfície da parede interior do frasco, o diâmetro da órbita de agitação e a frequência de

agitação são variáveis importantes que devem ser levadas em conta no processo de agitação; esses parâmetros muitas vezes levam a uma maior dificuldade na reprodutibilidade deste processo (BÜCHS, 2001).

Durante a fermentação submersa, a atividade enzimática é afetada pelo crescimento do micro-organismo. Deste modo, é crucial o monitoramento da produção enzimática ao longo do tempo de cultivo de modo a se encontrar o melhor período em que a fermentação apresenta uma maior produção da enzima de interesse. Esta variável pode estar relacionada ao nível de desconstrução do substrato, a quantidade de nitrogênio e principalmente de fonte de carbono disponível, uma vez que curtos períodos de incubação podem não resultar na produção máxima do metabólito de interesse e cultivos incubados por um longo período podem levar ao esgotamento dos nutrientes, o que ocasiona a morte celular do micro-organismo e consequentemente perda na produção enzimática (PELCZAR *et al.*, 1996; CHANG & WEBB, 2017). A partir dos experimentos realizados observou-se que o *pool* de produção xilanolítica ocorreu entre 72 e 144 horas, o de amilase ocorreu nos tempos de 96, 120 e 144 horas. β -glucosidase apresentou maior atividade em cultivos de 96 a 168 horas; CMCase de 96 a 168 horas; avicelase entre 120 e 168 horas, e FPase de 72 a 120 horas. Carmona et al. (2005) descreveram uma xilanase produzida por *A. versicolor* cuja maior produção ocorreu com 120 horas de cultivo. Jayaramu et al. (2011) descreveram uma amilase produzida por *A. versicolor* com amido como fonte de carbono com 72 horas como tempo de cultivo necessário para maior produção enzimática. Kang et al. (2004) descreveu a produção de CMCase, FPase e β -glucosidase por *A. niger* em farelo de arroz; seus resultados mostram que a maior produção de FPase ocorreu em 96 horas e CMCase e β -glucosidase em 120-144 horas de fermentação.

Visto os resultados, alguns padrões foram estabelecidos de modo a diminuir o número de variáveis, mas que não comprometessem uma boa produção das enzimas. A produção de xilanase foi padronizada mediante meio de cultivo produzido por *A. brasiliensis* em meio SR, com 96 horas; amilase e β -glucosidase a partir de cultivo com *A. versicolor* em meio SR, com 120 horas e CMCase, avicelase e FPase a partir de *A. versicolor* em meio M5, com 120 horas. A escolha de 120 horas de cultivo para produção das 3 celulases por *A. versicolor* dá preferência à produção de CMCase e FPase, cujos níveis enzimáticos são maiores que os de avicelase. Adicionalmente, CMCase, é uma importante endo-glucanase utilizada no refino da polpa de papel.

A concentração da fonte de carbono e temperatura também foram dois parâmetros estudados quanto a sua influência na produção enzimática. É fascinante a capacidade de

adaptação do metabolismo microbiano para o eficiente funcionamento em diferentes temperaturas. A adaptação térmica não pode ser atribuída a uma única característica, mas sim a diversas modificações que contribuem de maneira aditiva nesse processo (MICHELIN, 2009). A concentração da fonte de carbono, por sua vez, apresenta-se como precursora de cadeias carbônicas para a síntese de todas as estruturas celulares. Concentrações de fonte de carbono muito baixas podem não ser suficientes para uma adequada indução da produção de enzimas e concentrações muito altas podem atuar como inibidores, uma vez que este excesso pode conter outros açúcares (monossacarídeos), que apresentam maior afinidade pelos transportadores de membrana e são mais facilmente captados pelo fungo do que os componentes lignocelulolíticos maiores (KUBISEK, 2013). Ambos fatores foram investigados de forma conjunta por meio de um planejamento experimental. A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise da superfície de resposta, é uma ferramenta que fornece informações seguras sobre os processos, além de minimizar o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES & LEMMA, 2014). Os resultados obtidos nos planejamentos e as análises dos resultados, com p de 0,05 para xilanase, amilase, avicelase, FPase e β -glucosidase mostraram que os dois fatores (temperatura e concentração da fonte de carbono) apresentaram efeito significativo sobre as atividades enzimáticas. Os resultados de ANOVA demonstraram que os modelos são preditivos e estatisticamente válidos.

Neste trabalho foram otimizados os meios de cultivo para 6 enzimas (xilanase, amilase, CMCase, FPase, avicelase e β -glucosidase) com relação a 6 parâmetros importantes (micro-organismo produtor, fonte de carbono, meio de cultivo, temperatura, tempo de produção, concentração da fonte de carbono). Visto o número de variáveis encontradas para a produção de todas as enzimas, decidiu-se por estabelecer alguns padrões que possibilitassem a redução deste número, mas que ainda assim, mantivessem um padrão alto de produção enzimática. Três extratos brutos foram então estabelecidos para a obtenção das 6 enzimas de interesse. O meio denominado BSR, foi o meio otimizado para a produção de xilanase partir do *A. brasiliensis*, com 96 horas de cultivo estático, a 30°C, com bagaço de cevada (3%) em meio SR. O meio VSR foi otimizado para amilase e β -glucosidase a partir do *A. versicolor*, com 120 horas de cultivo estático, a 35°C, com bagaço de cevada (3,41%) em meio SR. O meio VM5 foi otimizado para CMCase, avicelase e FPase a partir de *A. versicolor* com 120 horas de cultivo estático, a 30°C, com bagaço de cevada (2%) em meio M5.

Realizada a otimização de cultivo para xilanase, amilase e celulasas estabeleceu-se contato com a empresa Fibria, localizada em Aracruz – ES, a qual é líder mundial na produção

de celulose de eucalipto. Esta indústria mostrou interesse quanto ao tratamento enzimático da polpa de celulose (polpa marrom) e sugeriu testes a serem realizados com a lacase, enzima lignocelulolítica. Devido a este interesse, o projeto passou a incluir esta enzima como alvo de estudo de modo a inserí-la na constituição do coquetel enzimático aplicado para os testes de biobranqueamento.

Para a produção da lacase, buscou-se na literatura por fungos produtores e meios de cultivo específicos. O trabalho de Kahraman & Gurdal (2002) apresentou uma grande produção de lacase utilizando *Trametes versicolor* como micro-organismo produtor e resíduos industriais (vinhaça e hastes de algodão) como fonte de carbono. Deste modo, baseado na produção descrita neste artigo, testes foram realizados quanto à produção da lacase com *T. versicolor*. Primeiramente, a fins de comparação com as outras enzimas estudadas, foram testados os meios de cultivo contendo bagaço de cana, bagaço de cevada e lodo branco como fonte de carbono em meio SR, por 15 dias. Posteriormente, foi testado o meio de cultivo descrito no artigo de Kahraman & Gurdal (2002), no entanto, nenhum destes 4 meios de cultivo testados foram destaque na produção. Testou-se então um meio de cultivo contendo vinhaça e algodão, o qual, por sua vez, mostrou uma maior produção de lacase. A vinhaça é um efluente originado nas usinas de cana de açúcar. É composta de 93% de água e 7% de sólidos, dos quais, aproximadamente 75% são matéria orgânica. Entre os minerais presentes em quantidade significativa encontra-se: N (0,33 – 0,48 kg/m³), P₂O₅ (0,09 – 0,61 Kg/m³), K₂O (2,10 – 3,40 Kg/m³), CaO (0,57 – 1,46 Kg/m³), MgO (0,33 – 0,58 Kg/m³), SO₄ (1,56 Kg/m³). Sendo a relação C/N de aproximadamente 15 (NICOCELLI, 2011; KORNDÖRFER & ANDERSON, 1997). O algodão cru por sua vez, além da celulose (85,5%), contém os constituintes comuns da célula vegetal, como óleo e a cera, pectinas, proteínas, compostos de nitrogênio mais simples, ácidos orgânicos, substâncias minerais (GONÇALVES et al., 2003). A composição rica em diversos minerais e matéria orgânica da vinhaça juntamente com algodão, que serviu de suporte para o crescimento do fungo, influenciaram positivamente a produção enzimática.

Adicionalmente, a vinhaça já é utilizada como um fertilizante de alto valor, devido a sua grande carga de matéria orgânica e micronutrientes oriundos da fermentação alcoólica. No entanto, quando usada em larga escala, a vinhaça pode saturar o solo e contaminar a plantação e corpos de água. Relacionado a esta difícil degradação da vinhaça devido a sua alta carga de matéria orgânica e consequentemente alta demanda química de oxigênio, España-Gamboa et al. (2017) descreveram o tratamento da vinhaça com *T. versicolor* em biorreatores como uma alternativa á limpeza (tratamento) deste resíduo. Seus resultados mostraram que o tratamento

da vinhaça por meio do crescimento e consequente produção enzimática do basidiomiceto em biorreatores esterelizados ocasionou a redução de 64% dos compostos fenólicos e 41% da demanda química de oxigênio do resíduo. Deste modo, o uso de vinhaça como meio de cultivo para a produção de lacase por *T. versicolor* além de possibilitar a produção enzimática útil para aplicações industriais como o biobranqueamento da polpa de celulose também é uma alternativa ao tratamento deste resíduo, o qual consequentemente pode ser descartado como um efluente mais limpo, colaborando com o meio ambiente.

