

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PÓS - GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

TESE DE DOUTORADO

CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA

PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDAS
POR *Trichoderma reesei* LCB 48 NA FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA
DA PALMA FORRAGEIRA.

CAMPINA GRANDE

2014

CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA

PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDAS
POR *Trichoderma reesei* LCB 48 NA FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA
DA PALMA FORRAGEIRA.

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de
Processos da Universidade Federal de
Campina Grande, como parte dos
requisitos necessários para obtenção
do grau de Doutor.

Orientadora: Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

CAMPINA GRANDE

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S725p Sousa, Carlos Alberto Bispo de.
 Produção e recuperação de celulasas produzidas por *Trichoderma reesei*
 LCB 48 na fermentação semissólida da palma forrageira / Carlos Alberto
 Bispo de Sousa. – Campina Grande, 2014.
 139 f. : il. color.

 Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal
 de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.

 "Orientação: Prof.^a Dr.^a Líbia de Sousa Conrado Oliveira".
 Referências.

 1. Hidrólise. 2. Purificação. 3. Concentração. 4. Celulase. 5. SAB.
 I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado. II. Título.

CDU 66.094.941(043)

CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA

PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDAS POR
Trichoderma reesei LCB 48 NA FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DA PALMA
FORRAGEIRA.

Área de concentração: Desenvolvimento de processos

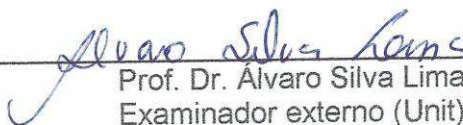
Data da defesa: 28 / 11 / 2014

Resultado: Aprovado

Banca Examinadora



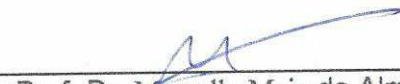
Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Orientadora (UAEQ/UFCG)



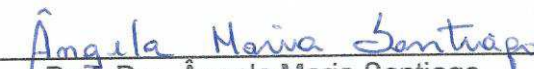
Prof. Dr. Álvaro Silva Lima
Examinador externo (Unit)



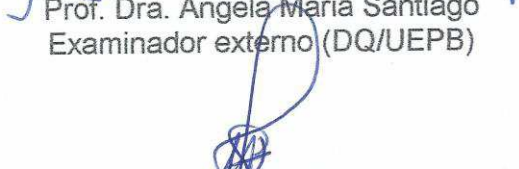
Prof. Dr. Vimário Simões Silva
Examinador interno (UAEQ/UFCG)



Prof. Dr. Marcello Maia de Almeida
Examinador externo (DESA/UEPB)



Prof. Dra. Ângela Maria Santiago
Examinador externo (DQ/UEPB)



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador externo (CT/UFPB)

*A meus pais: Genésio e
Terezinha*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a UFCG, por me proporcionar mais essa etapa de minha formação acadêmica e a todas as pessoas que fizeram parte do meu dia-a-dia durante esta pesquisa. Inicialmente, agradeço aos colegas do LEB e do grupo de pesquisa, como Bia, Siumara, Ângela, Diogo, Segundo e tantos outros que comigo colaboraram com sua experiência, apoio e companheirismo.

À minha orientadora Líbia de Sousa Conrado, pelos seus ensinamentos, amizade, orientação e, principalmente, por ter mais uma vez confiado e incentivado meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores que avaliaram este trabalho em suas diversas etapas, cujos ensinamentos práticos, apoio e atenção contribuíram para uma melhor condução desse trabalho de pesquisa.

Ao Professor Antônio Gilson, coordenador deste programa.

Ao técnico de laboratório Jardes Caiçara, pelo apoio e amizade recebidos.

À minha querida esposa, Livinha.

Ao professor Álvaro Lima, da Unit, pelo treinamento recebido em sistemas bifásicos.

À CAPES, pelo financiamento concedido e, por fim, agradeço ao Deus que creio, de onde emana toda a ciência, sabedoria e vida do Universo, sem o qual nada seria possível.

“Estamos no caminho que parte dos primeiros princípios ou no que se dirige a eles?”

Platão.

RESUMO

A demanda por fontes de energia renovável tem crescido em todo o mundo. Nesse contexto, o bioetanol obtido a partir da hidrólise de materiais lignocelulósicos tem merecido destaque. Porém, a produção das enzimas celulolíticas usadas nesse processo é de custo elevado, e este é o principal empecilho para a obtenção do etanol celulósico em grande escala. O objetivo deste estudo foi produzir enzimas celulolíticas destinadas a produção de bioetanol, a partir da fermentação semissólida da biomassa da palma forrageira pelo fungo filamentoso *Trichoderma reesei* LCB 48. O estudo da fermentação revelou que a melhor condição foi atingida com umidade inicial de 90% e suplementação de 1% de fonte de nitrogênio. A atividade máxima foi alcançada em 110 horas de processo, com produção de 6,45 U/gds. O estudo de lixiviação das enzimas produzidas revelou como as melhores condições do processo: a relação solvente/substrato de 20g/ml, agitação de 50rpm e tempo de contato de 15 minutos, na qual obteve-se extratos brutos com 15,14 U/gds expressa em carboximetilcelulase (CMCase). As enzimas recuperadas na lixiviação exibiram atividade CMCase ótima em temperatura de 55°C e pH ótimo entre 4,0 e 5,0. Estudos de estabilidade mostraram que a enzima é desativada em valores de pH superiores a 6,5 e temperaturas superiores a 50°C. Ensaio de hidrólise utilizando a própria biomassa da palma e o resíduo da fermentação como material lignocelulósico apresentaram respectivamente produtividade máxima de 334,4 mg/L.h e 308 mg/L.h de glicose em 4 horas de processo. Foi realizado um estudo de partição das enzimas obtidas utilizando sistemas aquosos bifásicos. O SAB composto por 18% Peg 4000 e 12% citrato de sódio em pH 5,0 resultou em um fator de purificação de 5,31 para a CMCase e 61,4 para celobiase. Para FPase o fator de purificação foi de 2,29 quando a concentração de citrato usada foi de 16%. A biomassa da palma mostrou-se viável tanto para a obtenção das enzimas celulasas quanto para a obtenção de açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol. Os SABs mostraram-se promissores como etapa inicial de um processo de recuperação e purificação das celulasas produzidas.

palavras-chave: purificação, concentração, celulase, sistema aquoso bifásico.

ABSTRACT

The demand for renewable energy has grown worldwide. In this context, bioethanol obtained from the hydrolysis of lignocellulosic materials has been highlighted. However, the production of cellulolytic enzymes used in the hydrolysis process is costly, and this is the main obstacle for obtaining cellulosic ethanol on a large scale. This study was designed to produce cellulolytic enzymes production of bioethanol from biomass semisolid fermentation of forage cactus by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* LCB 48. The study revealed that the best fermentation condition was achieved with 90 % humidity and supplementation 1% of the nitrogen source. The maximum activity was achieved in 110 hours of process, with production of 6.45 U/gds. The study of leaching of enzymes produced revealed as the best process conditions: solvent substrate ratio of 20mL/ g, 50 rpm of agitation and contact time of 15 minutes, which was obtained in crude extracts with 15.14 U/gds expressed in carboxymethylcellulase (CMCase). The crude extract was stable for up to 20 days when stored at room temperature. The enzymes recovered in the leaching exhibited CMCase activity at optimal temperature of 55 ° C and optimum pH between 4.0 and 5.0. Stability studies showed that the enzyme is deactivated at pH values above 6.5 and temperatures above 50 ° C. Hydrolysis assays of pear cactus biomass itself and the residue fermenting lignocellulosic material presented as maximum yield of 334.4 mg/Lh and 308 mg/Lh of glucose in 4 process hours respectively. A study ds enzymes obtained using aqueous two-phase partition systems was carried out. SAB composed of 18 % PEG 4000 and 12% sodium citrate at pH 5.0 resulted in a purification factor of 5.31 to 61.4 for CMCase and cellobiase. FPase for the purification factor was 2.29 when the concentration of citrate used was 16%. Biomass palm proved to be feasible for both obtaining the cellulase enzymes as to obtain fermentable sugars to bioethanol production. The SABs proved promising as an initial step in a process of recovery and purification of cellulases produced.

keywords: purification, concentration, cellulase, biphasic aqueous system

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Palma Forrageira (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill).....	19
Figura 2.2- Estrutura lignocelulósica.....	22
Figura 2.3- Diagrama representativo do conceito de biorrefinaria apresentando o potencial de valor agregado dos produtos	23
Figura 2.4- Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.....	26
Figura 2.5- Fluxograma de um processo de FSS típico.....	32
Figura 2.6- Série de Hofmeister.....	35
Figura 2.7- Extração em batelada em SAB.....	40
Figura 2.8- Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.....	41
Figura 2.9- Curvas binodal de sistemas PEG/Citrato obtidos usando diferentes valores de PEG e Tampão citrato.....	42
Figura 2.10- Esquema de um processo de bioconversão de lignocelulose em etanol.....	43
Figura 3.1- Etapas do projeto de pesquisa desenvolvidas neste trabalho.....	52
Figura 3.2- Etapas do processo de obtenção da biomassa.....	53
Figura 3.3- Etapas do estudo do processo fermentativo da biomassa da palma forrageira.....	58
Figura 4.1- Distribuição granulométrica das biomassas da palma integral e da palma lavada.....	77
Figura 4.2- Acompanhamento cinético da produção de CMC _{Case} na fermentação semissólida da palma integral	79
Figura 4.3- Aspecto dos extratos brutos recolhidos em cada ensaio da PI.....	83
Figura 4.4- Influência das variáveis fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na fermentação da biomassa da palma integral (PI).....	84
Figura 4.5- Produção de CMC _{Case} em função da adição de fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na fermentação da biomassa da palma integral (PI).....	85
Figura 4.6- Digrama de Pareto mostrando a influências das variáveis adição de fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na produção de CMC _{Case} na fermentação semi-sólida da biomassa da palma lavada (PL).....	87

Figura 4.7. Produção de CMCase em função da adição de fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na fermentação semissólida da biomassa da palma lavada (PL).....	88
Figura 4.8 Influência dos parâmetros testados na extração de CMCase.....	91
Figura 4.9. Atividade CMCase em função da agitação e relação (A);Tempo de contato e relação (B); e tempo de contato e agitação (C).....	94
Figura 4.10. Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	97
Figura 4.11. Efeito do pH na atividade enzimática.....	97
Figura 4.12. Atividade residual do extrato após inoculação em diferentes valores de pH.....	99
Figura 4.13. Atividade residual do extrato após inoculação a diferentes valores de temperatura.....	100
Figura 4.14. Ensaio de hidrólise da biomassa da palma e do resíduo da fermentação semissólida pelas enzimas obtidas na fermentação.....	102
Figura 4.15. Superfícies de resposta mostrando a influência dos parâmetros testados no fator de purificação da CMCase (FP_t): A = Influencia da massa molar de peg (M PEG) e composição de citrato (% Citrato), B= Influencia do pH e composição de citrato. C= Influencia do pH e massa molar de PEG (M PEG)...	109
Figura 4.16. Influências dos parâmetros testados no fator de purificação de FPases	112
Figura 4.17 - Superfícies de resposta mostrando a influência dos parâmetros testados no fator de purificação da FPase (FP_t): A = Influencia do pH e composição de citrato B= Influência da massa molar de peg (MPeg) e composição de citrato (% Citrato), C= Influência do pH e massa molar de PEG (MPeg)....	114
Figura 4.18. Contribuição das variáveis testadas no fator de purificação da celobiase.....	118
Figura 4.19. Superfícies de resposta mostrando a influência dos parâmetros testados no fator de purificação da FPase (FP_t): A = Influência do pH e massa molar de PEG (MPeg), B= Influencia do pH e composição de citrato, C= Influência da massa molar de peg	

(M PEG) e composição de citrato (% CITRATO)..... 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Composição química da palma forrageira expressa em g/Kg de matéria seca	19
Tabela 2.2- Constituintes minerais da Palma Forrageira	20
Tabela 2.3- Agentes precipitantes.....	35
Tabela 2.4- Partição de biomoléculas em SABs.....	38
Tabela 3.1- Composição básica do meio de cultura	59
Tabela 3.2- Níveis do planejamento experimental	61
Tabela 3.3- Matriz do planejamento experimental fatorial 2 ² com três repetições	61
Tabela 3.4- níveis do planejamento experimental da lixiviação	64
Tabela 3.5- Matriz do planejamento experimental fatorial 2 ² com três repetições no ponto central	65
Tabela 3.6- Matriz de planejamento para o estudo dos SABs	68
Tabela 3.7- Valores decodificados utilizados no planejamento	69
Tabela 4.1- Caracterização das biomassas (base seca).....	73
Tabela 4.2- Avaliação da influência da lavagem, adição de nitrogênio e umidade na obtenção de CMCCase.	81
Tabela 4.3- Análise de variância ANOVA para os resultados do planejamento experimental da fermentação com a biomassa da palma integral (PI)	85
Tabela 4.4- Análise de variância ANOVA para os resultados do planejamento experimental da fermentação com a biomassa da palma lavada (PL)	88
Tabela 4.5- Resultados obtidos na variação dos parâmetros agitação (Ag), tempo de contato (tc) e relação solvente/substrato (Re) na extração da CMCCase produzida	90
Tabela 4.6 - Análise de variância ANOVA para os ensaios de extração.....	92
Tabela 4.7 - Resultados das atividades CMCases obtidas para as relações solvente/substrato testadas.....	93
Tabela 4.8 - Atividade recuperada por precipitação com etanol	95
Tabela 4.9- Valores de Atividade celulolítica e AR do extrato empregado na hidrólise.....	101
Tabela 4.10- Produtividade de AR durante o processo de hidrólise da biomassa	

da palma e do resíduo da fermentação semissólida.....	103
Tabela 4.11- Características do extrato usado nos ensaios de partição.....	104
Tabela 4.12- Parâmetros de partição para a enzima CMCase.....	105
Tabela 4.13- ANOVA para o fator de purificação da CMCase	108
Tabela 4.14- Parâmetros de partição para a FPase.....	110
Tabela 4.15- Anova para o fator de purificação de FPase.....	113
Tabela 4.16- Atividade em celobiase	115
Tabela 4.17- Teste F para o fator de purificação de celobiase	118
Tabela 4.18- Condições operacionais dos ensaios com maior fator de purificação (FP).....	120
Tabela 4.19- Condições operacionais dos ensaios com maior coeficiente de partição enzimática (K) e recuperação na fase superior (Y_t).....	122