Consta na literatura diversos trabalhos, em que a produção de lacase por fungos da podridão branca é afetada positivamente por suplementação de nitrogênio (MIKIASHVILI *et al.*, 2005; LEVIN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014). Visto esses trabalhos, foi testado o efeito da adição de 0,1% de peptona ao meio de cultivo de *Trametes versicolor*, uma vez que Mikiashvili *et al.* (2005) relataram esta fonte de nitrogênio como o melhor indutor enzimático. A adição de peptona ocasionou um aumento expressivo na produção de lacase. Desta forma o cultivo do micro-organismo para produção desta enzima neste trabalho passou a incluir este componente, o qual atuou como um fator de nutrição poderoso na regulação da produção desta enzima lignocelulolítica.

Após a otimização dos cultivos, foram realizados experimentos que caracterizassem as enzimas quanto aos parâmetros bioquímicos importantes para a aplicação industrial. O primeiro teste realizado foi quanto à temperatura ótima de atuação destas. Enzimas atuam em determinados ambientes celulares. Deste modo, condições diferentes podem resultar em maiores ou menores implicações estruturais proteicas. Diferentes faixas de temperatura podem ocasionar pequenas mudanças na conformação enzimática de modo a manter sua estrutura e função ou ocasionar perda abrupta da estrutura e, consequentemente, da função enzimática (desnaturação) (NELSON & COX, 2014). Xilanase e β -glucosidase apresentaram 70°C como temperatura ótima, amilase e CMCase 65°C, FPase e lacase 60°C, e avicelase 50°C. Farinas *et al.* (2010) descreveram, a partir de análises estatísticas, as temperaturas 35-60°C como ótimas para atividade de CMCase, xilanase e β -glucosidase de *A. niger*. Saquib *et al.* (2010) encontraram a temperatura ótima de 64,3°C para CMCase produzida por *A. fumigatus* com farelo de trigo como fonte de carbono. Watanabe *et al.* (2004) reportaram uma β -glucosidase de *A. niger* com 55°C como temperatura ótima, e Xiong *et al.* (2004) encontraram máxima atividade da xilanase de *Thermomyces lanuginosus* com 70°C. Stoilova *et al.* (2010) descreveram uma lacase produzida por *Trametes versicolor* com temperatura ótima de 30-60°C. As temperaturas ótimas ficaram entre 50 e 70°C, uma vez que o aquecimento pode influenciar

a estrutura da enzima, de modo a possibilitar uma conformação em que o sítio ativo esteja mais acessível ao substrato e assim ocasionar uma maior atividade catalítica.

A termoestabilidade pode ser definida como a retenção de atividade enzimática depois do aquecimento a determinadas temperaturas por tempos prolongados do extrato enzimático. Quanto a este parâmetro, a xilanase produzida por *A. brasiliensis* mostrou-se mais estável a 40°C e 50°C do que a 60°C. Castro et al. (1997) avaliaram a termoestabilidade de uma xilanase produzida por um *Aspergillus* termotolerante e encontraram uma atividade de 30% por até 60 minutos a 50°C. A amilase produzida por *A. versicolor* mostrou-se estável a 40°C e 50°C, com 80% de atividade por até 24 horas em ambas as temperaturas. Negi & Banerjee (2009) reportaram uma amilase produzida por *Aspergillus awamori* com t_{50} por 210 minutos a 50°C. CMCase e FPase de *A. versicolor* mostraram-se pouco estável nas três temperaturas testadas. Ao tempo em que, a avicelase, apresentou uma ativação quando exposta ao aquecimento de 40, 50 e 60°C. Outra enzima em estudo foi a β -glucosidase. Esta enzima mostrou uma ótima estabilidade a 40°C por até 24 horas, com uma atividade relativa de 80%. Monteiro (2016) descreveu uma β -glucosidase produzida por *Malbranchea pulchella* e imobilizada em Brometo de Cianogênio com atividade relativa de 60% após 24 horas a 40°C e de 20% após 24 horas a 60°C. A lacase, por sua vez, mostrou-se estável, com um t_{50} , por até 60 minutos a 50°C. A 60°C a enzima mostrou-se estável, com atividade relativa próxima de 30%, por até 240 minutos, e a 70°C apresentou 40% de atividade por 30 minutos. Stoilova et al. (2010) descreveram uma lacase produzida por *Trametes versicolor* cuja atividade decaiu 46,5% já nos primeiros cinco minutos quando exposta à temperatura de 70°C, e foi completamente inativada em 20 minutos.

Outro parâmetro utilizado para a caracterização enzimática é o pH. Pequenas variações no pH podem conferir comportamentos diferentes entre as proteínas de uma mesma classe, uma vez que o pH modifica a conformação enzimática, mantendo as ligações covalentes da cadeia polipeptídica. pH ácidos apresentam muitos H^+ livres na solução, de modo a facilitar a protonação de grupos COOH (ácidos aspártico e glutâmico) e NH_2 (lisina, histidina e arginina) das enzimas, influenciando diretamente a ligação do substrato (SILVA & SILVA, 2010). A xilanase apresentou uma faixa de pH ótimo entre 4,0 e 5,0 e 7,0 e 8,0. Amilase mostrou maior atividade em pH ácido. CMCase apresentou pH 4,0 e 4,5 como ótimos de atuação, avicelase pH 5,5, FPase pH 5,0, β -glucosidase pH 5,0 e 5,5 e lacase pH 5,0. Farinas et al. (2010) descreveram a partir de análises estatísticas a faixa de pH 4-5,5 como ótimo para atividade de CMCase, xilanase e β -glucosidase de *A. niger*. Negi & Banerjee (2009) reportaram uma amilase produzida por *A. awamori* cujo pH ótimo era 4,0. Stoilova et al. (2010) descreveram uma lacase

produzida por *T. versicolor* com farelo de trigo cuja melhor atividade foi em pH 4,5.

Quanto a estabilidade ao pH pode-se observar que a xilanase comportou-se melhor nos pH 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0. Izidoro & Konob (2014) descreveram uma xilanase de *A. niger* estável em pH 3,0 a 7,0. A amilase apresentou maior estabilidade em pH 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5. Almeida (2015) descreveu uma amilase produzida por *A. brasiliensis* que manteve atividade residual acima de 90% entre os pH 3,0 e 6,5. CMCCase, avicelase e FPase foram mais estáveis em pH ácido. Javed et al. (2009) estudaram CMCases de *A. oryzae* estáveis em pH 4,1-5,3. Valino et al. (2000) estudaram avicelases de *A. fumigatus*, as quais mostraram-se estáveis em pH 3,6-5,7. β -glucosidase apresentou maior atividade relativa quando exposta a pH ácidos 5,0 e 5,5. Liu et al. (2012) descreveram uma β -glucosidase de *A. fumigatus* estável entre os pH 3,0 a 7,0. A lacase, por sua vez, apresentou sua máxima atividade relativa em pH 4,5. Kurniawati & Nicell (2008) descreveram uma lacase produzido por *T. versicolor* estável em pH 6,0-7,0, moderadamente estável em pH 5,0 e 8,0 e instável em pH 3,0.

Na reação enzimática alguns sais e compostos são capazes de aumentar ou diminuir a atividade de determinadas enzimas, ou serem essenciais para o funcionamento destas, atuando como cofatores. As sete enzimas em estudo mostraram diferentes respostas quando íons foram adicionados à reação. CMCCase e β -glucosidase foram ativadas por K^+ , Zn^{2+} e Ba^{2+} ; CMCCase, β -glucosidase e lacase foram ativadas por NH_4^+ e Ca^{2+} ; amilase, CMCCase, β -glucosidase e lacase foram ativadas por Co^{2+} ; amilase, CMCCase e β -glucosidase foram ativadas por Al^{3+} e Fe^{2+} ; xilanase, avicelase, CMCCase e β -glucosidase foram ativadas por Mn^{2+} ; avicelase e CMCCase foram ativadas por Ag^+ ; β -glucosidase e lacase por Mg^{2+} , CMCCase por Hg^{2+} e xilanase, β -glucosidase e lacase por Cu^{2+} . As reações entre os íons e as enzimas podem formar complexos fundamentais nos sistemas. Forças eletrostáticas desempenham uma parte importante na formação de ligações (covalentes) de íons de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , resultando em complexos muito estáveis. Íons como o Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} catalisam em geral reações redox e podem participar na formação de centros enzimáticos ativos, ou como ativadores (DESAGIACOMO, 2013). Adicionalmente, a lacase foi ativada quando em solução fez-se presente o EDTA. Este composto orgânico é um quelante, o qual pode ter formado complexos estáveis com inibidores desta enzima de modo a possibilitar uma maior atividade catalítica.