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 O SEMIÁRIDO.....	18
2.2 A PALMA FORRAGEIRA.....	18
2.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	21
2.4 BIORREFINARIAS.....	22
2.5 PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	24
2.6 CELULASES	25
2.7 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DAS CELULASES.....	26
2.8 OBTENÇÃO DE CELULASES.....	27
2.9 PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	29
2.9.1 Processos em superfície	29
2.9.2 Processos submersos	30
2.9.3 Fermentação semissólida	30
2.10 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	32
2.10.1 Recuperação das enzimas obtidas por fermentação semissólida	33
2.10.1.1 Extração sólido - líquido.....	34
2.10.1.2 Recuperação de proteínas por precipitação.....	35
2.11 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.....	38
2.11.1 Diagrama de fases	40
2.11.2 Partição de enzimas em sistemas aquosos bifásicos ...	43
2.12 FATOR DE RECUPERAÇÃO E DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	44
2.13 ESTADO DA ARTE.....	45
3 MATERIAL E MÉTODO	52
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	52
3.1.1 Matéria-prima	53
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	54
3.2.1 Granulometria	54
3.2.2 Massa específica aparente	54
3.2.3 Massa específica real	55
3.2.4 Porosidade	55
3.2.5 pH	55
3.2.6 Cinzas	55
3.2.7 Umidade	56
3.2.8 Sólidos solúveis totais (°Brix)	56
3.2.9 Açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)	56
3.2.10 Determinação da concentração de celulose	57
3.3 O PROCESSO FERMENTATIVO.....	57
3.3.1 Microrganismo e inóculo	58
3.3.2 Restabelecimento da umidade da biomassa	60
3.3.3 Substrato e cultivo semissólido	60

3.3.4 Extração das enzimas.....	62
3.3.5 Determinação da atividade do complexo celulolítico.....	62
3.3.6 Determinação das condições operacionais da lixiviação....	64
3.3.7 Concentração do extrato bruto por precipitação.....	65
3.3.7.1 Precipitação com solvente orgânico.....	66
3.3.7.2 Precipitação com sulfato de amônio.....	66
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS.....	67
3.4.1 Determinação da temperatura ótima da atividade enzimática	67
3.4.3 Determinação do pH ótimo da atividade enzimática.....	67
3.5 PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DO EXTRATO UTILIZANDO SABS.....	68
3.6 AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS DE PURIFICAÇÃO.....	69
3.6.1 Determinação dos coeficientes de partição dos SABS.....	69
3.6.2 Avaliação dos processos de purificação.....	69
3.6.3 Determinação do teor de proteínas	71
3.7 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA DA PALMA	71
3.7.1 - Material lignocelulósico e pré-tratamento.....	71
3.7.2 Sacarificação enzimática e fermentação alcoólica	72
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	73
4.2 - FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.....	78
4.2.1 Acompanhamento cinético.....	78
4.2.2 - Avaliação da lavagem da biomassa, da umidade e da adição de fonte de nitrogênio.....	80
4.3 - EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS.....	89
4.3.1 - Recuperação de enzimas por precipitação.....	95
4.3.1.1 - Precipitação com etanol.....	95
4.3.1.2 - Precipitação com Sulfato de amônio.....	96
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS	97
4.4.1 Temperatura ótima da atividade CMC _{Case}	97
4.4.2 pH ótimo.....	97
4.4.3 Estabilidade enzimática frente ao pH.....	99
4.4.4 Estabilidade enzimática da CMC _{Case} frente à temperatura	100
4.5 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA DA PALMA.....	101
4.6 PARTIÇÃO DE CELULASES POR MEIO DE SABS.....	104
4.6.1 – Atividade de CMC _{Case}	105
4.6.2 - Atividade em FPase.....	110
4.6.3 - Atividade em Celobiase.....	115
4.7 – AVALIÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DOS SABS	120
5- CONCLUSÃO.....	123
Referências bibliográficas.....	125

1 INTRODUÇÃO

A grande maioria dos processos industriais destinados à produção de combustíveis e de produtos químicos é alimentada por fontes de energia fóssil (carvão, óleo e gás natural) cuja utilização é insustentável em longo prazo, uma vez que são de natureza não renovável, com reservas limitadas e sua utilização é apontada como a principal causa de alterações climáticas e poluição ambiental. Tais fatores são motivo de preocupação para a economia global e têm incentivado pesquisas no mundo inteiro que buscam obter insumos e fontes alternativas de energia limpa e renovável, valorizando as potencialidades econômicas de cada região do globo, principalmente no que diz respeito à produção de biomassa.

Nesse contexto, o conceito de biorrefinaria, uma unidade produtora com o objetivo de substituir produtos e processos baseados em fontes de matéria-prima não renováveis por produtos e processos que utilizem a biomassa como matéria-prima, aproveitando todo o seu potencial econômico e energético ganha cada vez mais força, principalmente pela disponibilidade de diversos tipos de biomassa e pela diversidade de produtos e utilidades que podem ser obtidas a partir dessa matéria-prima.

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) é uma planta característica de regiões semiáridas, destinada principalmente à alimentação animal em períodos de estiagem. Trata-se de uma biomassa amplamente disponível nessas regiões, cujas potencialidades econômicas ainda não são muito exploradas. O desenvolvimento de processos industriais utilizando a palma forrageira como matéria-prima pode agregar valor à cultura, pois a biomassa da palma, em especial os cladódios da planta, pode ser utilizada na obtenção de bioetanol e enzimas além da extração de substâncias destinadas à elaboração de fármacos e artigos de química fina.

No que diz respeito à produção de bioetanol, tal processo ainda não é economicamente viável pois a clivagem da celulose presente na biomassa para produção de açúcares fermentescíveis é promovida por enzimas celulasas, de custo elevado. Os custos estão intimamente ligados à produtividade das enzimas, geralmente de origem fúngica, e da atividade enzimática final recuperada no extrato fermentado bruto. A produção de celulase é, portanto o fator chave da hidrólise de material celulósico e é essencial para tornar o processo de conversão de materiais lignocelulósicos em bioetanol viável.

Portanto, é necessário o desenvolvimento de processos fermentativos que produzam extratos fermentados com alta concentração de celulasas, elevada atividade enzimática e estabilidade, além do grau de pureza requerido para a aplicação a qual se destina. Além disso, uma boa recuperação das enzimas produzidas no processo fermentativo é um fator determinante para sua aplicação industrial.

Os processos de purificação enfrentam uma forte demanda na intensificação e integração das diversas etapas do processo de forma a aumentar o rendimento, reduzir o tempo de operação e os custos de produção. Operações que integram os três passos clássicos do processo de recuperação (separação sólido-líquido, concentração e isolamento primária de produtos) em uma só unidade de operação tem recebido atenção especial por reduzirem o número de etapas necessárias para o processo de purificação e promoverem alta recuperação com maior economia, quando comparadas a técnicas tradicionais.

A utilização de sistemas aquosos bifásicos (SABs) é referida como um processo adequado para purificação de enzimas, uma vez que permite a obtenção de rendimentos elevados em curtos espaços de tempo e com baixos custos.

Diante do exposto, este trabalho se propõe estudar a obtenção de enzimas celulasas produzidas pelo fungo filamentoso *Trichoderma Reesei* LCB 48 em processo de fermentação semissólida, utilizando os claudódios da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) como suporte e fonte de nutrientes. Além disso, serão estudadas a recuperação das celulasas produzidas e sua purificação por meio de sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol e citrato de sódio. Também será avaliada a aplicabilidade da biomassa da palma e do resíduo da fermentação na produção de açúcares fermentescíveis.

Tais estudos pretendem fornecer informações operacionais que possam servir de base para o desenvolvimento de processos produtivos em uma biorrefinaria, que convertam a biomassa da palma forrageira em insumos com maior valor agregado; demonstrando a aplicabilidade da biomassa da palma forrageira na cadeia produtiva de bioetanol.

1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, recuperar, purificar e verificar a aplicabilidade de enzimas celulasas obtidas pela fermentação semissólida da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar a biomassa da palma
- 2- Obter extrato fermentado bruto, produzido pela fermentação semissólida da biomassa da palma forrageira.
- 3- Verificar a possibilidade de recuperação das enzimas por lixiviação e precipitação por sal ou solvente.
- 4- Caracterizar as enzimas obtidas quanto ao pH ótimo e temperatura ótima
- 5- Verificar a aplicabilidade do complexo enzimático produzido para a hidrólise de material lignocelulósico.
- 6- Estudar a purificação das enzimas celulasas em SABs do Tipo PEG-Citrato selecionando as condições operacionais mais adequadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O SEMIÁRIDO

O Semiárido brasileiro, com área de aproximadamente 1 milhão de Km², abrange quase todos os Estados da Região Nordeste, exceto o Maranhão, além de parte dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. A região tem aproximadamente 21 milhões de habitantes, o que representa 46% da população nordestina e 13% da população brasileira distribuídas em 1.162 municípios. O clima predominante na região semiárida nordestina brasileira é o tropical seco com a evaporação excedendo a precipitação, com ocorrência de pequenos períodos de chuvas sazonais (COUTINHO *et al.*, 2013).

Dentre as Regiões do Brasil, o Nordeste é a que tem apresentado maior crescimento econômico nos últimos anos. Entretanto, os indicadores sociais da área rural permanecem baixos, pois trata-se de um crescimento assimétrico, concentrado nos centros urbanos (ALBUQUERQUE, 2012). Portanto, a região ainda é a mais vulnerável às mudanças no clima.

De acordo com Suassuna (2002), no desenvolvimento de tecnologias agrícolas para o Semiárido - entendidas aqui como aquelas fixadoras do homem no campo – deve-se ter em mente um ponto fundamental: a exploração da capacidade de suporte da região. Neste sentido, o Semiárido tem uma riqueza enorme de plantas adaptadas ao ambiente seco que poderiam ser economicamente exploradas, por exemplo: catolé, faveleira, marmeleiro e oiticica como produtoras de óleos; pinhão e maniçoba para obtenção de látex; carnaúba para extração de ceras; bromeliáceas para obtenção de fibras; babosa e juazeiro para produção de fármacos; árvores frutíferas como o umbuzeiro e, de um modo geral, as forrageiras.

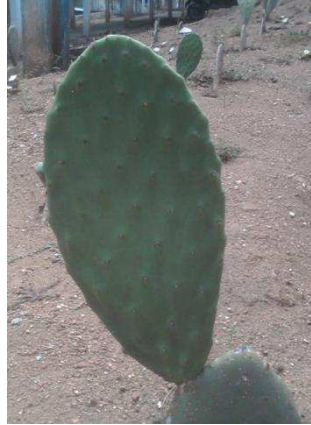
Portanto, é possível, com o uso de tecnologias apropriadas e o desenvolvimento de processos produtivos para explorar adequadamente os potenciais naturais do Semiárido, fornecer alternativas econômicas e produtivas para a região, gerando renda e agregando valor aos recursos existentes.

2.2 A PALMA FORRAGEIRA

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill), apresentada na Figura 2.1, é uma planta característica de regiões semiáridas, onde é cultivada principalmente para

alimentação de ruminantes em épocas de estiagem (BARACHO; SILVA; NETO, 2009; BEZERRA *et al.*, 2012).

Figura 2.1 - Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill)



A planta produz frutos e cladódios comestíveis, podendo ser utilizada também na alimentação humana. Devido às suas propriedades medicinais, a palma pode ser utilizada como antioxidante, agente anti-inflamatório e na prevenção de úlceras (LEE *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2000; GALATI *et al.*, 2001).

A Tabela 2.1 mostra a composição química de palma forrageira, expressa em g/kg de matéria seca.

Tabela 2.1 - Composição química de palma forrageira expressa em g/Kg de matéria seca.

Itens	<i>Opuntia spp.</i>	<i>Nopalea cochenilifera</i>
Matéria seca (g/kg MN)	99,2 ±18,8	101,4 ±17,3
Matéria orgânica	863,7 ±19,3	845,7 ±24,5
Proteína bruta	58,8 ±5,9	41,9 ±9,9
Nitrogênio não protéico	13,8 ±7,8	11,7 ±6,4
Extrato etéreo	18,0 ±2,7	16,5 ±0,8
Carboidratos totais	786,0 ±28,0	778,7 ±19,3
Fibra em detergente neutro	257,7 ±11,1	240,1 ±21,1
Fibra em detergente ácido	157,2 ±15,9	122,7 ±11,3
Amido	148,0 ±12,3	175,3 ±38,3
Ácido galacturônico	73,5±6,4	69,0
Açúcares totais (g/kg MS)	102,3 ±6,3	113,5 ±15,7

(Fonte: Batista, Carvalho e Rocha Filho, 2013)

A Tabela 2.2 contém as quantidades dos constituintes minerais presentes na palma forrageira.

Tabela 2.2- Constituintes minerais da palma forrageira

Itens	<i>Opuntia spp.</i>	<i>Nopalea cochenilifera</i>
Oxalate (g/kg)	2,19 ±1,56	1,95
Ca (g/kg)	29,19 ±10,01	39,2±25,17
P (g/kg)	2,42 ±1,40	3,51±3,52
Mg (g/kg)	10,34±2,27	13,55±4,88
K (g/kg)	10,29±4,88	8,64
Na (mg/kg)	31,43±21,9	60
Zn (mg/kg)	44,33±21,86	26
Fe (mg/kg)	62,5±4,95	65
Cu (mg/kg)	8,5±0,71	9
Mn (mg/kg)	94,5±12,02	62

Fonte: Batista, Carvalho e Rocha Filho (2013).

A cultura da palma tem sido um importante recurso para a criação de gado em regiões áridas e semiáridas em diversos países, tais como Estados Unidos, México, África do Sul, Brasil e Austrália, por dispor de características morfológicas e fisiológicas apropriadas a essas regiões (TEIXEIRA *et al.*, 1999; BEZERRA *et al.*, 2012).