Sabe-se que as enzimas de micro-organismos não são produzidas individualmente, ou seja, no meio em que foram induzidas, outras enzimas também se fazem presentes. Foi verificada a presença de CMCases, avicelases, FPases, xilanases, pectinases, amilases, arabinanases, β -glucanases, mananases, β -glucosidases, β -xilosidases, arabinofuranosidases,

lipases e celobiohidrolases nos quatro extratos brutos produzidos. A presença da lacase foi verificada apenas em seu extrato bruto específico, uma vez que basidiomicetos são os melhores produtores desta enzima. Todas estas enzimas, presentes em um coquetel enzimático, colaboram para a importante degradação/quebra da biomassa (CADETE *et al.*, 2014; RATANAKHANOKCHAI *et al.*, 2013). A ação sinérgica delas facilita, por exemplo, a degradação das hemiceluloses e lignina presentes na polpa de celulose e nos resíduos lignocelulósicos. Esta sinergia enzimática quando utilizada em processos industriais, pode colaborar ou substituir etapas altamente poluentes, como é o caso, do biobranqueamento da polpa de celulose, o qual faz uso de muitos compostos químicos prejudiciais ao meio ambiente para a obtenção de uma polpa livre de hemiceluloses e lignina. Deste modo, a aplicação prática das enzimas em estudo foi realizada no setor de branqueamento da polpa de celulose. Os primeiros testes de aplicação ocorreram com a polpa marrom proveniente da indústria de papel e celulose (Fibria) e a subsequente aplicação do coquetel enzimático desenvolvido ocorreu no bagaço de cana, bagaço de cevada e papel reciclado proveniente de escritório.

Foi utilizado um parâmetro qualitativo comum em laboratórios da indústria de papel e celulose para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a polpa marrom, o número Kappa. Esta análise permite avaliar o teor de lignina em uma pasta química de madeira. Além disso, é considerado um ótimo correspondente ao máximo rendimento de polpa branqueada em relação ao consumo de produtos químicos (DUARTE *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2017).

Os primeiros testes quanto à redução do número Kappa da polpa marrom ocorreram por meio da aplicação individual dos 5 extratos brutos, BSR, VSR, VM5, extrato da lacase e TKADAMS, sendo os 4 primeiros extratos otimizados e caracterizados neste trabalho e o TKADAMS otimizado e caracterizado, paralelamente, pelo aluno de doutorado Paulo R. Heinen. A aplicação dos 3 primeiros extratos sobre a polpa marrom não resultou em uma super redução do número Kappa quando comparados ao controle, uma vez que todos os extratos apresentavam uma coloração muito escura, a qual fora originada por componentes e pigmentos provenientes dos meios de cultivo dos micro-organismos com bagaço de cevada e que consequentemente interferiram na determinação do número Kappa. A aplicação do extrato bruto da lacase, por sua vez ocasionou a redução de 0,2 pontos no número Kappa da polpa tratada, enquanto o meio TKADAMS resultou na redução de 1,0 ponto no número Kappa, uma vez que continha 30 U/mL de xilanase bruta e sua coloração era amarelo claro. Deste modo, o meio da lacase e TKADAMS foram selecionados para os subseqüentes testes de aplicação sobre a polpa de celulose marrom.

Quanto ao extrato da lacase, foram realizados testes de imobilização desta enzima em 6 diferentes suportes, de modo a se verificar alguns parâmetros bioquímicos importantes para a aplicação enzimática, como por exemplo, a estabilidade térmica e ao pH. Foram testados os suportes: glioxil agarose, glioxil celulose, glioxil lodo, MANAE glioxil, MANAE celulose e MANAE lodo. A lacase imobilizou apenas nos suportes de MANAE, imobilizando 70% em MANAE glioxil, 68% em MANAE lodo e 56% em MANAE celulose. Testes de estabilidade foram realizados com a lacase imobilizada em MANAE glioxil para fins comparativos com a lacase bruta. No entanto, a lacase imobilizada não se mostrou muito mais estável que a bruta. A lacase bruta, como já visto mostrou-se estável a 50°C, com atividade relativa de 50% por até 60 minutos; a 60°C mostrou-se estável, com atividade relativa próxima de 30%, por até 240 minutos, e a 70°C apresentou 40% de atividade por 30 minutos. A lacase imobilizada em MANAE glioxil, por sua vez, foi estável a 50°C por até 30 minutos com atividade relativa de 30%; a 60°C foi estável por até 120 minutos com atividade relativa de 30% e a 70°C mostrou um t_{50} de 30 minutos e desnaturou em 180 minutos. Quanto a estabilidade ao pH, a lacase bruta mostrou-se mais estável após 24 horas a 25°C em pH 4 e 4,5, enquanto a imobilizada em MANAE glioxil foi mais estável em pH 5,5; 6,0 e 6,5. Estes dados de estabilidade não fazem da lacase imobilizada tão vantajosa quanto à bruta, para a aplicação. Deste modo, o uso da lacase bruta faz o processo de aplicação mais barato, já que se economiza com os gastos da imobilização, além do que o extrato bruto apresenta outras enzimas, as quais podem atuar sinergicamente sobre a polpa de celulose. Visto a importância e interesse pela lacase no biotratamento da polpa de celulose e a vantagem em se aplicar a lacase bruta, selecionou-se também o extrato desta enzima para continuação dos testes sobre a polpa marrom.

A indústria de papel e celulose vem utilizando enzimas como uma alternativa aos processos tradicionais de branqueamento da polpa de celulose, uma vez que regulamentos ambientais têm restringido o uso de compostos clorídricos neste processo (TECHAPUN *et al.*, 2003). O branqueamento da polpa celulósica corresponde a eliminação da lignina residual, a qual é responsável pela coloração marrom da polpa. Tratamentos com xilanase e lacase tornam a polpa mais permeável e a lignina mais acessível aos produtos químicos, por esta razão, o uso de enzimas no branqueamento possibilita a redução de até 20% dos químicos necessários (BIM & FRANCO, 2000).

Foram realizados testes quanto a melhor proporção entre os extratos TKADAMS e da lacase, o melhor tempo, temperatura e pH para tratamento da polpa marrom. A partir destes testes, estabeleceu-se que os melhores padrões para o coquetel enzimático seriam: 20,3 mL do

meio TKADAMS e 10 mL do meio da lacase para cada 4 gramas de polpa, 48 horas de tratamento, em pH 5,5 a 35,9°C. Com estes parâmetros foi encontrada a redução de 1,83 pontos no número Kappa da polpa marrom, correspondente a uma eficiência Kappa de 20,3%. Os parâmetros estabelecidos foram aqueles que possibilitaram a mais eficiente ação sinérgica das enzimas presentes no coquetel sobre a liberação da lignina da polpa de celulose. Betini (2016) descreveu a eficiência Kappa de 13,10% quando polpas pré-branqueadas com oxigênio foram tratadas com 10 unidades de xilanase (de *Aspergillus japonicus* – variedade *aculeatus*) por grama durante 24 horas. Rizzatti (2004) descreveu a eficiência de deslignificação de 2,84 a 9,30% de polpas de celulose tratadas por 1 hora, a 50°C, pH 5,5 com xilanases de *A. phoenicis* (8 unidades/grama de polpa). Araújo et al. (1999) verificaram uma eficiência Kappa de 11,4 e 10,5% no tratamento de polpa de celulose (por 3 horas a 60-65°C, pH 8,0) com duas xilanases comerciais (Pulzyme – Novo Nordisk e Catzyme NS-10 - Sandoz; Clariant – 0,5 unidades por grama), respectivamente. Nogueira-Peixoto et al. (2015) descreveram o tratamento da polpa de celulose com uma xilanase de *Aspergillus niveus* (10 U/g de polpa seca de celulose, durante 1 hora a 70°C) cuja eficiência Kappa foi de 39,6%; enquanto o tratamento da polpa sob estas mesmas condições com ligninases de *A. niveus* ocasionou uma eficiência Kappa de 26%. Nogueira-Peixoto et al. (2015) ainda descreveram o tratamento da polpa de celulose com um mix enzimático de xilanases e ligninases de *Aspergillus niveus*, cuja eficiência Kappa foi de 56%. Michelin (2009) relatou a diminuição de 1,1 pontos do número Kappa de polpa de celulose tratada com xilanase de *A. terricola* e aumento de 3,4 na alvura.