No Nordeste Brasileiro, principalmente no Estado de Pernambuco, são cultivadas duas espécies de palma, a *Opuntia ficus-indica* Mill, com as cultivares Gigante e Redonda, e a *Nopalea cochenilifera* Salm Dyck, cuja cultivar é a palma Miúda ou Doce (FERREIRA *et al.*, 2003). Estas espécies foram introduzidas no Brasil ainda na época do Império, por determinação de Dom João VI, para a criação da cochonilha do carmim (*Coccus cati*), que produz um corante natural, muito valorizado naquela época. Como a atividade não prosperou, a cactácea passou a ser utilizada como planta ornamental, até que fosse descoberta sua grande aplicação como forrageira (DOMINGUES, 1963).

Um projeto do INSA (Instituto Nacional do Semiárido) lançado em abril de 2012, procura revitalizar a cultura da palma forrageira por meio da divulgação, pesquisa e inovação utilizando variedades resistentes à Cochonilha-do-carmim, que tem provocado danos socioeconômicos, principalmente nos Estados da Paraíba e Pernambuco. A finalidade do projeto é inserir esta cultura como uma proposta de política pública sustentável. As primeiras ações do INSA foram focadas na prática de revitalização da cultura da palma forrageira no Semiárido, por meio da realização de

pesquisas científicas com as variedades resistentes (INSA, 2013). O projeto pretende fortalecer a palma forrageira como cultura nobre e de importância econômica a partir de variedades resistentes à praga, fornecendo subsídios para políticas públicas direcionadas à produção agroecológica.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos trabalhos de pesquisa que tiveram por objetivo agregar valor à cultura da palma e melhorar suas características nutricionais. Araújo *et al.* (2008), por exemplo, promoveram o enriquecimento proteico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. Baracho; Silva e Torres Neto (2009) estudaram a obtenção de etanol a partir da biomassa da palma por meio de hidrólise ácida, como alternativa ao etanol obtido da cana de açúcar, para ser produzido em regiões áridas ou semiáridas.

Além de aplicações na alimentação animal e na produção de biocombustíveis, existem alguns estudos sobre a utilização da palma como matéria-prima em bioprocessos, visando à produção de compostos orgânicos de interesse industrial por fermentação semissólida, tais como amiloglucosidase (SANTANA *et al.*, 2012) e celulasas (SANTOS *et al.*, 2011).

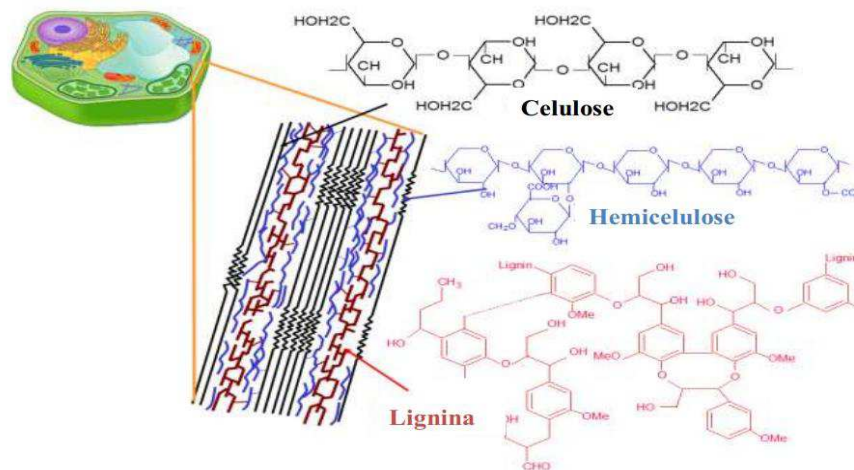
2.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Denomina-se biomassa qualquer tipo de matéria orgânica proveniente de fontes vegetais ou animais. São recursos renováveis, formados periodicamente, e não tem o tempo como fator limitante à produção, como acontece com os combustíveis fósseis (MALAJOVICH, 2011).

A biomassa lignocelulósica compreende os resíduos agroindustriais e a matéria orgânica provenientes diretamente de fontes vegetais ou resultantes de seu processamento. O aproveitamento e reciclagem de tais resíduos podem reduzir os problemas ambientais resultantes de sua disposição inadequada na natureza, agregar valor aos subprodutos da agroindústria e valorizar os recursos naturais ou culturas de determinada região. As estratégias de aproveitamento da biomassa lignocelulósica incluem processos de gaseificação, métodos de produção de calor e eletricidade (cogeração), recuperação de energia de resíduos sólidos urbanos e gás de aterros sanitários, produção de biomoléculas de interesse industrial; e a obtenção de bioetanol, que visa diminuir a utilização de combustíveis fósseis, assunto de grande interesse na atualidade (LIU *et al.*, 2011; GOLDEMBERG, 2009).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos de estruturas duras e fibrosas, compostas principalmente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (aproximadamente 70% da massa seca), intercalados por lignina, uma macromolécula composta de álcoois aromáticos. A lignina encontra-se fortemente unida aos polissacarídeos por ligações covalentes e hidrogênicas. Dependendo da origem do vegetal, podem ser encontrados nos materiais lignocelulósicos pequenas quantidades de resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais de cálcio, potássio e magnésio (LEE, 1997; NEUREITER *et al.*, 2002). A Figura 2.2 exibe a estrutura lignocelulósica.

Figura 2.2 - Estrutura lignocelulósica



(Fonte: Zampieri, 2011)

Os processos que empregam a biomassa lignocelulósica na elaboração de produtos e insumos são desenvolvidos de forma se obter aproveitamento máximo da biomassa com o mínimo de custo em unidades produtivas denominadas biorrefinarias.

2.4 BIORREFINARIAS

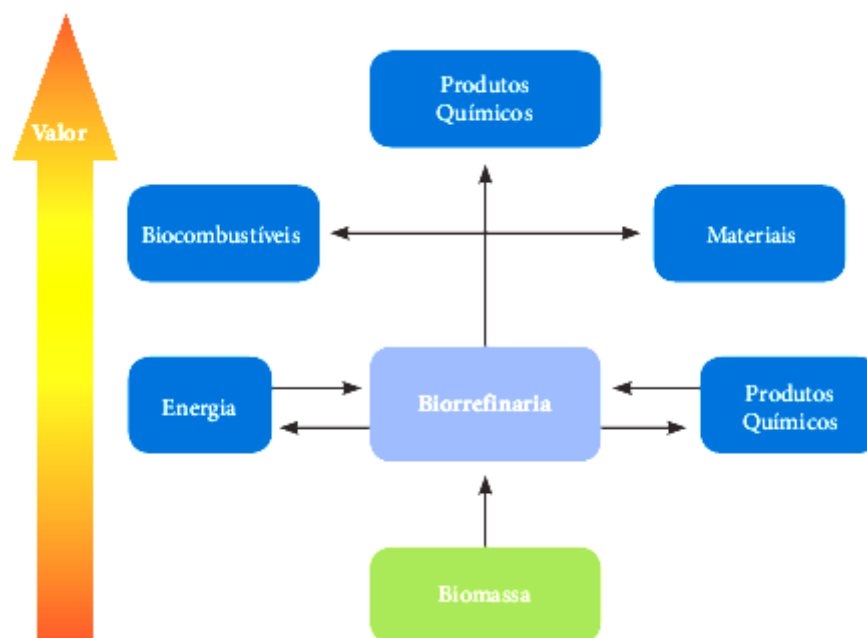
As biorrefinarias estão inseridas nos planejamentos de PD&I (Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação) de grande parte dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, mobilizando esforços públicos, privados e investimentos direcionados ao aproveitamento otimizado das matérias-primas, com a

finalidade de agregar valor às cadeias produtivas da biomassa e reduzir possíveis impactos ambientais das mesmas (VAZ JÚNIOR, 2011).

Biorrefinaria é uma unidade produtiva que integra a geração de energia e produtos de valor agregado elevado a partir de biomassa. Dentro do conceito de biorrefinaria, a biomassa é convertida em uma variedade de produtos, com pouco desperdício e emissões, trazendo novas oportunidades de ganho. Na biorrefinaria ocorre o aproveitamento integral de recursos renováveis tais como: celulose, hemicelulose, lignina, pectina, taninos, amido, ácidos graxos, colágeno, quitosana, corantes naturais e outros constituintes químicos, na obtenção de energia, produtos químicos, biomateriais e alimentos (FERNANDO *et al.*, 2006), podendo integrar, em um mesmo espaço físico, processos de obtenção de biocombustíveis, produtos químicos, energia elétrica e calor (VAZ JUNIOR, 2011).

A Figura 2.3 destaca o potencial econômico dos produtos de uma biorrefinaria.

Figura 2.3- Diagrama representativo do conceito de biorrefinaria apresentando o potencial de valor agregado dos produtos



(Fonte: Vaz Junior, 2011)

O processo da biorrefinaria envolve um conjunto de rotas tecnológicas capazes de fracionar, extrair, separar e converter a matéria-prima em diferentes produtos

intermediários ou finais, maximizando os ganhos econômicos, minimizando os impactos ambientais, e melhorando a eficácia e sustentabilidade das cadeias agroindustriais.

Os produtos químicos desenvolvidos a partir de coprodutos e resíduos são os que possuem maior potencial em agregar valor às cadeias produtivas da biomassa, em função da participação estratégica da indústria química no fornecimento de insumos e produtos finais a diversos setores da economia, como: petroquímico, farmacêutico, automotivo, construção civil, agronegócio, cosméticos, etc. (VAZ JUNIOR, 2011).

2.5 PRODUÇÃO DE BIOETANOL

O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol do mundo. A produção de etanol no Brasil baseia-se na fermentação alcoólica da sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar. Nos Estados Unidos, o etanol é obtido a partir da hidrólise enzimática do amido de milho, gerando a glicose, que é fermentada a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os casos possuem tecnologias e os mercados já maduros e consolidados. O etanol produzido por meio desses processos é conhecido como “etanol de primeira geração” (1G), enquanto processos que utilizem a matéria-prima lignocelulósica resultam no chamado “etanol de segunda geração” (2G) (MOLINARI *et al.*, 2011).

As etapas para um processo de produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica são os seguintes: hidrólise da hemicelulose (via ácida ou enzimática); separação da celulose sólida, da lignina e dos açúcares produzidos; hidrólise ácida ou enzimática da celulose, produzindo glucose e lignina; fermentação dos açúcares produzidos e separação do bioetanol por destilação. A lignina obtida no processo pode ser utilizada para produção de energia por meio da sua queima (LUIZ JR *et al.*, 2009).

As tecnologias existentes para a obtenção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos, envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis para posterior fermentação alcoólica. O processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, baseadas na utilização de rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

A rota ácida é uma tecnologia já bem conhecida, porém tem como desvantagens a geração de substâncias tóxicas, como o hidroximetilfurfural, e grande dificuldades

técnicas em se recuperar o açúcar produzido a partir do ácido. Já a hidrólise enzimática, na qual os materiais lignocelulósicos são hidrolisados em açúcares fermentescíveis através da ação da enzima celulase, além de ser um processo mais eficiente, é conduzida sob condições ambiente, e não gera nenhum tipo de resíduo tóxico (OGEDA; PETRI, 2012).

As enzimas celulases são imprescindíveis para a utilização da rota enzimática na conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis e a aplicabilidade industrial deste processo depende da produção dessas enzimas em larga escala.

2.6 CELULASES

As celulases são um grupo de enzimas hidrolíticas capazes de promover a hidrólise de celulose natural ou modificada por pré tratamentos em carboidratos menores, como unidades de glucose (DAMISA; KUTA; ADABARA, 2013).

Quanto a região de atuação no substrato celulósico, as celulases são divididas em três grupos:

Endoglucanases (EC 3.2.1.4): Tem como nome sistemático 1,4- b-D-glucana-4-glucano-hidrolase. Sua atuação promove de forma aleatória a hidrólise de regiões internas da estrutura amorfa da fibra de celulose, promovendo a liberação de oligossacarídeos com diversos graus de polimerização, o que resulta em rápida solubilização do polímero celulósico. É, portanto, a enzima que inicia o processo de hidrólise (LYND *et al.*, 2002; CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Exoglucanases. São enzimas que atuam na região externa da celulose. Compreendem a glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) e a celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91).

A glucano-hidrolase tem por nome sistemático 1,4- b-D-glucana-glucano-hidrolase. Apesar de pouco citada, representa uma importante estratégia na hidrólise da fibra celulósica, pois sua atuação promove a liberação de glicose diretamente do polímero (LYND *et al.*, 2002).

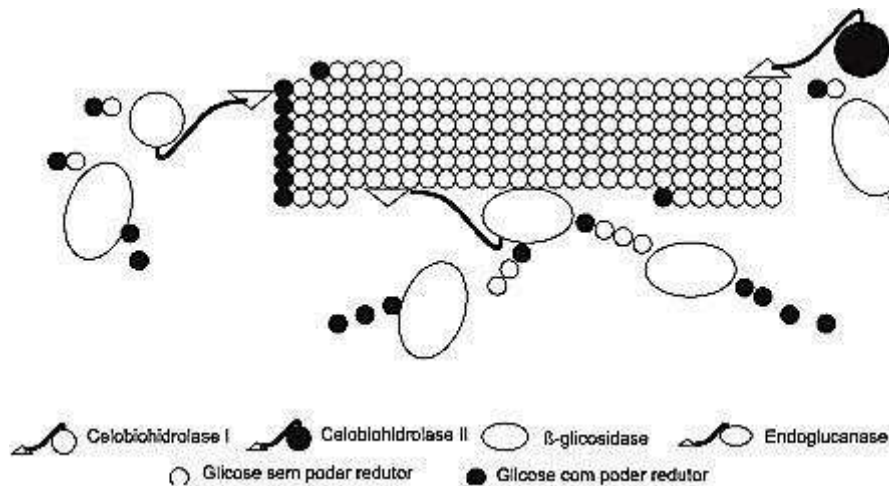
A celobio-hidrolase, cujo nome sistemático é 1,4-b -D-glucana-celobio-hidrolase, participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pelo fenômeno da amorfogênese, que promove a desestratificação das fibras por meio de ruptura física do substrato, aumentando as regiões intersticiais e transformando as regiões cristalinas do polímero em amorfas. Dessa forma, a taxa de hidrólise da celulose aumenta, pois o polímero fica mais exposto à ação das celulases. A celobio-hidrolase pode ser dividida ainda em dois tipos: O tipo I hidrolisa terminais redutores e o tipo II hidrolisa terminais

não redutores. Tais enzimas são inibidas pelo seu produto de hidrólise (celbiose). (OHMIYA *et al.*, 1982; CASTRO; PEREIRA JR 2010).