A eficiência do branqueamento é apresentada na literatura de forma variada, uma vez que alguns fatores impedem uma comparação mais apurada, como, por exemplo, o tipo e proveniência da polpa de celulose, estágio de obtenção da mesma, condições experimentais e variedade de organismos produtores de enzimas (BETINI, 2016).

A eficiência do tratamento enzimático com o coquetel enzimático produzido também foi observada por meio de análises da alvura e microscopia eletrônica de varredura. Houve um aumento da alvura (branqueamento da polpa) de 4,65 e percebe-se claramente por meio da microscopia eletrônica que a fibra de celulose estava intacta no controle (sem o tratamento enzimático), enquanto na amostra tratada com o coquetel enzimático houve a exposição de várias camadas de polissacarídeos, com mudanças morfológicas na superfície das fibras, como orifícios, fendas (rachaduras), filamentos e “peeling” (cascas). Resultados semelhantes foram relatados por Salles et al. (2005), Kapoor et al. (2007), Michelin (2009), Peixoto-Nogueira et al. (2015) que também realizaram estudos de microscopia de varredura para observar a

eficiência de diferentes tratamentos na polpa de celulose.

A viscosidade por sua vez, é tradicionalmente utilizada para monitorar a degradação da polpa de celulose devido a sua relação com o grau de polimerização; assim, consequentemente, este parâmetro é associado à resistência das fibras de celulose. A redução da viscosidade intrínseca da polpa tratada com relação a polpa controle foi de 190. A redução da viscosidade no tratamento enzimático da polpa celulósica está intimamente relacionada a presença de celulasas. Nos primeiros processos de branqueamento da polpa de celulose as celulasas eram indesejadas, no entanto, antes de entrar na máquina de papel as fibras precisam passar por refinadores para que sejam parcialmente desfibriladas para auxiliar na resistência da folha de papel. Hoje esse processo já é parcialmente substituído pela aplicação de celulasas na polpa branqueada (BETINI, 2016).

Os resultados aqui obtidos com o biobranqueamento da polpa de celulose são de importância industrial, uma vez que a polpa marrom utilizada corresponde aquela que é proveniente diretamente do digestor nas indústrias de papel e celulose, e a aplicação do coquetel enzimático ocasionou uma redução em seu número Kappa, o que consequentemente contribui com a redução de produtos químicos necessários nas etapas seguintes.

O coquetel enzimático desenvolvido também foi testado sobre outras três fontes de materiais passíveis de formarem polpas de celulose para a produção de papel, o bagaço de cevada, bagaço de cana de açúcar e papel reciclado proveniente de escritório. Por meio da análise de formação de açúcar redutor, ambos os bagaços foram hidrolisados pelo coquetel enzimático. O bagaço de cana apresentou um máximo de açúcar redutor (85 mg/mL) com 24 horas de tratamento, enquanto o bagaço de cana apresentou um máximo de açúcar redutor formado com 3 horas de tratamento (25 mg/mL). Como já visto anteriormente, o bagaço de cevada apresenta aproximadamente 28% de lignocelulose, enquanto o bagaço de cana de açúcar apresenta 38%. A menor quantidade de lignina e celulose do bagaço de cevada possibilitou um maior e mais facilitado acesso das enzimas aos polímeros de açúcar do resíduo, uma vez que a lignina confere rigidez, impermeabilidade e resistência à parede celular. A produção de papel a partir de bagaço de cana já é uma realidade no Brasil. Este processo dá ao bagaço de cana um destino sustentável, ao mesmo tempo em que é uma alternativa ao desmatamento, o qual teve um crescimento de 29% em 2016 com relação ao ano de 2015, uma vez que para produção de uma tonelada de papel são necessários em média duas a três toneladas de madeira. Em Lençóis Paulista, interior de São Paulo, em fevereiro de 2017 foi construída a primeira fábrica de papel a partir do bagaço de cana, denominada de FibraResist. A fabricação do papel na fábrica ocorre

por meio da aplicação de um biodispersante, que separa a lignina das fibras existentes no bagaço (DINÂMICA AMBIENTAL, 2017). Em um futuro próximo este biodispersante pode ser substituído pela aplicação de coquetéis enzimáticos, os quais atuam na quebra dos componentes lignocelulolíticos da parede celular e possibilitam assim um tratamento ainda mais limpo.

Quanto a aplicação do coquetel enzimático no papel reciclado proveniente de escritório, a atuação das enzimas ocasionou uma mudança de coloração do papel quando comparado ao controle, uma vez que o processo de destintagem do papel reciclado com o coquetel enzimático ocasionou modificação das fibras e o desalojamento das partículas de tintas da superfície de impressão. As amilases presentes no coquetel, por exemplo, podem ter contribuído para a quebra do amido adicionado na fase de refinamento do papel.

Por fim, como este trabalho visou o desenvolvimento de um coquetel enzimático que pudesse ser aplicado no processo industrial de fabricação da polpa de celulose, testou-se o cultivo do *Trametes versicolor* em biorreator para análise da possível produção enzimática em larga escala. Foi realizada uma análise inicial da produção de lacase em biorreator, sendo que a comparação desta produção em larga escala ocorreu em relação àquela encontrada em Erlenmeyer de 125 mL. Houve uma maior produção de lacase, e em menor tempo, no biorreator, uma vez que este apresentava aeração constante. A aeração no biorreator foi realizada por injeção contínua de ar comprimido e a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada por meio de um controlador de DO. O controle destes parâmetros pode ter influenciado positivamente o crescimento e consequente produção enzimática do fungo, uma vez que seu metabolismo está diretamente relacionado à quantidade de oxigênio disponível, já que este composto atua como receptor final de elétrons. Deste teste, pode-se correlacionar ainda o crescimento do fungo com a produção da lacase. A partir do teste em Erlenmeyer pôde-se determinar a concentração da biomassa formada ao longo do crescimento, o que não ocorreu com a fermentação em biorreator, pois neste cultivo o sistema era fechado de modo a não ser possível retirar alíquotas em diferentes tempos. Do meio de cultivo em Erlenmeyer pode-se analisar que o crescimento da biomassa apresentou uma fase *lag* (do primeiro ao terceiro dia), onde não houve um aumento significativo da população, seguida de uma fase *log* (do terceiro ao quarto dia), onde houve um aumento exponencial da biomassa, mostrando que nesta fase as células estavam plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e multiplicando-se; uma fase *estacionária* (do quarto ao décimo dia), na qual não houve um crescimento líquido da população, a qual é caracterizada pela síntese de vários metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas; e finalmente uma fase de declínio

(do décimo ao décimo segundo dia de cultivo), na qual a maioria das células está em processo de morte. A curva de crescimento do *T. versicolor* pode ser acompanhada pela produção da lacase, a qual começou a ser sintetizada no quarto dia (fase *lag*) e continuou a ser produzida durante a fase estacionária, tendo seu pico de produção no sétimo dia, e a partir do décimo dia, com a morte celular (fase de declínio) também foi decaindo a sua atividade.

A produção em larga escala de enzimas por meio da tecnologia de fermentação em biorreatores possibilitou o aumento da obtenção de enzimas microbianas nas indústrias de biotecnologia. Este trabalho mostra a possível transferência da produção enzimática laboratorial (em Erlenmeyer) para uma produção industrial em larga escala. Esta produção por sua vez, pode ser implementada em uma indústria de papel e celulose, visando a produção da enzima para consequente aplicação (juntamente com a xilanase em um coquetel enzimático) no biobranqueamento da polpa de celulose, acarretando um processo mais limpo e econômico.

VI. Considerações finais

Considerando os resultados obtidos durante a condução deste trabalho, pode-se concluir que:

Aspergillus versicolor, *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus tamaritii* Kita apresentaram grande potencial quanto à produção de enzimas quando comparados com outros fungos filamentosos. Estes micro-organismos produziram altos níveis de celulases e amilase (*A. versicolor*) e xilanase (*A. brasiliensis* e *A. tamaritii* Kita) utilizando bagaço de cevada como fonte de carbono. Este resíduo industrial apresentou-se como um excelente indutor enzimático, o que representa um diferencial econômico considerando o custo deste produto. Para a produção da lacase pelo basidiomiceto *Trametes versicolor*, as condições de cultivo também envolveram o uso de resíduos (vinhaça e algodão). A disponibilidade regional de resíduos agroindustriais é uma alternativa promissora para a produção de enzimas, contribuindo assim para a valorização destes resíduos, e consequentemente a diminuição do impacto ambiental causado pelo setor agroindustrial.

As enzimas estudadas apresentaram algumas propriedades físicas, em relação a temperatura e pH, bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico.