β -glicosidase (EC 3.2.1.21). Tem como nome sistemático b-glicosídeo gluco-hidrolase. Promove a hidrólise da celbiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Assim como a celbio-hidrolase, também pode sofrer inibição por seu produto de hidrólise. (LYND *et al.*, 2002).

As enzimas do complexo celulolítico quando atuam em conjunto apresentam sinergismo, isto é, apresentam um rendimento maior do que a soma dos rendimentos individuais, caso atuassem isoladamente (CASTRO; PEREIRA JR 2010). Tal atuação está esquematizada na Figura 2.4.

Figura 2.4- Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico



(Fonte: Castro e Pereira Jr, 2010)

2.7 IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DAS CELULASES

Atualmente, as enzimas celulolíticas para fins comerciais são produzidas a partir de fungos filamentosos como o *Trichoderma reesei*, o primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial de celulase, e que permanece ainda como a fonte mais utilizada, tendo passado por processos de seleção e mutação ao longo dos anos com o objetivo de aumentar sua produtividade. Além de celulases fúngicas, existem também celulases produzidas por via bactérias aeróbias e anaeróbias (OGEDA; PETRI, 2010).

Nos últimos 30 anos, a demanda de celulases para processos industriais tem aumentado consideravelmente em todo o mundo (AKCAPINAR; GUL; SEZERMAN, 2012). Tal interesse é devido à possibilidade de utilizar as enzimas do complexo

celulolítico na conversão da biomassa lignocelulósica disponível para a produção de carboidratos, destinados à numerosas aplicações industriais (DAMISA; KUTA; ADABARA, 2013).

Na indústria têxtil, as celulasas são utilizadas no processamento de fibras celulósicas com o objetivo de obter tecidos de melhor qualidade e dar efeitos de acabamento em peças tingidas. As celulasas também encontram ampla aplicação na indústria de alimentos, papel e celulose, detergentes domésticos, preparados enzimáticos, entre outros (BHAT, 2000; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Uma aplicação que vem ganhando destaque nos últimos anos é a utilização de celulasas para bioconversão de biomassa agrícola e materiais lignocelulósicos em geral em bioetanol. Nesse processo é promovida a hidrólise da biomassa lignocelulósica para conversão da celulose em glicose que se trata de um açúcar diretamente fermentescível pela levedura produtora do etanol (OGEDA;PETRI, 2010).

2.8 OBTENÇÃO DE CELULASES

Na natureza há diversos microrganismos, tais como fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, além de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces* e *Cellulomonas*; que produzem enzimas capazes de catalisar a hidrólise da celulose. Estes microrganismos podem ser encontrados no solo, degradando matéria vegetal (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005). Porém apenas alguns desses microrganismos são tidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Os primeiros estudos sobre as celulasas ocorreram durante a Segunda Guerra Mundial, quando soldados das forças armadas norte-americanas, instalados nas ilhas Solomon, no Pacífico Sul perceberam a deterioração precoce de objetos fabricados de algodão. Para propor soluções a este problema, uma equipe de trabalho liderada pelo Dr. Elwyn T. Reese, realizando experimentos no laboratório das forças armadas isolou uma linhagem de fungo filamentosos, identificado posteriormente como *Trichoderma viride*, ao qual foi atribuída a característica de excretar enzimas capazes de degradar celulose. Até 1953, Dr. Reese e seu grupo de trabalho já haviam determinado que enzimas naturais, nomeadas celulasas, constituem complexos de diversas enzimas com distintas habilidades na degradação do substrato. Em 1956, Dr. Reese aliou seus conhecimentos aos da Dra. Mary Mandels. A partir desse momento, o foco das pesquisas deixou de ser a prevenção da hidrólise da celulose e passou a ser

o melhoramento da produção das enzimas responsáveis por esse fenômeno (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Os estudos sobre a produção de celulases não são recentes. Basu e Whitaker (1953), por exemplo, ainda nos anos 50, pesquisavam a estimulação e inibição de enzimas celulolíticas do *Myrothecium verrucaria*. O objetivo nessa época era propor estratégias para impedir a degradação de tecidos de origem vegetal por esse microorganismo.

Portanto, desde sua descoberta, a produção de celulases por ação microbiana tem sido objeto de muitos estudos que buscaram estabelecer as melhores condições para a produção dessas enzimas a partir do momento em que foram surgindo aplicações industriais para as mesmas. Os maiores investimentos e esforços na produção de celulases, foram observados no início do século XXI, devido à possibilidade de aplicar as celulases na obtenção de etanol combustível (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Os processos industriais de produção de celulases envolvem a utilização de um microorganismo como agente metabolizador das fontes de carbono presentes em um meio de cultivo, de forma que as enzimas são sintetizadas e excretadas. Uma grande quantidade de microrganismos tem sido estudada, de forma a selecionar aqueles que apresentem alta produtividade (DAMASO *et al*, 2012).

Além dos microrganismos, muitos substratos são pesquisados como indutores na produção das enzimas. Resíduos agroindustriais e biomassa celulósica de baixo custo podem ser utilizados para produzir as celulases, com um rendimento semelhante ao que se obtém com outras fontes de carbono, o que não só reduz grandemente o custo da produção dessas enzimas, mas também podem contribuir para a conservação do meio ambiente (ONOFRE *et al.*, 2013).

Como exemplos de substratos estudados para a produção de celulases, estão o bagaço de cana (ONOFRE *et al.*, 2013), casca do maracujá (SOUSA *et al*, 2012), bagaço de caju (ALCÂNTARA *et al*, 2010), casca de goiaba (SANTIAGO *et al*, 2014) entre outros. Tais substratos encontram aplicabilidade como fonte de carbono, fonte indutora e suporte microbiano nos chamados processos de fermentação em estado sólido ou fermentação semissólida.

Elevada atividade celulolítica pode ser obtida a partir dos compostos resíduos agroindustriais empregados, sem a suplementação com nitrogênio, minerais ou vitaminas (ELISASHVILI, 1993). A resposta dos microrganismos aos diferentes tipos

de indutores, tais como celobiose, carboximetilcelulose, celulose microcristalina, e celulose amorfa, que são indutores de celulases; depende da concentração e do tipo do indutor, e da presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de enzimas celulolíticas têm duas funções, podem servir como fonte de carbono para o crescimento celular, e como indutores da síntese enzimática (AMORIM, 2010; GONG; TSAO, 1975).

É importante ressaltar que um processo de produção de enzimas celulase não deve causar uma redução drástica na atividade e estabilidade enzimática, uma vez a estabilidade da enzima sob condições adversas é necessária para a sua aplicabilidade em processos industriais. Compreender o mecanismo de estabilidade pode ajudar a projetar processos e operações que não reduzam a atividade nem a estabilidade enzimática (AKCAPINAR, GUL e SEZERMAN, 2012).

Por motivos econômicos, é cada vez mais estudada a produção de celulases "in loco", ou seja, no local onde a celulase será aplicada na hidrólise de materiais lignocelulósicos. A produção de celulases no local é uma estratégia importante para o desenvolvimento de processos de produção de etanol de segunda geração sustentável (DELABONA *et al.*, 2012).

2.9 PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos podem ser classificados, quanto ao desenvolvimento do agente microbiano, em: processos de superfície, processos submersos e fermentação em estado sólido ou semissólido.

2.9.1 Processos em superfície

Nos processos em superfície, a massa de microrganismos desenvolve-se na superfície do meio líquido, retirando oxigênio diretamente do ar. Para oferecer uma grande área superficial para o desenvolvimento do microrganismo, o meio de cultivo é colocado em recipientes rasos. Os nutrientes chegam até a superfície por difusão, à medida em suas concentrações vão diminuindo nas camadas superiores. Também por difusão, os produtos do metabolismo se dispersão no meio em fermentação.

Pereira Junior (2008) destaca que esse método limita-se ao cultivo de fungos filamentosos, que tendem a formar película micelial na superfície do meio. Tais processos apresentam tempos de fermentação longos e possuem alto custo

operacional. Apesar disso, encontra aplicação na produção de vinagre pelo processo Orleanense.

2.9.2 Processos submersos

Nos processos de fermentação submersa, a célula produtora se desenvolve no seio do meio líquido, geralmente sob agitação e, no caso de processos aeróbicos, há suplementação de oxigênio por borbulhamento (AQUARONI *et al*, 2001).

Os processos submersos oferecem vantagens em relação aos de superfície, tais como a operação de grandes volumes de meio, distribuição uniforme de nutrientes além da facilidade de controle das variáveis do processo, as quais podem ser ajustadas em valores ótimos, resultando em maior eficiência e produtividade. A maioria das fermentações industriais importantes, é realizada por processo submerso (Pereira Junior, 2008).

Dentre as desvantagens, pode-se citar o elevado custo inicial na instalação dos equipamentos na planta e manutenção destes e a baixa concentração das biomoléculas obtidas (AQUARONE *et al.*, 2001)

2.9.3 Fermentação semissólida

Denomina-se fermentação semissólida (FSS) o processo no qual os microrganismos crescem sobre ou dentro das partículas de uma matriz sólida, cujo conteúdo de líquido ligado a ela esteja em um nível de atividade de água que garanta o crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda à capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001).

Embora a maioria das enzimas comerciais seja obtida por fermentação submersa, que tem como atrativos o alto rendimento, o baixo risco de contaminação e a possibilidade de se utilizar modernos métodos de controle de processos (FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 1996), muitos estudos tem sido realizados com fermentação semissólida devido a algumas de suas vantagens, como a utilização de menor infra-estrutura e matérias-primas mais baratas para a produção enzimática, o que aumenta a economia deste tipo de processo, além da possibilidade de obter-se um produto concentrado, o que é bastante vantajoso (RAJEEV *et al.*, 2009).

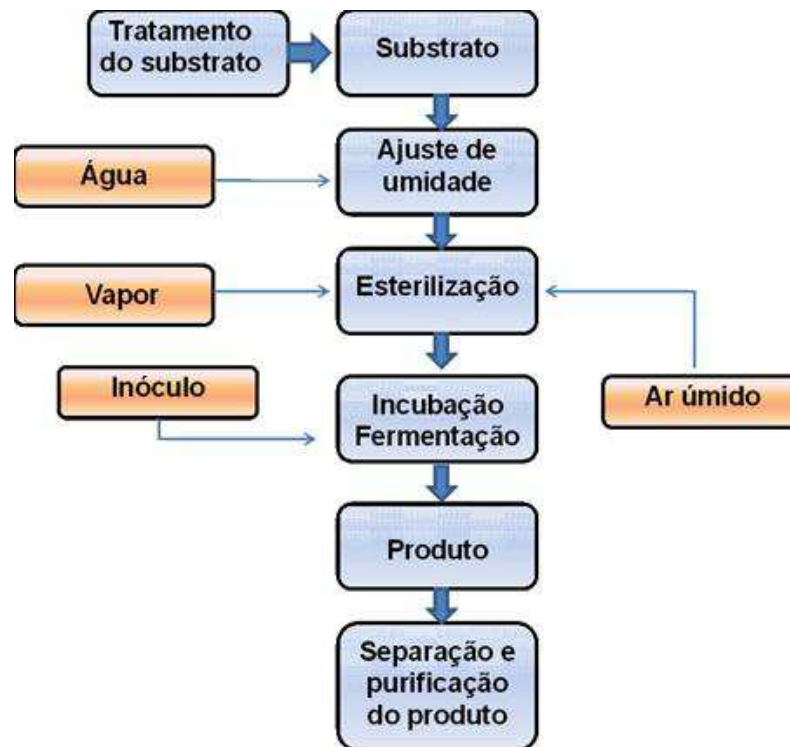
Ambos os tipos de processos fermentativos apresentam características importantes, sendo necessário a avaliação das vantagens e desvantagens que cada um apresenta, o que dependerá do tipo de produto desejado e, principalmente, do grupo de microrganismos a ser utilizado (AMORIM, 2010).

Embora a fermentação semissólida proporcione alta produtividade, alta concentração de produtos e necessite de pouco espaço e energia; tem como desvantagem a dificuldade no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Além disso, vários grupos microbianos não conseguem se desenvolver em baixos teores de umidade. Por isso são utilizados fungos filamentosos no processo, pois os mesmos adaptam-se bem a essa condição (PANDEY *et al.*, 1999).

No desenvolvimento de um processo de fermentação semissólida é feita uma seleção do substrato e de um microorganismo específico. Além disso, é necessário o controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, tais como pré-tratamento do substrato; tamanho de partícula (espaço inter-partícula e área superficial) do substrato; umidade e atividade de água (a_w) do substrato; temperatura da fermentação; período de cultivo; manutenção de uniformidade no ambiente do sistema e taxa de consumo de oxigênio (GUTIERREZ-CORREA; TENGARDY, 1997; PANDEY *et al.*, 1999).

A fermentação semissólida tem se mostrado promissora na obtenção de diversos bioprodutos, tais como enzimas (SOUSA, SILVA e CONRADO, 2012; AMORIM, 2010; LIU *et al.*, 2011; ONOFRE *et al.*, 2013); ácidos orgânicos, aromas (UENOJO; PASTORE, 2006) e bioerbicidas (MORAES, ARRUDA e MORAES, 2007). A Figura 2.5 exhibe as etapas de um processo típico de fermentação semissólida.

Figura 2.5- Etapas de um processo de FSS típico



2.10 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Após a produção das enzimas segue uma outra etapa destinada a recuperação dos produtos obtidos. Esta fase, denominada de *downstream processing*, compreende as fases de separação e purificação do produto. As estratégias utilizadas nessas etapas dependem dos aspectos citológicos e fisiológicos do microorganismo, que determinam se o produto será excretado ou permanecerá no interior das células. Dependendo da localização do produto, técnicas diferentes são empregadas na recuperação dos produtos obtidos (MONTEIRO; SILVA, 2009).

No caso de produtos intracelulares, as operações incluem a disruptura das células, o que aumenta a quantidade de impurezas presentes e eleva os custos do processo. O produto pode ser concentrado por técnicas de sedimentação, precipitação, filtração, centrifugação, extração por solventes, destilação, evaporação do solvente e secagem. Caso uma etapa de purificação seja necessária, esta envolverá outros procedimentos, como técnicas de cristalização ou a aplicação de métodos cromatográficos (MALAJOVICH, 2011).

Os processos *downstream* para a obtenção de enzimas e proteínas puras constituem geralmente uma grande percentagem do custo total de produção, especialmente se a pureza final for uma exigência rigorosa. Os custos aumentam com a diluição na qual o bioproduto é gerado na etapa de produção (DWYER, 1984). A escolha das etapas do processo de recuperação e purificação é fortemente dependente das exigências do mercado, do custo de processamento, da qualidade final desejada, e da tecnologia disponível (SOMMERS *et al.*, 1989; AMRITKAR, KAMAT e LALI, 2004).

É importante que todas as etapas do processo de separação e recuperação de enzimas sejam conduzidas em condições não desnaturantes, ou seja, condições que não produzam desativações ou danos irreversíveis à estrutura enzimática. A necessidade de purificação eficaz de proteínas em larga escala com reduzido custo tem resultado na evolução de uma série de técnicas que proporcionam protocolos rápidos, eficientes e econômicas em menos passos de processamento (AMRITKAR, KAMAT e LALI, 2004).

2.10.1 Recuperação das enzimas obtidas por fermentação semissólida

Os processos *downstream* em fermentação semissólida diferem bastante dos utilizados na fermentação submersa, pois a extração ocorre a partir do material sólido e não do líquido. Existem produtos que não requerem a extração do material fermentado, quando a fermentação semissólida destina-se ao enriquecimento protéico de materiais que servirão como ração animal (SANTOS *et al.*, 2006).

Para se chegar a uma composição adequada para o meio de extração, deve-se estudar inicialmente as condições em que a proteína de interesse é estável. Por outro lado, também deve ser levado em consideração, as condições nas quais a proteína é mais eficientemente libertada das células ou substratos. A escolha final é geralmente aquela que combina máximas recuperação e pureza, ou máxima recuperação e atividade no caso de enzimas. Os fatores levados em consideração na recuperação das enzimas são: pH, o tipo de tampão salino, e em alguns casos a adição dos seguintes aditivos: Detergentes, agentes quelantes, íons metálicos, e inibidores proteolíticos (JANSON e RYDÉN, 1998).

2.10.1.1 – Extração sólido-líquido

Em alguns casos, a recuperação pode ser feita por prensagem direta, utilizando uma prensa hidráulica na qual o material fermentado é prensado para a obtenção do extrato bruto. Em outros casos, o processo mais conveniente é a lixiviação ou “Leaching”, que consiste na dissolução preferencial de um ou mais solutos de interesse por meio do contato entre um meio sólido e um solvente líquido (FERNÁNDEZ *et al*, 2012).

O solvente ideal para esta operação de extração do tipo sólido-líquido deve ser adequado para recuperar o produto de forma seletiva, de preferência à temperatura ambiente, e com o menor tempo de contato possível. A solução a ser utilizada na lixiviação depende da solubilidade do produto desejado, por exemplo: etanol para extração de pigmentos; etanol e etil acetato para extração de penicilina; água para extração de oxitetraciclina, cefamicina e vitamina C (SANTOS *et al.*, 2006). No caso de enzimas, costuma-se usar tampões salinos, como o acetato e o citrato de sódio.

A operação de extração resulta em um extrato enzimático límpido. A massa semissólida pode ser seca a baixas temperaturas, antes da extração. O material seco pode ser armazenado para posterior manipulação ou pode ser usado como uma preparação comercial bruta. Pode-se concentrar o extrato bruto líquido por secagem a vácuo ou por ultrafiltração. Após adição de estabilizantes, como glicerol ou tampões, o concentrado obtido pode ser vendido na forma líquida para diversas aplicações (CASTILHO *et al*, 1999).

A utilização direta do extrato bruto evita várias etapas de processamento comercial (purificação, concentração, adição de buffers, estabilizantes e conservantes, liofilização e embalagem). A utilização do extrato bruto obtido por um processo otimizado de fermentação semissólida pode ser um método relativamente simples de produção local de celulase para um processo de conversão de celulose em etanol (LEVER; HO; CORD-RUWISH, 2010).

A relação entre a quantidade de sólido a ser tratado e o volume de solvente que será utilizado é de grande importância. A intensidade e o caráter do processo de extração sólido-líquido dependem principalmente da difusividade do soluto na fração do solvente selecionado, além da concentração de saturação do soluto no solvente, pois tem relação direta com a força motriz do processo. Porém, é necessário levar em consideração que um grande volume de solvente na extração dos solutos aumenta

consideravelmente os custos da purificação e recuperação do produto de interesse. É importante a agitação durante o processo, pois ela favorece a difusão dos solutos no solvente. Além disso, a extração de enzimas e proteínas deve ser realizada em valores de temperatura e pH nos quais a estabilidade seja ótima e, sua atividade biológica seja igualmente elevada, sem causar danos às biomoléculas ou ao solvente (FERNÁNDEZ *et al*, 2012).

Uma vez obtido o extrato enzimático bruto, pode-se seguir outras operações unitárias com o objetivo de recuperar, concentrar e purificar as biomoléculas de interesse.

2.10.1.2 Recuperação de proteínas por precipitação

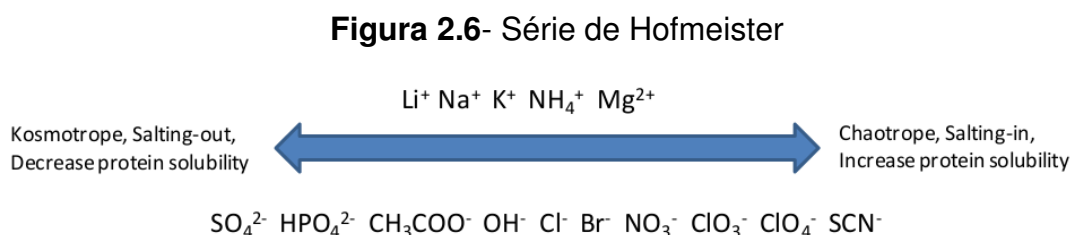
As proteínas ou enzimas de interesse presentes no extrato fermentado bruto podem ser precipitadas pela adição de sal, solventes ou polímeros orgânicos ou pela variação do pH e temperatura da solução (JANSON; RYDÉN, 1998). Os agentes precipitantes mais comuns estão listados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3- Agentes precipitantes

Agente	Tipo	Propriedades
Sulfato de amônio	Sal	Facilmente solúvel, estabilizante
Sulfato de sódio	Sal	Facilmente solúvel, estabilizante
Etanol	Solvente	Inflamável, risco de desnaturação
Acetona	Solvente	Inflamável, risco de desnaturação
Polietilenoglicol	Solvente	Carga neutra, inflamável

Fonte: Janson e Rydén, 1998

A propriedade de um sal particular ser utilizado como agente precipitante é descrito pela chamada série de Hofmeister, mostrada abaixo na Figura 2.6:



(Fonte: Zhang, 2012)

A precipitação por sais é um dos métodos mais comum de precipitação de proteínas, utilizado tanto em escala de bancada quanto em escala industrial. A adição de sal em uma solução contendo proteínas promove a precipitação destas devido a uma redução na solubilidade decorrente de um efeito “salting-out” (hidrofóbico) ou da combinação de um efeito “salting-in” (eletrostático) com um efeito “salting-out”. O efeito “salting-in” faz com que a solubilidade do soluto aumente com o aumento da concentração do sal. Já o efeito “salting-out” provoca a redução da solubilidade com aumento da concentração do sal (ARAKAWA *et al.*, 2011).

A redução da solubilidade das proteínas ocorre porque os íons do sal competem com a proteína pelas moléculas de água, diminuindo a solubilidade da proteína, uma vez que a camada de hidratação é parcialmente removida e as interações proteína-proteína se tornam relevantes, principalmente no que diz respeito à interações hidrofóbicas (KAUZMANN, 1959). Outra explicação pode ser dada em termos do aumento da tensão superficial do líquido devido à adição de sal, que aumenta a energia livre necessária para a formação de uma cavidade no solvente, na qual a molécula de proteína estaria dissolvida (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1984). No trabalho de Zhang (2012) podem ser encontradas maiores informações sobre a interação proteína-proteína em soluções salinas.

Dentre os sais utilizados para promover a precipitação de proteínas, o sulfato de amônio destaca-se por ser altamente solúvel, forma soluções de baixa densidade e seus íons possuem posição favorável na série de Hofmeister com relação à efetividade de precipitação. Além disso, o sal apresenta baixo custo, alta pureza, impede a proliferação de bactérias na solução e não apresenta efeitos desnaturantes (DEUTSCHER, 1990).

Quando ocorre a precipitação de proteínas por sais, é formado um sistema bifásico constituído de uma fase líquida concentrada em eletrólito e uma fase composta contendo a proteína precipitada e uma grande quantidade de fase líquida salina, ou sal ligado intrinsecamente à proteína. Isto constitui uma desvantagem, pois são necessários tratamentos subseqüentes como diálise ou diafiltração para a eliminação do sal presente no precipitado e o processamento da fase líquida para sua reutilização ou descarte. Esses tratamentos limitam em parte as aplicações do processo de precipitação por “salting-out” devido ao custo dos mesmos. Outra técnica para promover a precipitação de proteínas é a adição de solventes orgânicos, como o etanol e a acetona (ARAKAWA *et al.*, 2011).

A adição de solventes orgânicos promove a precipitação de proteínas devido à diminuição da atividade da água na solução, pois a água é substituída pelo solvente orgânico. A adição do solvente provoca a diminuição da constante dielétrica da solução, intensificando as forças de atração entre as cargas opostas das moléculas de proteína, reduzindo o poder de solvatação destas moléculas pela água, uma vez que há o deslocamento e imobilização parcial das moléculas de água para a hidratação do solvente orgânico (SHARMA; KANVAR, 2014).

Nesse processo, as variáveis: concentração do solvente orgânico, concentração de proteína, pH, força iônica e temperatura são mantidas sob controle. É imprescindível que as operações de precipitação com solvente sejam feitas à baixa temperatura, para evitar a desnaturação das proteínas. Como a adição de um solvente orgânico diminui o ponto de congelamento da solução, podem ser utilizadas temperaturas inferiores a 0 °C (JANSON e RYDÉN, 1998).

A precipitação isoelétrica é uma técnica que explora o fato das proteínas apresentarem baixa solubilidade no seu ponto isoelétrico. Nesta técnica, ajusta-se o pH do meio até que este seja igual ao ponto isoelétrico (pI) da proteína. Neste pH, a carga líquida da molécula é nula, e a repulsão eletrostática entre as moléculas é mínima, prevalecendo as interações hidrofóbicas proteína-proteína. Em alguns casos, podem ocorrer desnaturação e inativação da proteína precipitada, o que torna esse processo útil na remoção de proteínas indesejáveis da solução que contém a proteína-alvo, desde que nas condições de precipitação a proteína alvo seja estável (NEHETE *et al*, 2013).

Além do pH, outro parâmetro que influencia a precipitação de proteínas em soluções de sais é a temperatura. Mantendo a concentração de sal constante e variando a temperatura é possível fracionar uma solução contendo proteínas. (JANSON e RYDÉN, 1998).

Após a precipitação por qualquer um dos métodos apresentados, as proteínas são geralmente recuperadas por centrifugação e utilizadas nas etapas seguintes de concentração e purificação.

2.11 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

O Sistema Aquoso Bifásico (SAB) é um método de extração líquido - líquido que emprega duas fases aquosas. Os Sabs podem ser formados por água e dois polímeros, ou um polímero e um sal. Além dessas substâncias, nos últimos anos foram desenvolvidos Sabs formados por outras substâncias, como álcoois e líquidos iônicos. No campo da biotecnologia tem sido utilizado na separação e purificação de materiais biológicos tais como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, vírus, anticorpos e organelas celulares (AMID *et al.*, 2012; RAJA *et al.*, 2011).

A Tabela 2.4 mostra algumas das aplicações dos SABs citadas na Literatura

Tabela 2.4 – Partição de biomoléculas em SABs

Biomolécula	SAB	Autores	Recuperação (%)
Glutenina	PEG 1500/Li ₂ SO ₄	Do Nascimento <i>et al.</i> 2010	84,9
Proteína recombinante	PEG 8000/ Fosfato	Ibarra-Herrera <i>et al.</i> 2011	88
Ovalbumina	Peg4000/Ácido poliacrílico	Saravanan <i>et al.</i> 2008	87,4
Bromelina	PEG 3000/MgSO ₄	Ketnava <i>et al.</i> 2009	108,45
Protease	PEG 8000/Fosfato	Mehrnoush <i>et al.</i> , 2012	97,3
Invertase	PEG 300/Na ₂ SO ₄	Yucekan <i>et al.</i> 2011	90
Papaína	PEG 6000/(NH) ₂ SO ₄	Nitsawang <i>et al.</i> 2006	89,9
Fitase	PEG 6000 + 8000/ Citrato	Bhavsar <i>et al.</i> , 2012	96
Peroxidase	PEG 4000-IDA- Cu ²⁺ /Na ₂ SO ₄	Da Silva <i>et al.</i> , 2000	64
Lipase	2-Propanol/Fosfato	Ooi <i>et al.</i> 2009	99
Protease	2-Propanol/Fosfato	Amid <i>et al.</i> , 2012	96,7
Glicirricina	Etanol/Fosfato	Tianwey <i>et al.</i> , 2002	92
Ácido gálico	Líquido iônico/Na ₂ SO ₄	Cláudio <i>et al.</i> 2012	99
Ficocianina	[Bmim]Cland (LI)/ KH ₂ PO ₄	Zhang <i>et al.</i> 2015	90,23

A separação espontânea, em fases distintas, devido à adição de soluções aquosas de dois polímeros foi inicialmente observada pelo microbiologista holandês Beijerinck, em 1856, ao misturar ágar com gelatina ou amido solúvel. A fase inferior era rica em

ágar e a superior em gelatina (ou amido). Em 1956, Albertsson constatou que sistemas formados por polímeros solúveis e solventes orgânicos também possibilitam a partição de materiais biológicos, ou seja, permitiam que uma terceira substância introduzida no sistema fosse coletada, preferencialmente, numa das fases por ajuste de parâmetros físico-químicos.