No biobranqueamento a aplicação de coquetéis enzimáticos, colabora para a importante degradação/quebra da biomassa por meio de uma ação sinérgica, facilitando assim, a degradação das hemiceluloses e lignina.

O coquetel enzimático produzido apresentou os seguintes parâmetros como ótimos para o biobranqueamento da polpa marrom: 20,3 mL do meio TKADAMS e 10 mL do meio da lacase para cada 4 gramas de polpa celulósica, pH 5,5; 35,9°C, 48 horas. A aplicação deste coquetel ocasionou a redução de 1,83 pontos no número Kappa da polpa marrom quando tratada com o coquetel desenvolvido, representando uma eficiência de 20,3% e redução de 4,65 na alvura. A aplicação de enzimas no processo de produção de polpa de celulose é uma alternativa viável e que auxilia a redução de custos, água, energia e colabora com o meio ambiente.

A aplicação do coquetel desenvolvido nos resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana e bagaço de cevada) mostrou-se promissora para biodegradação destes. Do mesmo modo que, a aplicação do coquetel nas polpas de papel reciclado ocasionou um maior destintamento.

O teste de cultivo do *Trametes versicolor* em biorreator apresentou uma produção de lacase 6,25 vezes maior do que aquela encontrada em Erlenmeyer, demonstrando a possível transposição da produção laboratorial para a escala industrial.

V. Referências Bibliográficas

ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. *Mycopathologia*. v. 12, p. 35-37, 1990.

AliceWeb - O Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet. 2017. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em 22-02-2017.

ALMEIDA, P. Z. *Diversidade do potencial aminolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de Aspergillus brasiliensis*. 2015. 138 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

ALSARRANI, A. Q. Production of mannan-degrading enzyme by *Aspergillus niger*. *Journal of Taibah University for Science*. v. 5, p. 1–6, 2011.

ALVES, F. *Modelagem e simulação de biorreator operando com fungos Trametes versicolor para produção de enzima lacase*. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá – Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2010.

ALVEZ, É. D.; PINHEIRO, O. S.; COSTA, A. O. S.; COSTA JUNIOR, E. F. Estudo do processo de obtenção celulose Kraft com ênfase no forno de cal. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 16, n. 26, p. 101-220, 2015.

ANDERSEN, B.; POULSEN, R.; HANSEN, G. H. Cellulolytic and xylanolytic activities of common indoor fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 107, p. 111-116, 2016.

ANISA, S. K.; GIRISH, K. Pectinolytic activity of *Rhizopus* sp., and *Trichoderma viride*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, v. 4, n. 2, p. 28-31, 2014.

ARAÚJO, J. H. B.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Bleaching of kraft pulp with commercial xylanases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 79, n. 1, p. 713–722, 1999.

ARO, N.; PAKUIA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

BCC RESEARCH. *Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*. 2014. Disponível em: <[http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-reach-nearly-\\$7.1-billion-2018](http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-reach-nearly-$7.1-billion-2018)>. Acesso em 22-02-2017.

BETINI, J. H. A. *Bioprospecção de fungos filamentosos e aplicação de enzimas na obtenção de bioetanol a partir do lodo branco e no biobranqueamento de polpa celulósica da indústria de papel*. 2016. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

BIM, M. A.; FRANCO, T. T. Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. *Journal of Chromatography B*, v. 743, p. 349-356, 2000.

BLUM, D. L.; LI, X. L.; CHEN, H.; LJUNGDAHL, L. G. Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 3990–3995, 1999.

BNDES & CGEE (Org.) *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p.

BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N.; HYLAND, B. P. M.; JOHNSTON, R. D.; KLEINIG, D. A.; TURNER, J. D. Forest trees of Australia over 200 of Australia's most important native trees described & illustrated. *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO)*, Australia, 1992.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E.P.S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; ALENCASTRO, R. B. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, p. 241-271, 2008.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor- caju*. *Biochemical Journal*, v. 255, p.445-450, 1988.

BOURBONNAIS, R.; ROCHEFORT, D.; PAICE, G. M.; RENAULD, S.; LEECH, D. Transition metal complexes: A new class of laccase mediator for pulp bleaching. *TAPPI Journal*, v. 83, n. 10, p. 68, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–54, 1976.

BRAVO, C. E. C.; DE CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Science and Agrotechnology*, v. 24, p. 137-152, 2000.

BRYJAK, J.; KRUCZKIEWIEZ, P.; REKUC, A.; PEEZYNSKA-CZOCH, W. Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 325–332, 2007.

BÜCHS, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, v. 7, p. 91-98, 2001.

BUSWELL, J. K.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula* (Lentinus) *edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, p. 81-88, 1995.

CADETE, R. M., FONSECA, C., & ROSA, C. A. Novel yeast strains from Brazilian biodiversity: biotechnological applications in lignocellulose conversion into biofuels. In: *Biofuels in Brazil*. p. 255-279, 2014.

CARAPITO, R.; IMBERTY, A.; JELTSCH, J. M.; BYRNS, S. C.; TAM, P. H.; LOWARY, T. L.; VARROT, A. PHALIP, V. Molecular basis of arabinobio-hydrolase activity in phytopathogenic fungi: crystal structure and catalytic mechanism of *Fusarium graminearum* gh93 exo- α -l-arabinanase. *Journal of Biological Chemistry*. v. 284, p. 12285–12296, 2009.

CARLOS, R. E.; MICHELIN, M. POLIZELI, M. L. T. M. *Parcial otimização das condições de cultivo do fungo filamentoso Aspergillus aculeatus para a produção de xilanases*. In: SIICUSP, 21º, 2013, Ribeirão Preto. Resumos... Disponível em:<<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=3410&numeroEdicao=21>>.

CARMONA, E. C.; FIALHO, M. B.; BUCHGNANI, E. B.; COELHO, G. D.; BROCHETP-BRAGA, M. R.; JORGE, J. A. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry*, v. 40, n.1, p. 359-364, 2005.

CARPITA, N. C. & GIBEAUT, D. M. Structural models of primary-cell walls in flowering plants - consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, v. 3, p. 1-30, 1993.

CASTRO, L. P. M.; TREJO-AGUIAR, B. A.; OSORIO, G. A. Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by a thermotolerant *Aspergillus* strain. *FEMS Microbiology Letters*, v. 146, p. 97–102, 1997.

CAUFRIER, F.; MERTINOU, A.; DUPONT, C.; BOURIOTIS, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydrate Research*, v. 338, n. 7, p. 687–692, 2003.

CHANG, C. W. & WEBB, C. Production of a generic microbial feedstock for lignocellulose biorefineries through sequential bioprocessing. *Bioresource Technology*, v. 22, n. 7, p. 35–43, 2017.

CHAVES B. W.; STEFANELLO, F. S.; BURIN, A. P; RITT, L. A.; NORBERG, J. L. Utilização de resíduos industriais na dieta de bovinos leiteiros. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental/Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM*, v. 18. Ed. Especial, p. 150-156, 2014.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *The International Research and Review Journal for Microscopy*, v.35, p.93–96, 2004.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira V. 3 - SAFRA 2016/17 N. 3 - Terceiro levantamento*. 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em 22-02-2017.

CREPIN, V.F.; FAULDS, C.B.; CONNERTON, I.F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, n. 6, p. 647–652, 2004.

DA SILVA MENEZES, B.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 58, 2017.

DAIHA, K. G.; BRÊDA, G. C.; LARENTIS, A. L.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V. Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community. *Brazilian Journal of Science and Technology*, v. 3, n. 17, p. 1-13, 2016.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 497–522, 2001.

DESAGIACOMO C. C. V. *Produção, purificação, propriedades funcionais e aplicação de uma poligalacturonase produzida por Neorsartorya glabra*. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

DIAS, A.; ARROJA, L. Comparison of methodologies for estimating the carbono footprint-case study of office paper. *Journal of Cleaner Production*, v. 24, p. 30-35, 2012.

DINÂMICA AMBIENTAL. *Empresa no interior de SP produz papel a partir da palha de cana*. 2017. Disponível em: <<http://www.pensamentoverde.com.br/sustentabilidade/empresa-no-interior-de-sp-produz-papel-partir-da-palha-de-cana/>>. Acesso em: 04-04-2017.

DUARTE, M. C. T.; SILVA, E. C.; GOMES, I. M. B.; PONEZI, A. N.; PORTUGAL, E. P. VICENTE, J. R. DAVANZO, E. Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus pumilus*

CBMI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for pulp bleaching improvement. *Bioresource Technology*, v. 88, p. 9-15, 2003.

EMBRAPA. *Produtor no alvo da indústria de cevada*. 2015. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2766354/produtor-no-alvo-da-industria-de-cevada>>. Acesso em: 11-03-2017.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; VICENT, T.; FONT, X.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; CANTO-CANCHÉ, B.; ALZATE-GAVIRIA, L. Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. *Journal of Biological Engineering*, v. 11, n. 6, p. 1-11, 2017.

ETHIOPIAN STANDARD. *Pulps - Determination of Kappa number*. 2012. Disponível em: <<https://archive.org/details/et.iso.302.ds.2012>>. Acesso em: 22-05-2017

FARINAS, C. S.; LOYO, M. M.; JUNIOR, A. B.; TARDIOLI, P. W.; NETO, V. B.; COURI, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

FASANELLA, C. C. *Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo*. 2012. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2012.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs). *Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: EDUCS, p. 215-244, 2004.

FERRAZ, J. M. G. *O papel nosso de cada dia*. 2009. Disponível em: <http://webmail.cnpma.embrapa.br/down_hp/408.pdf>. Acesso em: 13-03-2017.

FREESE, M.; SCHMIDT, I.; FISCHER, K. Hemicellulose composition in the outer cell wall layers of paper grade and dissolving pulp. *Macromolecular Symposia*, v. 232, n. 1, p. 13-18, 2005.

GALLARDO, O.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, M.; VALLS, C.; VALENZUELA, S. V.; RONCERO, M. B.; VIDAL, T.; DÍAS, P.; PASTOR, F. I. J. Characterization of a family GH5 xylanase with activity on neutral oligosaccharides and evaluation as a pulp bleaching aid. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 6290–6294, 2010.

GLOBO RURAL. *Primeira fábrica que produz celulose a partir da palha da cana é inaugurada em SP.* 2017. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2017/02/globo-rural-primeira-fabrica-que-produz-papel-a-partir-da-palha-da-cana-e-inaugurada-em-sp.html>>. Acesso em 11-03-2017.

GONÇALVES, D. C. S.; FREITAS, D. O.; SOUTO, K. K. O.; BARBOSA, R. X.; FERREIRA, T. R. *Fibras celulósicas.* 2003. Disponível em: <<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/fibras-celulosicas%20juta.pdf>>. Acesso em: 01-04-2017.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; Md ARSHAD, M. K.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H. HASHIM, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed Research International*, v. 2017, p. 1 – 9, 2017.

HARRIS, D. & DEBOLT, S. Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnology Journal*, v. 8, p. 244-262, 2010.

HEINEN, P. R.; PEREIRA, M. G.; RECHIA, C. G. V.; ALMEIDA, P.Z. MONTEIRO, L. M. O.; PASIN, T. M.; MESSIAS, J. M.; CEREIA, M.; KADOWAKI, M. K.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M.L.T.M. Immobilized endo-xylanase of *Aspergillus tamaraii* Kita: an interesting biological tool for production of xylooligosaccharides at high temperatures. *Process Biochemistry*, v. 53, p. 145–152, 2017.

HILTERHAUS, L.; LIESE, A.; KETTLING, U.; ANTRANIKIAN, G. *Fundamental science to industrial applications*. 1ª ed. Applied Biocatalysis, 2016. 446 p.

HIMMEL, M. E.; DING, S.-Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, v. 315, p. 804–807, 2007.

HUBBE, M. A.; METTS, J. R.; HERMOSILLA, D.; BLANCO, M. A.; YERUSHALMI, L.; HAGHIGHAT, F.; LINDHOLM-LEHTO, P.; KHODAPARAST, Z.; KAMALI, M.; ELLIOTT, A. Wastewater treatment and reclamation: A review of pulp and paper industry practices and opportunities. *BioResources*, v. 11, n. 3, p. 7953-8091, 2016.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. *Produtos: Papel*. 2015. Disponível em: <<http://iba.org/pt/produtos/papel>>. Acesso em: 13-03-2017.

IBARRA, D. MONTE, M. C.; BLANCO, A.; MARTINEZ, M. J. Enzymatic deinking of secondary fibers: celulasas/hemicelulasas versus laccase-mediator system. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 39, p. 1-9, 2012.

IOELOVICH, M. & LEYKIN, A. Structural investigations of various cotton fibers and cotton celluloses. *BioResources*, v.3, p. 170-177, 2008.

IZIDORO, S. C.; KNOB, A. Production of xylanases by an *Aspergillus niger* strain in wastes grain. *Biological Sciences*, v. 36, n. 3, p. 313-319, 2014.

JAVED, M. R.; RASHID, M. H.; NADEEM, H.; RIAZ, M. PARVEEN, R. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzaecmc-1*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.157, n. 3, p. 483–497, 2009.

JAYARAMU, M.; RAFIK, M.; MANJULA, M. K., SIDDALINGESHWARA K. G.; DAYANANDA K. S.; JAYASIMHA G. B.; DWARAKANATH V. Amylase synthesis in elevated level by optimizing fermentation parameters from *Aspergillus versicolor*.

International Journal of Research and Reviews in Pharmacy and Applied Sciences, v. 1, n. 4, p. 341-346, 2011.

JOSHI, G.; NAITHANI, S.; VARSHNEY, V. K.; BISHT, S. S.; RANA, V. Potential use of waste paper for the synthesis of cyanoethyl cellulose: A cleaner production approach towards sustainable environment management. *Journal of Cleaner Production*, v. 142, part 4, p. 3759–3768, 2017.

KAHRAMAN, S. S.; GURDAL, I. H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 215–217, 2002.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S.W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 153–156, 2004.

KAPOOR, M.; KAPOOR, R. K.; KUHAD, R. C. Differential and synergistic effects of xylanase and laccase mediator system (LMS) in bleaching of soda and waste pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 305-317, 2007.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. *Química da madeira*. 3. ed., Curitiba, FUPEF, 2005. 85 f.

KORNDORFER, G. H.; ANDERSON, D. L. Use and impact of sugar cane – alcohol residues vinasse and filter cake on sugarcane production in Brazil. *Sugar y Azucar*, 1997.

KUBISEK, C. P. *Fungi and lignocellulosic biomass*. Ames: Willey-Blackwell, 2013. 288 p.

KURNIAWATI, S.; NICELL, J. A. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 16, p. 7825-7834, 2008.

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

LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 12, p. 4554-4563, 2010.

LIN, J. S.; MING-YA, T.; JOHN, F.F. Fractal analysis of cotton cellulose as characterized by small-angle x-ray scattering the structures of cellulose. In: ATALLA, R. *The structure of cellulose*. American Chemical Society, 1987, p. 233-254.

LISPERGUER, J.; PEREZ, P.; URIZAR, S. Structure and thermal properties of lignins: characterization by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 54, p. 460-463, 2009.

LITTLE, M. K. & GARDNER, A.W. Coppicing ability of 20 *Eucalyptus* species grown at two high-altitude sites in South Africa. *Canadian Journal of Forest Research*. v. 33, n. 2, p. 181–189, 2003.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y.; SHEN, Q. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microbial Cell Factories*, v.11, n. 1, 2012.

MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. N. Developments in application of enzymes for textile processing. *Journal of Cleaner Production*, v.145, p. 114–133, 2017.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARÃES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, v. 1, p. 44-49, 2015.

MAITY, C.; GHOSH, K.; HALDER, S. K.; JANA, A.; ADAK, A.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Xylanase isozymes from the newly isolated *Bacillus* sp. CKBx1D and optimization of its deinking potentiality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 5, p. 1208-1219, 2012.

MARKET AND MARKETS. *Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022* 2016. 2016. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>>. Acesso em 22-02-2017.

MARTÍNKOVA, L.; KOTIK, M.; MARKOVÁ, E.; HOMOLKA, L. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere*, v.149, p. 373-382, 2016.

McILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparasions. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 49, p. 185-186, 1921

MICHELIN, M. *Potencial dos fungos Aspergillus terrícola e Aspergillus ochraceus no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas*. 2009. 212 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2009.

MIKIASHVILI, N.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S.; NEVO, E. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*, *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 955–959, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONTEIRO, L. M. O. *Estudo bioquímica de β -glucosidases de *Malbranchea pulchella* e aplicações na hidrólise de resíduos agroindustriais e de antocianinas*. 2016. 130 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

MYCOBANK. *Aspergillus tamarii* Kita. 2016. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=11570&Fields=All>>. Acessado em 02-03-2017.

NASCIMENTO, K. B. M.; MARTINS, A. G. R.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus sp* isolado do solo da caatinga de Pernambuco. *E-xacta*, Belo Horizonte, v. 7, n. 1, p. 95-103, 2014.

NEGI, A.; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*, v. 42, n. 4, p. 443-448, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger princípios de Bioquímica*. 6ªed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250 p.

NICOCELLI, L. M. *Sorção ao potássio de diferentes materiais submetidos à aplicação de vinhaça*. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Ambiental) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

NOVACANA. *Uso da vinhaça na cultura da cana-de-açúcar*. 2013. Disponível em: <<https://www.novacana.com/cana/uso-vinhaca-cultura/>>. Acesso em: 22-03-2017.