A maioria dos SABs aplicados na recuperação de enzimas são formados por dois polímeros de cadeia flexível, como os sistemas formados por PEG (polietileno glicol) e dextrana ou são formados por um polímero, como PEG, e um sal inorgânico que pode ser o sulfato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, carbonato de sódio entre outros. Atualmente, os sais orgânicos como os citratos, tartaratos, succinatos também estão sendo usados na formação destes sistemas com sucesso (GOJA *et al.*, 2013).

Há ainda sistemas bifásicos alternativos, como os do tipo álcool-sal, que apresenta algumas vantagens sobre os SABs convencionais, tais como elevada polaridade, baixa viscosidade, e fácil recuperação do álcool por evaporação. Além disso, a técnica é barata e, dependendo do solvente utilizado, a toxicidade para o ambiente é baixa (TIANWEI, QING e QIANG, 2002; AMID *et al.*, 2012). Porém tais sistemas podem ser agressivos para enzimas que não toleram a presença de solventes. Recentemente, SABs formados por líquidos iônicos e sais tem se mostrado eficientes na recuperação de várias biomolécula (LIU *et al.*, 2011).

O polietilenoglicol ($\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), é um poliéster sintético neutro, disponível em uma grande variedade de massas molares, de poucas centenas a milhares de Daltons. Uma importante característica do PEG, é que em ambiente aquoso ele exclui outros polímeros de sua vizinhança, não solubilizando-se com eles, formando SABs do tipo polímero-polímero, como o sistema PEG-Dextrana. Por ser biodegradável e atóxico, seu descarte no ambiente não oferece grandes riscos (PORTO *et al.*, 2007). O PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para várias aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas, pois não é antigênico nem imunogênico.

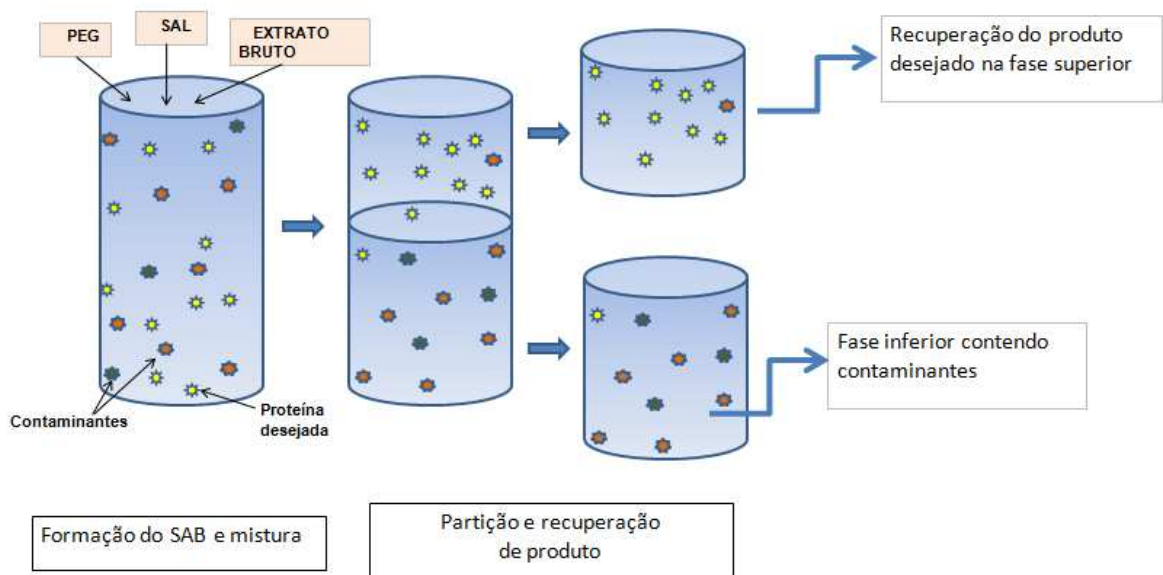
A partição de biomoléculas em SABs apresenta muitas vantagens. Trata-se de uma técnica de separação seletiva simples, rápida e de fácil ampliação. Além disso, por não conter compostos orgânicos voláteis e por apresentar mais de 70% de água, garante um ambiente ameno para as biomoléculas (ALBERTSON, 1986).

A extração em SABs inicia-se pela preparação do sistema e adição da mistura a ser separada. Após homogeneização, a separação das fases é realizada por sedimentação, gravidade ou por centrifugação. As fases são coletadas e utilizadas para recuperar os produtos de interesse separados da mistura inicial (RAJA *et al.*, 2011).

Rendimentos superiores a 90% podem ser obtidos em apenas um passo de extração. Porém, quando um passo não é suficiente, é possível a realização de repetidas extrações que podem ser conduzidas em unidades de separação em cadeia ou cascata (DORAN, 2005).

Quando um extrato fermentado bruto é adicionado a um SAB, ocorre a distribuição das biomoléculas e fragmentos de células entre as fases (Figura 2.7). Sob condições operacionais adequadas, a proteína alvo será concentrada em uma das fases e os fragmentos de células e proteínas não desejadas (contaminantes) migrarão para a outra fase (RAJA *et al.*, 2011).

Figura 2.7- Extração em batelada em SAB.



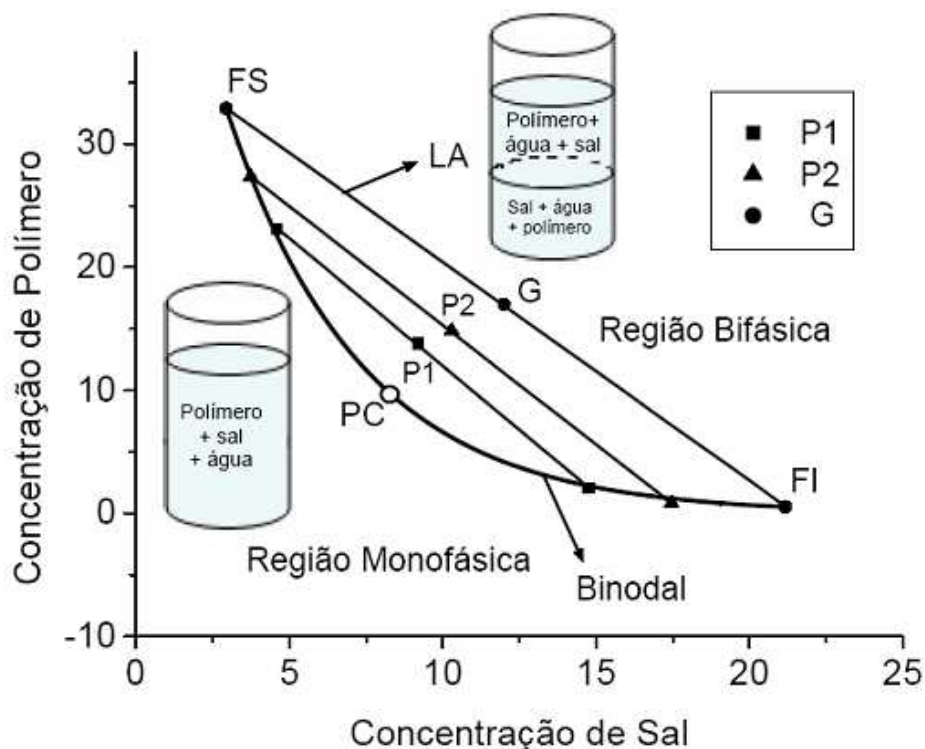
2.11.1 Diagrama de fases

A representação gráfica utilizada para expressar as concentrações de um sistema de fases é geralmente feita através de diagramas retangulares (Figura 2.8) devido ao seu alto teor de água e é de grande importância para os estudos de

separação de biomoléculas, pois são usados como ponto de partida para o desenvolvimento de um processo de extração.

A concentração de um dos constituintes do sistema é representada no eixo horizontal e a outra no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença.

Figura 2.8 – Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares.



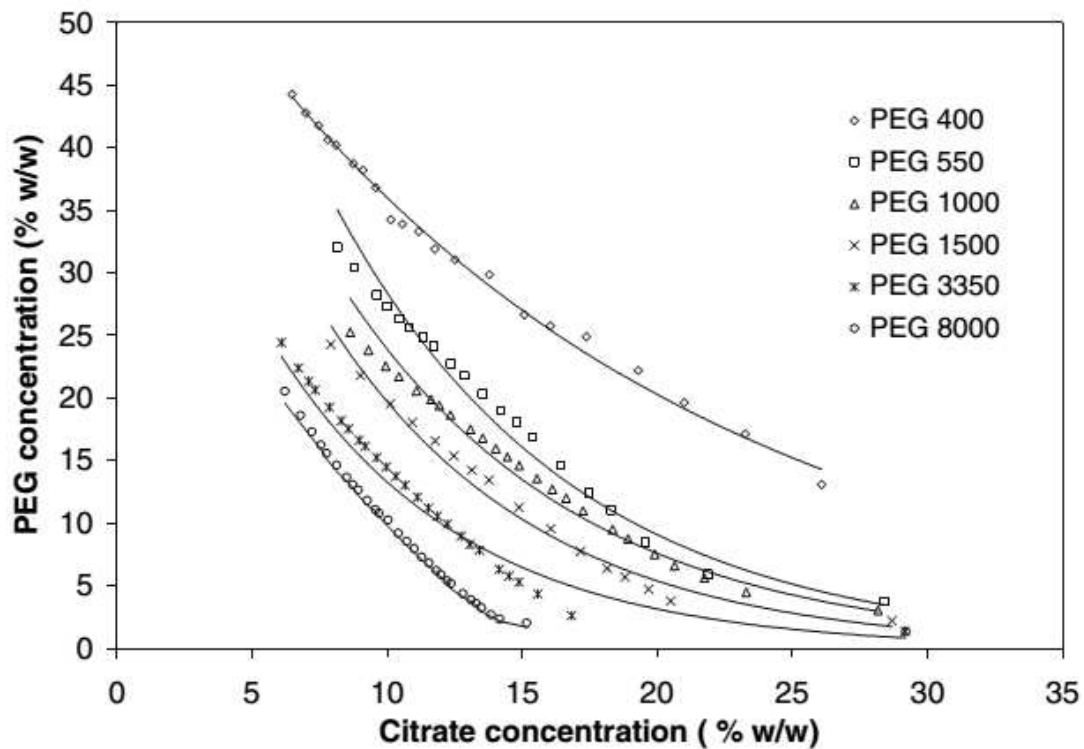
A curva que divide a região em duas fases (FS-PC-FI) é denominada de curva binodal ou curva de equilíbrio. Os sistemas cuja composição fica abaixo da binodal formam uma única fase (região monofásica), entretanto os que ficam acima desta formam duas fases (região bifásica). As linhas são chamadas “tie-lines” ou linha de amarração as quais são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio.

Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases superiores e inferiores com a mesma composição final, embora com diferentes relações de volumes entre as fases (SILVA e LOH, 2006). No diagrama de fases são mostrados três sistemas com composições globais diferentes P1, P2 e G, localizados em linhas de amarração

diferentes. Outra particularidade mostrada neste diagrama é o ponto crítico (Pc) onde as propriedades físicas e químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986).

Dados de equilíbrio são importantes para o planejamento da operação dos SABs, pois eles informam as quantidades mínimas necessárias para a obtenção de um sistema bifásico a partir da mistura dos componentes. A Figura 2.9, por Exemplo, mostra as curvas bimodais para sistemas formados por diferentes massas molares de PEG e citrato de sódio.

Figura 2.9: Curvas Binodal de sistemas PEG/Citrato obtidos usando diferentes valores de PEG e Tampão Citrato de pH 6,0



(Fonte: Porto *et al.*, 2007)

2.11.2 Partição de enzimas em sistemas aquosos bifásicos

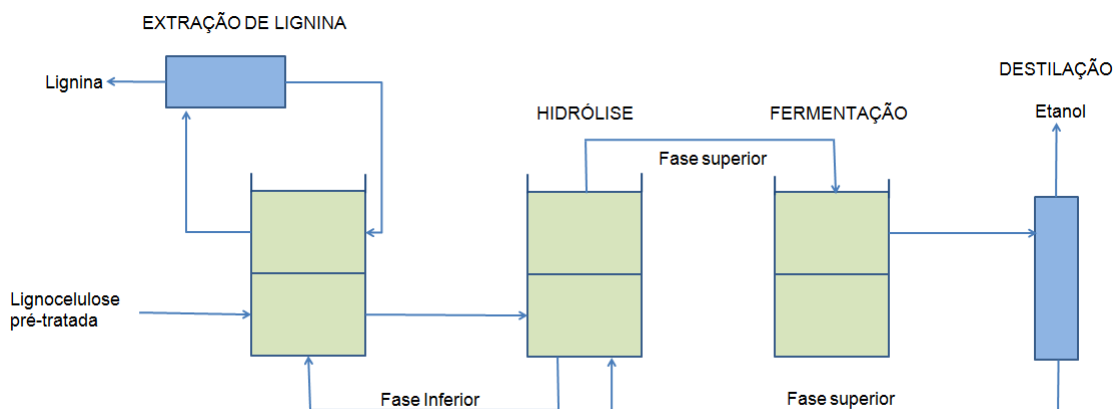
O particionamento de biomoléculas entre as fases depende principalmente das relações de equilíbrio do sistema. O coeficiente de partição é definido como (Equação 2.1):

$$K = \frac{[Ct]}{[Cb]} \quad (2.1)$$

Onde [Ct] e [Cb] são as concentrações do soluto na fase superior e inferior respectivamente. O coeficiente de distribuição K depende de uma série de variáveis experimentais: pH, temperatura, presença de sais, peso molecular e concentração do polímero, hidrofobicidade e tamanho da proteína, entre outras. Mediante o controle dessas variáveis, é possível fazer com que uma proteína contida em uma mistura complexa seja transferida para uma das fases, mantendo as proteínas não desejadas na fase oposta (GÓMEZ *et al.*, 2006).