NOVOZYME. *Enzymes at work*. Disponível em:< <http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures>>. Acesso em: 07-04-2016.

PANDEY, A. & SOCCOL, C. R. Economic utilization of crop residues for value addition: A futuristic approach. *Journal of Scientific & Industrial Research INDIA*, p.12-22, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnology potential of 52 agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.

PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H. K.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S. Identification of thermostable β -xilosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 734-748, 2007.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; MICHELIN, M.; CARVALHO, C. C.; LUCCA, A. L.; VICI, A. C.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Laccase production by *Aspergillus niveus* on SSF using wheat bran as alternative carbon source and its synergistic

effect on pulp biobleaching using a mix of laccase/xylanase from the same microorganism. *Journal of Biochemical Technology*, v. 6, p. 929-937, 2015.

PELCZAR, M. J. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. São Paulo: Makron Books, 1996.

PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1033, p. 243-249, 1990.

PÉREZ, J.; MUNOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T. D. L. R.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.

PINHEIRO, D. J. L. L.; VICENTE, J. S.; SILVA, M. E.; SOUZA, M. S. A.; SALLES, P. C. O.; SESTARI, R. C. A. *Importância da reciclagem do papel para o desenvolvimento sustentável - produção de papel reciclado com fibra secundária de bagaço de cana de açúcar*. Janus, Lorena, n. 18, p. 53-62, 2013.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *The Journal of Biological Chemistry*, U.S.A., v. 277, p. 37663-37669, 2002.

PIRRALHO, M.; FLORES, D.; SOUSA, V. B.; QUILHÓ, T.; KNAPIC, S.; PEREIRA, H. Evaluation on paper making potential of nine *Eucalyptus* species based on wood anatomical features. *Industrial Crops and Products*, v. 54, p. 327–334, 2014.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCE, F. H.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, p. 577-591, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M.; VICI, A.C.; SCARCELLA, A. S. A.; CEREIA, M.; PEREIRA, M. G. Enzyme system from *Aspergillus* in current industrial uses and future applications in the

production of second-generation ethanol. In: GUPTA, V. K. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2016, p. 127-137.

PRADE, R. A. Xylanases: From biology to biotechnology. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, v. 13, p. 101-131, 1995.

PRATES, E. T. *Dinâmica molecular de hidrolases para sacarificação de celulose e proteína correlatas*. 2013. 186 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 2013.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. *Os Reinos dos Fungos - Volume 2*. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2002. 829 p.

RAVINDRAN, R. & JAISWAL, A. K. Comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 92–102, 2016.

RATANAKHANOKCHAI, K.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; AACHAAPAIKOON, C.; KYU, K. L.; SAKKA, K.; MORI, Y. *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/howtoreference/biomass-now-cultivation-and-utilization/paenibacillus-curdlanolyticus-strain-b-6-multienzyme-complex-a-novel-system-for-biomass-utilization>>. Acesso em: 03-04-2017.

RIBEIRO, L. F. C. *Estudo de enzimas do fungo Malbranchea pulchella para potencial aplicação em biorrefinaria*. 2014. 143 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, v.24, p. 219-226, 2006.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V., POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -Dxylosidase produced by

thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 26, p.156-160, 2001.

RIZZATTII, A. C. S. *Propriedades regulatórias e funcionais do sistema xilanolitico do fungo Aspergillus phoenicis*. 2004. 148 p. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

RODRIGUES, M. I.; LEMME, A. F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 3ª Ed – Campinas, SP: Casa dos Espíritos Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014. 352 p.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, v. 454, p. 841-845, 2008.

SAHA, B. C. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v.18, n. 5, p. 403-423, 2000.

SALLES, B. C.; MEDEIROS, R. G.; BÃO, S. N.; SILVA J. R, F. G. FILHO, E. X. F. Effect of cellulase-free xylanases from *Acrophialophora nainiana* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on eucalyptus kraft pulp. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 343-349, 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potential of sugarcane straw for ethanol production. *Química Nova*, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SAQUIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry*, v. 45, p. 641–646, 2010.

SAUVAGEAU, G. & FRAYRET, J. M. Waste paper procurement optimization: An agent-based simulation approach. *European Journal of Operational Research*, v. 242, n. 3, p. 987-998, 2015.

SEABRA, J. E.; TAO, L.; CHUM, H. L.; MACEDO, I. C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, n. 8, p. 1065-1078, 2010.

SILVA, A. P. M.; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. A. R. Fertigation with vinasse in sugarcane crop: Effect on the soil and on productivity. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.18, n.1, p. 38-43, 2014.

SILVA, D. O.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, v. 5, p. 859-865, 2005.

SILVA, M. G. da. *Produtividade, idade e qualidade de madeira de Eucalyptus destinados à produção de polpa celulósica branqueada*. 2011. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, S. N. & SILVA, C. R. R. *Técnico em alimentos*. Recife: EDUFRPE, 2010. Disponível em:<<http://200.17.98.44/pronatec/wp-content/uploads/2013/06/Embalagem.pdf>>. Acessado em 31-11-14.

SIROTEK, K.; MAROUNEK, M.; RADA, V.; BENDA, V. Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria. *Folia Microbiológica*, v. 46, n. 1, p.79-82, 2001.

SOREK, N.; YEATS, T. H.; SZEMENYEI, H.; YOUNGS, H.; SOMERVILLE, C.R. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. *BioScience*, v. 64, n. 3, p. 192–201, 2014.

SOUSA, H. M. P. D. *Aplicação de celulasas e xilanases na reciclagem de fibras de papel*. 2002. 409f. Tese (doutorado). Universidade do Minho – Braga, 2002.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STANCHEV, V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v.1, p. 208-215, 2010.

Successful Farming. *Valor de produção da agricultura cresceu 5,6% em 2015, diz IBGE*. 2016. Disponível em: < <http://sfagro.uol.com.br/valor-de-producao-cresceu-em-2015-ibge/>>. Acesso em: 23-05-2017.

SUHAS, GUPTA, V. K.; CARROTT, P. J. M.; SINGH, R.; CHAUDHARY, M.; KUSHWAHA, S. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent, *Bioresource Technology*, v. 216, p. 1066–1076, 2016.

SUNNA A. & ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 17, p. 39–67, 1997.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycology*, v. 81, p. 234-240, 1989.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose-free xylanases produced from agricultural waste and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1327-1340, 2003.

TORQUEMADA GUERRA, R. S. KANAGAVA, A. L.; SANTOS, C. F.; SILVA, F. S.; SOUSA, F. B.; CAVALCANTE, G. A.; LUBENOW, J. A.; SILVA, M. B.; NEVES, M. A.; MENEZES, R. *C569 Caderno CB Virtual 2*. João Pessoa: Ed. Universitária, 2011, 610 p.: II.

TORRE, C. L. D. & KADOWAKI, M. K. Thermostable xylanase from thermophilic fungi: biochemical properties and industrial applications. *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 2, p. 28-33, 2017.

TULL, D. & WITHERS, S. G. Mechanisms of cellulases and xylanases - a detailed kinetic study of the exo-beta-1,4-glycanase from cellulomonas-fimi. *Biochemistry*, v. 33, p. 6363-6370, 1994.

VALERA, L. S.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES L. H. S. *Estudo de inulinases produzidas por fungos filamentosos*. In: SIICUSP, 19º, 2011, Ribeirão Preto. Resumos... Disponível em:<<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2050&numeroEdicao=19>>.

VALINO, E.; MEDINA, I.; DUSTET, J.; CUBAN J. Characterization and optimization of the exo beta 1-4 glucanase enzyme of the *Aspergillus fumigatus* 155 v cellulolytic fungus strain. *Agricultural Science Research Journal*, v. 34, p. 227-236, 2000.

VARGA, J.; KACSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MUIJER, M.; SAMSON, R. A. *A. brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *A.* species with worldwide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 5, p. 1925-1932, 2007.

VLASENKO, E.; SCHULEIN, M.; CHERRY, J.; XU, F. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. *Bioresource Technology*, v.101, p. 2405-2411, 2010.

VOGEL, H. F. Distribution of lisine pathwas among fungi: evolutionary implications. *The American Naturalist*, v. 98, p. 435- 446, 1964.

VOGEL, J. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p. 301-307, 2008.

WANG, F.; HU, J. H.; GUO, C.; LIU, C. Z. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 62-65, 2014.

WATANABE, T.; SATO, T., YOSHIOKA, S.; KOSHIJIMA, T.; KUWAHARA, M. Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *European Journal of Biochemistry*, v. 209, p. 651–659, 1992.

WETZEL, F. H.; ELLIOT, J. H.; MARTIN, A. F. Variable shear viscometers for cellulose intrinsic viscosity determination, *TAPPI*, v. 36, p. 564–571, 1953.

WISEMAN, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ltd John Wiley & Sons, editors. p.148, 1975.

WU, M.; BECKHAM, G.T.; LARSSON, A.M.; ISHIDA, T.; KIM, S.; PAYNE, C.M.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M. F.; HORN, S. J.; WESTERENG, B.; IGARASHI, K.; SAMEJIMA, M. STÅHLBERG, J.; EIJSINK, V. G. H.; SANDGREN, M. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the Basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, p. 12828–12839, 2013.

XIONG, H.; NYSSÖLÄ, A.; JÄNIS, J.; PASTINEN, O.; VON WEYMARN, N.; LEISOLA, M.; TURUNEN, O. Characterization of the xylanase produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 93–99, 2004.

XU, Y. X.; LI, Y. L.; XU, S. C.; LIU, Y.; WANG, X.; TANG, J. W. Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 9, n. 7, p. 558 – 566, 2008.

YUAN, Z.; WEN, Y.; KAPU, N. S.; BEATSON, R.; MARTINEZ, D. M. A biorefinery scheme to fractionate bamboo into high-grade dissolving pulp and ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, v.10, n. 38, 2017.

VI. Anexos

ANEXO I

Meio SR

Solução de sais SR [20X]	5,0 mL
Extrato de levedura	0,45 g
Peptona	0,02 g
Fonte de Carbono	1 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Solução de sais SR [20X]

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,24 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Meio Adams

Peptona	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,05 g
Fonte de Carbono	1 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Meio Vogel

Solução de biotina	20,0 µL
--------------------	---------

Solução de sais de Vogel [50X] 2,0 mL

Fonte de Carbono 1 g

Água deionizada q.s.p. 100 mL

Solução de biotina

Biotina 5,0 mg

Etanol 50% 100 mL

Solução de sais de Vogel [50X]

Citrato de sódio pentahidratado 150,0 g

NH_4NO_3 100,0 g

KH_2PO_4 250,0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10,0 g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 5,0 g

Solução de traços de elementos 5,0 mL

Clorofórmio 2,0 mL

Água deionizada q.s.p. 1000 mL

Solução de traços de elementos

Ácido cítrico monohidratado 5,0 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5,0 g

$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1,0 g

CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0,05 g
Clorofórmio	0,2 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Meio Khanna

Solução de sais de Khanna [20X]	5 mL
Extrato de levedura	0,1 g
Fonte de Carbono	1 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Solução de sais de Khanna

NH ₄ NO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	1,3 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,362 g
KCl	0,098 g
ZnSO ₄ . H ₂ O	0,007 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,0138 g
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0,0066 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0062 g

Água deionizada q.s.p.	100 mL
------------------------	--------

Meio Czapek

NaNO ₃	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
KCl	0,05 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O	0,001 g
Extrato de levedura	0,1 g
Fonte de carbono	1 g
Água destilada q.s.p	100mL

Meio M5

Extrato de levedura	0,6 g
Peptona	0,1 g
CaCO ₃	0,1 g
NaCl	0,1 g
Acetato de amônio	0,6 g
Fonte de carbono	1 g
Água deionizada	100 mL

ANEXO II

Meio SDB

Peptona	0,4 g
Glicose	0,1 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

ANEXO III

Corante blue silver (500 mL) – até 0,1 µg de proteína (BSA)

*Com 15% de ácido fosfórico

75 mL de água

52 mL (ou 88 g de ácido fosfórico)

50 g de sulfato de amônio

0,6 g de Coomassie Blue G-250

água qsp 400 mL

100 mL de metanol ou etanol

Realizar a preparo do corante sempre sob agitação:

1. Numa proveta de 1000 mL ou 500 mL dissolver o ácido fosfórico na água e após acrescentar o sulfato de amônio (15 min).
2. Adicionar aos poucos 0,6 g de Coomassie Bllue G-250 (cobrir a proveta com plástico e papel alumínio – para evitar luz (1 hora).
3. Acrescentar água até ~350 mL e deixar 12 horas ou mais, até que todo (ou quase todo) o corante seja dissolvido (etapa importante).
4. Completar o volume para 400 mL com água e adicionar 100 mL de metanol ou etanol (1 hora).
5. Filtrar 2 – 3 vezes em papel de filtro e acondicionar em frasco âmbar.

Validade de 06 meses (temperatura ambiente).

Coloração:

1. Após corrida, lavar o gel 3 vezes em água (5-10 minutos cada lavagem) se for SDS-PAGE (pois o SDS atrapalha na coloração com Coomassie Blue)
2. Fixar o gel em 50% de etanol 2% ácido - para 100 mL de fixador: 50 mL de etanol + 1,5 mL de ácido fosfórico + água qsp 100 mL (fixar 1-12 horas)
3. Lavar o gel 1 vez em 50% etanol (10 minutos) e 1 vez em 30% etanol (10 minutos).
4. Lavar o gel 2 vezes em água (1 minuto)
5. Colocar o Blue Silver e deixar corando por 6-12 horas
6. Lavar com água destilada para retirar o excesso de corante do gel (até 4 horas).
7. Manter em geladeira.

*A fixação é optativa, mas melhora a resolução da coloração.

ANEXO IV

Número Kappa – Fator de correção para um consumo de 50% de KMnO_4

F	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
30	0.958	0.958	0.958	0.958	0.958	0.959	0.959	0.959	0.959	0.959
31	0.960	0.960	0.960	0.960	0.960	0.961	0.961	0.961	0.961	0.961
32	0.962	0.962	0.962	0.962	0.962	0.963	0.963	0.963	0.963	0.963
33	0.964	0.964	0.964	0.964	0.964	0.965	0.965	0.965	0.965	0.968
34	0.966	0.966	0.966	0.966	0.966	0.967	0.967	0.967	0.967	0.967
35	0.968	0.968	0.968	0.968	0.968	0.969	0.969	0.969	0.969	0.979
36	0.970	0.970	0.970	0.970	0.971	0.971	0.971	0.972	0.972	0.972
37	0.973	0.973	0.973	0.973	0.973	0.974	0.974	0.974	0.974	0.974
38	0.975	0.975	0.975	0.975	0.975	0.976	0.976	0.976	0.976	0.976
39	0.977	0.977	0.977	0.977	0.977	0.978	0.978	0.978	0.978	0.978
40	0.979	0.979	0.979	0.979	0.979	0.980	0.980	0.980	0.980	0.980
41	0.981	0.981	0.981	0.981	0.981	0.982	0.982	0.982	0.982	0.982
42	0.983	0.983	0.983	0.983	0.983	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984
43	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.986	0.986	0.986	0.986	0.986
44	0.987	0.987	0.987	0.987	0.987	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988
45	0.989	0.989	0.989	0.989	0.989	0.990	0.990	0.990	0.990	0.990
46	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.992	0.992	0.992	0.992	0.992
47	0.994	0.994	0.994	0.994	0.994	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995
48	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.997	0.997	0.997	0.997	0.997
49	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
50	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.001	1.001	1.001	1.001	1.001
51	1.002	1.002	1.002	1.002	1.002	1.003	1.032	1.003	1.036	1.003
52	1.004	1.004	1.004	1.004	1.004	1.005	1.005	1.005	1.005	1.005
53	1.006	1.006	1.006	1.006	1.007	1.007	1.007	1.008	1.008	1.008
54	1.009	1.009	1.009	1.009	1.009	1.010	1.010	1.010	1.010	1.010
55	1.011	1.011	1.011	1.011	1.011	1.012	1.012	1.012	1.012	1.012
56	1.013	1.013	1.013	1.013	1.013	1.014	1.014	1.014	1.014	1.014
57	1.015	1.015	1.015	1.015	1.015	1.016	1.016	1.016	1.016	1.016

ANEXO V

Número Kappa – Fator de correção da Temperatura

Temperatura (°C)	Fator de correção
10	1,1950
10,5	1.1885
11	1.1820
11,5	1.1755
12	1.1690
12,5	1.1625
13	1.1560
13,5	1.1495
14	1.1430
14,5	1.1365
15	1.1300
15,5	1.1235
16	1.1170
16,5	1.1170
17	1.1040
17,5	1.0975
18	1.0910
18,5	1.0845
19	1.0780
19,5	1.0715
20	1.0650
20,5	1.0585
21	1.0520
21,5	1.0455
22	1.0390
22,5	1.0325
23	1.0260
23,5	1.0195
24	0.0130
24,5	1.0065
25	1.0000
25,5	0.9935
26	0.9870
26,5	0.9740
27	0.9675
27,5	0.9610
28	0.9545
28,5	0.9545
29	0.9480
29,5	0.9415
30	0.9350