Além disso, há ainda a possibilidade de se conduzir processos biotecnológicos em SABs, no qual as biomoléculas de interesse podem ser particionadas na medida em que são produzidas. A Figura 2.8, por exemplo, ilustra um processo de bioconversão de lignocelulose pré-tratada em etanol, utilizando SABs. A etapa de hidrólise emprega uma fase inferior rica em celulases (TJERNELD, PERSSON e ALBERTSSON, 1985).

Figura 2.10- Esquema de um processo de bioconversão de lignocelulose em etanol.



(Fonte: Adaptado de Tjerneld, Persson e Albertsson, 1985)

A partição de biomoléculas em SABs depende de muitas variáveis, tais como o tipo e concentração de polímero e sal, as propriedades de superfície das partículas, o pH e a temperatura (RATANAPONGLEKA, 2010; GOJA *et al.*, 2013)).

Em geral, o aumento da massa molar e na concentração de um polímero diminui a tendência de partição da proteína para a fase rica nesse polímero (DA SILVA E LOH, 2006). Tal fenômeno ocorre porque, com o aumento na massa molar do polímero, também aumentam o comprimento da cadeia do polímero e o efeito de exclusão, que levam a redução no volume livre. Dessa forma, a partição das biomoléculas para a fase superior é dificultada, pois o polímero adquire uma conformação mais compacta, com ligações intramoleculares hidrofóbicas (MOHAMADE e OMIDINIA, 2007).

Em relação à concentração do polímero, seu aumento também aumenta as diferenças de densidade, índice de refração e viscosidade entre as fases, modificando o valor do coeficiente de partição (RAJA *et al.*, 2011). A viscosidade é uma característica importante, pois é função da concentração e da massa molar do polímero. Um valor elevado de viscosidade pode impactar no processo (RATANAPONGLEKA, 2010). Quanto à fase rica em sal, o aumento da concentração favorecerá o efeito denominado salting-out, ou efeito salino, que força a biomolécula a mover-se para a fase superior, rica em polímero (GOJA *et al.*, 2013).

O pH também afeta a partição de enzimas em SABs. Na superfície das enzimas existem grupos ácidos e básicos com diferentes valores de pKa, originando cargas elétricas que são funções do pH. A densidade de carga elétrica na superfície da proteína modifica sua conformação, alterando o coeficiente de partição da enzima (DA SILVA E LOH, 2006). Se o pH for maior que o pI (ponto isoelétrico) da enzima, a carga líquida da proteína será negativa. Se o pH for menor que o pI a carga será positiva, e se o pH for igual ao pI a carga será neutra. Quando o pH se eleva, as enzimas ficam negativamente carregadas, e interagem com as moléculas de PEG, aumentando a partição e recuperação na fase superior dos SABs. (RAJA *et al.*, 2011).

2.12 FATOR DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A avaliação do desempenho ou rendimento de qualquer método de purificação de proteínas é baseada em dois parâmetros: a recuperação e o fator de purificação da proteína ou atividade enzimática. Esses valores são obtidos em relação à solução inicial, relacionando-se a concentração do material purificado com a concentração do

material inicial, ou quaisquer etapas dentro do bioprocesso, tendo sempre uma etapa anterior como referência.

A recuperação da atividade (RA) é uma relação entre a atividade total no material purificado e a atividade total presente no material bruto (em porcentagem), dada pela Equação 2.2. O fator de purificação (FP) é um parâmetro que permite comparar a atividade enzimática específica total no material purificado com a atividade enzimática específica total no material bruto, dado pela Equação 2.3 (BIAZUS *et al.*, 2010).

$$R = \frac{\textit{Atividade enzimática recuperada}}{\textit{Atividade enzimática inicial}} \quad (2.2)$$

$$FP = \frac{\textit{Atividade enzimática específica recuperada}}{\textit{Atividade enzimática específica inicial}} \quad (2.3)$$

2.13 ESTADO DA ARTE

Nesta seção, serão apresentados resultados presentes na literatura sobre o aproveitamento da palma forrageira e os avanços na área de produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos.

Silva *et al.* (2011) fizeram a caracterização físico química e bioquímica do farelo da palma forrageira redonda (*Opuntia ficus*), destinado a alimentação de ruminantes. Os resultados mostraram que a palma apresentava 10,1% de matéria seca (portanto 89% de umidade), a qual era composta por 15,68% de matéria mineral, 5,1% de proteína bruta, 0,96% de extrato etéreo, 28,56% de fibra em detergente neutro, 22,02% de fibra em detergente ácido e 49,7% de carboidratos não fibrosos. Os resultados obtidos revelaram que a palma forrageira redonda (*Opuntia ficus*) é rica em carboidratos não fibrosos, importante fonte de energia. Porém, observaram reduzidos teores de matéria seca e proteína bruta. Os fenólicos totais e os taninos condensados encontrados foram respectivamente de 168 e 119, 71 mg/100g; valores seguros para a alimentação de ruminantes.

Santos *et al.* (2011) fizeram a caracterização físico-química da palma forrageira, encontrando os seguintes valores: sólidos solúveis totais 2,96; umidade, 93,96%; pH, 4,45; fibra, 0,47%; proteína, 0,29%; acidez, 0,37 mg/L; cinzas insolúveis, 0,07%; cinzas

solúveis, 1,39%; e cinzas totais, 1,46%. Este resultado mostra que a palma, por seu alto teor de água, é uma boa alternativa para alimentação animal durante a seca, mas por seu baixo teor protéico, de fibras e cinzas não garante a nutrição animal. Porém é adequada para a propagação de fungos e leveduras.

Baracho, Silva e Torres Neto (2009) estudaram o processo de pré-hidrólise ácida, utilizando a raquete da palma forrageira como matéria-prima lignocelulósica. As variáveis controladas foram: temperatura, concentração do ácido e razão entre massa seca e volume de ácido, o tempo foi fixado em uma hora. Os autores determinaram que a melhor razão seria de 1/8; em temperatura de 121 °C e concentração de ácido de 8%. Nessas condições, houve um aumento das pentoses acima de 10500%.

Torres Neto (2010) realizou um estudo de pré-hidrólise ácida da palma forrageira para obtenção de um licor pré-hidrolisado rico em pentoses, diminuindo, assim, suas concentrações na matéria-prima. Foi verificada a influência das variáveis temperatura, concentração de ácido e razão matéria seca/ácido sobre as respostas soma de pentoses e percentual de aumento de pentoses e, em seguida, foi realizada uma hidrólise preliminar acompanhada de uma fermentação. Os resultados mostraram que, operando-se com razão abaixo de 1/10, para quaisquer valores de temperatura e concentração de ácido, obtém-se soma e percentual de aumento de pentoses acima de 8 g/L e 8000%, respectivamente. Porém, na etapa de fermentação não foi observada a produção de álcool etílico. Segundo o autor, isto provavelmente aconteceu pela formação de inibidores durante o processo de hidrólise.

Araújo *et al.* (2005) estudaram o equilíbrio higroscópico da palma forrageira, com o objetivo de determinar a umidade ótima para fermentação sólida. Os autores pretendiam promover o enriquecimento protéico da palma forrageira com o cultivo semissólido de *Saccharomyces cerevisiae*. O estudo das isotermas de dessorção mostrou que no processo de fermentação para enriquecer a cactácea, a umidade da palma forrageira deve estar acima de 90%, o que corresponde à atividade de água acima de 0,9.

Santos *et al.* (2011), avaliaram o efeito da fermentação e do teor de água sobre a atividade cinética de celulases produzidas através da espécie fúngica *Rhizopus sp.*, tendo a palma como único meio de cultivo. A máxima atividade enzimática para CMCase (endoglucanase), foi de 5,7 U/mL a 0,949 de atividade de água em 96 h, e para FPase (endoglucanase + exoglucanase) foi de 8,7 U/mL a 0,993 de atividade de água em 72 h. Ambas as enzimas foram sintetizadas pelo fungo sem a necessidade de

qualquer indutor ou suprimento além da celulose presente no resíduo e água em diferentes concentrações.

Santos *et al.* (2012), utilizaram a palma forrageira como substrato para a produção de enzimas celulolíticas, por meio de fermentação em estado sólido, utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* como agente fermentativo. A palma foi desidratada até atingir aproximadamente 2% de umidade. As variáveis estudadas no processo fermentativo foram, a atividade de água (0,827, 0,892, 0,949, 0,988, 0,993) e o tempo de fermentação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Os pesquisadores verificaram crescente produção enzimática nos três primeiros dias de fermentação, independente da atividade de água. Após esse período, a produção enzimática começou a decrescer em todos os ensaios. Os maiores valores de produção da CMCase (7,47 U/mL) ocorreram em 72,38 h e 0,949 de atividade de água e, para a FPase, (9,42 U/mL). O tempo de fermentação foi de 74,64 horas e atividade de água de 0,986.

Carvalho *et al.* (2012) realizaram estudos para a produção de enzimas lignocelulósicas por fermentação da palma doce (*Nopalea cochenillifera*) em estado sólido através do fungo filamentosso *Aspergillus niger*. A umidade usada foi de 85% m/m o que equivale a uma atividade de água aproximada de 0,985. Os cultivos foram conduzidos em estufa. Foram obtidas atividade de CMCase de 4,66 U/mL e FPase de 7,03U/mL, além de Xilanase, Lacase, Peroxidase e Mn Peroxidase. O fungo foi capaz de produzir as enzimas sem a necessidade de qualquer outro indutor além da palma doce e água, demonstrando a viabilidade de utilização da palma doce como matéria-prima para o bioprocessos.

Santana *et al.* (2012) obtiveram amiloglucosidas por fermentação semissólida utilizando a palma forrageira como substrato e o microorganismo empregado foi o *Aspergillus niger*. A maior atividade enzimática obtida foi de 60,32 U/g em 72 horas, com atividade de água de 0,891. Durante o processo de fermentação, o fungo sintetizou e excretou esta enzima sem a necessidade de adição de indutores, demonstrando a viabilidade da palma, como matéria-prima para bioprocessos.

Santos *et al.* (2013) analisaram e quantificaram a atividade das enzimas endoglucanase (CMCase) e celulasas totais (FPase), produzidas por fermentação em estado sólido dos resíduos do processamento do cacau, manga e seriguela, usando o *Aspergillus niger* como inoculante. Os pesquisadores estudaram o efeito de teor de umidade (40%, 50% e 60%) e tempo de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120

horas) na produção das enzimas. A fermentação foi realizada a 30 °C em estufa bacteriológica refrigerada. Os pesquisadores comprovaram a eficácia dos resíduos estudados na produção de celulases por fermentação semissólida, destacando-se o resíduo de manga na produção de endoglucanase, atingindo a atividade de 9,32 U/mL, e na produção de celulases totais, o resíduo de seriguela, com atividade enzimática de 11,62 U/mL.

Amorim (2010) estudou a produção de celulase por fermentação semissólida do resíduo de caju utilizando o microorganismo *Trichoderma sp.* Foi testado o bagaço integral e o bagaço lavado, com reduzido teor de açúcares. A maior atividade enzimática obtida para o bagaço lavado foi de 1,173 U/g em 42 horas de fermentação quando utilizou 45% de umidade inicial e 1,00% de adição de fonte de nitrogênio e para o bagaço sem lavar, a maior atividade enzimática foi de 1,896 U/g em 18 horas de fermentação quando utilizou 55% de umidade inicial e 0,75% de adição de fonte de nitrogênio. A produtividade atingiu maiores valores com 55% de umidade inicial e 0,75% de adição de fonte de nitrogênio tanto para o bagaço lavado como para o bagaço sem lavar, com valores de 0,064 U/g.h e 0,105 U/g.h, respectivamente.

Lins (2012) também estudando a produção de celulases pela fermentação semissólida de resíduo de caju, mas utilizando o fungo *Trichoderma reesei* LCB 48, obteve pico de produção de enzima celulase expressa em CMCCase com o valor de 0,71 U/g (0,095 U/mL), nas condições de 45% de umidade inicial e 1% de fonte de nitrogênio durante 238 horas de cultivo. Foi observado que a umidade inicial do substrato é uma variável determinante na produção das enzimas CMCases, e que o nível mínimo de umidade (45%) proporcionou os maiores valores de produção de CMCCase.

Raghuwanshi *et al.* (2014) estudaram a produção de celulase produzida por um mutante de *Trichoderma asperellum* e sua aplicação na hidrólise de celulose. A produção de FPase, CMCCase e β -glicosidase foi otimizada em fermentação em estado sólido. Não foi observada inibição da produção de celulase com até 20 mM de glicose. A estirpe mutante produziu FPase (2,2 UI/gds), CMCCase (13,2 UI/gds), e β -glicosidase (9,2 UI/gds) sob condições otimizadas, respectivamente; 1,4, 1,3, 1,5 vezes maior do que o tipo selvagem. O selvagem, bem como estirpe mutante produziram as celulases na faixa de pH de 4,0-10,0. A sacarificação de sabugo de milho pré-tratado, palha de trigo e bagaço de cana pela celulase da estirpe mutante SR1-7 resultou na libertação

de açúcares redutores a uma taxa de 530,0 mg/g, 290,0 mg/g, e 335,0 mg/g de substrato, respectivamente, sendo 1,6 vezes mais elevada do que a estirpe do tipo selvagem.

Silva e Swarnakar (2010) extraíram celulasas presentes no caju *in natura* e demonstraram que tais enzimas promoviam a hidrólise da palma forrageira, produzindo uma pequena quantidade de glicose.

Lever, Ho e Cord-Ruwish (2010), pesquisaram a produção de celulase "in loco" via fermentação em estado sólido de palha de trigo, utilizando o *Trichoderma reesei* como agente da fermentação, como alternativa às preparações comerciais de celulase. O extrato bruto foi aplicado na obtenção de etanol a partir da palha do trigo, em um processo de sacarificação simultânea e fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar do baixo rendimento em atividade enzimática (0.75–1.2 FPU/gds ou FPU por grama de substrato seco) foi possível converter 5% do material lignocelulósico em etanol, o que levou os pesquisadores a concluir ser possível a aplicação de extrato bruto produzido "in loco" ao invés de preparações comerciais para obtenção de etanol a partir de substratos lignocelulósicos.

Delabona *et al.* (2012) avaliaram a eficiência do complexo celulolítico de uma cepa de *Trichoderma harzianum*, isolado na floresta amazônica, na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Por meio do cultivo em frasco agitado, com diferentes fontes de carbono, foram obtidas hidrolases glicosil (FPase, xilanase, e β -glucosidase). Fontes de carbono selecionados foram, em seguida, mais estudada sob diferentes condições de pH, utilizando um biorreator de tanque agitado. Foram obtidas atividades enzimáticas de até 121 FPU/g, 8000 UI/g, e 1730 UI/g para celulase, xilanase e β -glicosidase, quando utilizaram bagaço deslignificado com explosão a vapor. Este complexo enzimático foi utilizado para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Uma avaliação comparativa, utilizando um extrato enzimático de *Trichoderma reesei* RUTC30, mostrou desempenho semelhante ao do complexo do *T. harzianum*, sendo este um candidato potencial para a produção de enzimas no local (*in loco*).

Shahsavarani *et al.* (2013) avaliaram a capacidade de *Saccharomyces cerevisiae* diplóide TJ 14, tolerante a temperatura, para a produção de bioetanol celulósico por tecnologia de sacarificação semi-simultânea e fermentação. Sob condições de alta temperatura (39°C), o T J14 produziu 45 g/L de etanol a partir de um substrato

composto de 100 g (w/v)/L de celulose. Este valor foi superior aos anteriormente relatados pela literatura.

Akcapinar, Gul e Sezerman (2012) estudaram estabilidade da enzima endoglucanase (EGI) produzida por *Trichoderma reesei*. A enzima apresentou atividade máxima em temperatura de 50-55°C e pH em torno de 5,0. A 50°C, as enzimas mantiveram mais de 65% da atividade inicial em 72 horas de incubação.

Mawadza *et al.* (2000) purificaram e caracterizaram as celulasas produzidas por duas estirpes de *Bacillus* (CH43 e HR68). As celulasas tiveram atividade ótima na faixa de pH 5 - 6,5 e temperatura ótima entre 65 e 70 ° C para a endoglucanase de CH43 e HR68, respectivamente.

Tjerneld; Persson e Albertsson (1985) demonstraram a aplicabilidade de SABs formados por PEG e Dextrana na partição de celulasas de *Trichoderma reesei*, com o objetivo de desenvolver um processo contínuo para bioconversão extrativa de celulose. Os SABs compostos por PEG (MM 40000) e Dextrana (MM 40) foram os que demonstraram maior rendimento. Os coeficientes de partição (K) para as enzimas endo- β -glucanase e β -glucosidase foram respectivamente de 0,02 e 0,005 na temperatura de 20°C.

Antov *et al.* (2012) estudaram o particionamento do complexo celulolítico de *Penicillium sp* em SABs formados por PEG e Dextrana. O SAB formado por 10% (w / w) de polietilenoglicol 1500 ; 5% (w/w) de dextrana 500,000 e 80% (w/w) de extrato bruto a um pH igual a 5 resultou em uma recuperação de 100% da atividade celulolítica na fase superior, num único passo de extração.

Gautam e Simon (2006) avaliaram a influência do pH e da temperatura sobre o coeficiente de partição da β -glucosidase e proteína total para determinar as melhores condições para a purificação da enzima no SAB formado por PEG 4000 (8% m/m) e fosfato de potássio (13% m/m). O coeficiente de partição aumentou com o pH e temperatura durante os intervalos investigados (pH: 6,0 - 7,5; temperatura: 25-55 °C). A maior seletividade foi alcançada com pH de 6,5 temperatura de 25°C. Um rendimento de β -glucosidase maior do que 92% foi obtido na fase inferior para valores de pH inferior a 7,0 e temperaturas abaixo de 35°C.

Hemavathi e Raghavarao (2011) utilizaram SABs formados por PEG e sulfato de amônio para recuperar e purificar β -galactosidase e β -glucosidase a partir de cevada (*Hordeum vulgare*). Foram estudados a influência dos parâmetros: massa molar do PEG, concentração de PEG e Sal, pH, adição de sais neutros, razão entre as fases e

comprimento da linha de amarração. As enzimas β -galactosidase e β -glucosidase foram seletivamente particionadas para as fases superior e inferior, respectivamente. As condições adequadas para a purificação foram encontrados para SABs contendo 14% (m/m) de PEG1500 e 13% (m/m) de sulfato de amônio. Uma única etapa resultou em uma recuperação de β -galactosidase de 98,26%, com fator de purificação de 2,1; e para β -Glicosidase, verificou-se uma recuperação de 92,58%, com fator purificação de 3,3 vezes.

Herculano *et al.* (2012) estudaram a recuperação e purificação de celulases do complexo celulolítico do *Aspergillus japonicus* URM5620 em SABs formados por PEG e citrato de sódio. Foram avaliados a influência da massa molar e concentração do PEG, da concentração de citrato de sódio e do pH. Foram analisadas as atividades de β -glicosidase (β G), endoglucanase (CMCase) e celulase total de (FPase). As enzimas não se comportaram da mesma maneira, a β G concentrou-se na fase inferior, e maiores valores de CMCase e FPase foram detectados na fase superior. Cada enzima teve sua melhor recuperação e concentração em diferentes valores de pH, composição e massa molar, mostrando que é possível a separação e recuperação das enzimas do complexo celulolítico mediante simples ajuste dos parâmetros estudados.

Dustet *et al.* (2001) obtiveram celulases a partir da fermentação semissólida do bagaço de cana em biorreator, utilizando o fungo *Aspergillus niger* como agente da fermentação. Em 48 horas de cultivo foram obtidas atividades CMCase e FPase de 12 e 3 UI/gds respectivamente. Na recuperação, os autores utilizaram SABs formados por PEG 600 e sulfato de amônio. O SAB formado por 1,5 M de sulfato de amônio em PEG puro apresentou o melhor rendimento, com fator de purificação de 7,6 para a CMCase e 7,82 para FPase. A enzima concentrou-se na fase superior, porém com recuperação de 54 e 56% respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande (LEB/UFCG).

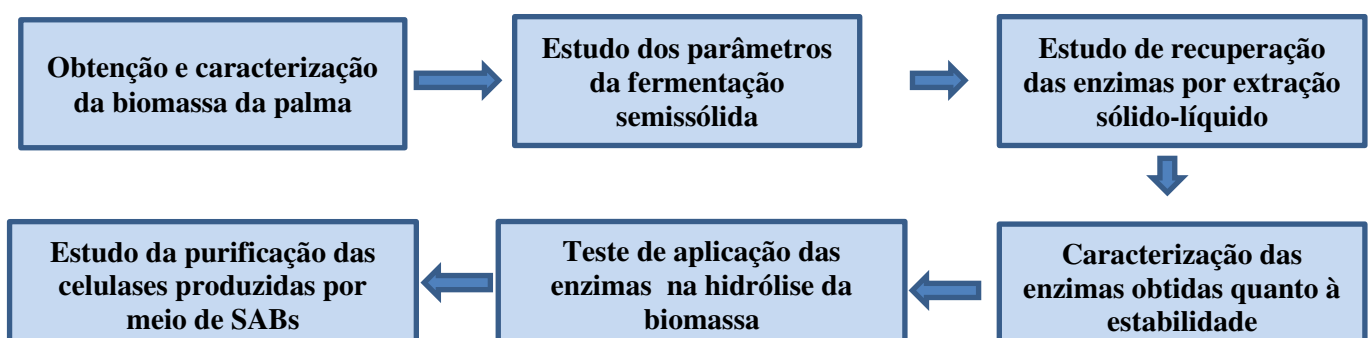
Inicialmente, foi realizado um estudo para determinar as condições mais apropriadas para a fermentação semissólida da palma forrageira (*Opuntia fícus indica* Mill), utilizando como agente biológico o fungo *Trichoderma reesei* LCB48, com o objetivo de obter extratos brutos com máxima atividade celulolítica. Uma vez determinadas as melhores condições de produção e recuperação das enzimas do meio fermentado sólido, foi realizado um estudo de concentração e purificação parcial das enzimas presentes no extrato utilizando sistema aquoso bifásico formado por PEG e citrato de sódio. As celulasas obtidas foram caracterizadas quanto à estabilidade, pH e temperatura ótima de ativação.

Tanto o extrato obtido na fermentação semissólida quanto o recuperado por meio dos SABs foi aplicado na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada da palma forrageira, para avaliar a potencialidade deste recurso no desenvolvimento de um processo de produção "in loco" de bioetanol; no qual a produção da biomassa, das enzimas e do biocombustível poderiam concentrar em uma biorrefinaria instalada no semi-árido.

3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O fluxograma da Figura 3.1 mostra as principais etapas desta pesquisa. O procedimento será descrito detalhadamente nos tópicos a seguir.

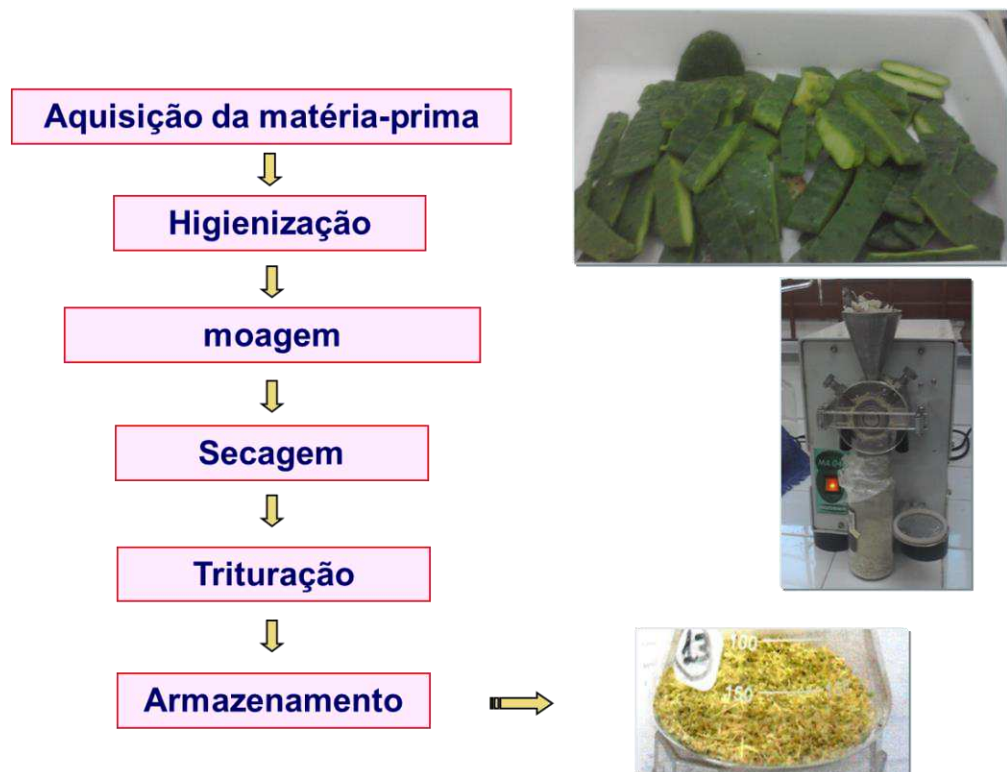
Figura 3.1 – Etapas do projeto de pesquisa desenvolvidas neste trabalho.



3.1.1 – Matéria - prima

A palma forrageira (*Opuntia ficus - indica* Mill) foi adquirida no município de Tabira, PE, coletada em um período de estiagem (Janeiro/2013). A Figura 3.2 exibe as etapas da obtenção da biomassa

Figura 3.2– Etapas do processo de obtenção da biomassa



Inicialmente, cladódios e partes do caule da planta, com boas condições fitossanitárias, foram lavados com água proveniente do abastecimento público para remoção das impurezas. Em seguida o material limpo foi cortado, triturado em liquidificador industrial, e posto para secar em estufa com circulação e renovação de ar (65 °C) em bandejas perfuradas até peso constante. Esse valor de temperatura foi escolhido porque em ensaios preliminares constatou-se que parte do material fermentava dentro do equipamento durante a secagem quando temperaturas inferiores a esta foram utilizadas. Uma parte do material triturado proveniente dos cladódios e do caule foi lavada com água corrente em abundância antes da operação de secagem, com o auxílio de uma peneira, para remoção de açúcares e outros materiais solúveis

presentes no interior dos cladódios antes da operação de secagem. Esta operação foi realizada com o objetivo de testar a influência deste pré -tratamento na fermentação semissólida. Após a secagem, o material seco foi moído em moinho de facas, obtendo -se assim, a biomassa utilizada como substrato no processo fermentativo.

Após a secagem, o material seco foi moído em moinho de facas, obtendo-se assim, a biomassa utilizada como substrato no processo fermentativo.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

Na caracterização da biomassa foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: granulometria, densidade, massa específica, porosidade, pH, cinzas, umidade, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR). As análises foram feitas em triplicata.

3.2.1 Granulometria

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada com um conjunto de peneiras Produteste , com malhas de 14, 20, 24, 35, 42, 65 e 115 mesh. Após a adição de 100 g da biomassa na peneira superior, o conjunto de peneiras foi agitado por 20 minutos na freqüência 80% do agitador. O material retido em cada peneira teve sua massa determinada. Os resultados foram expressos como frações ponderais do material retido em cada peneira.

3.2.2 Massa específica aparente

A massa específica aparente do material foi determinada por meio da adição de 30 g da biomassa em uma proveta de 100 mL, na qual foi lido o volume ocupado pela amostra. A biomassa foi adicionado suavemente, para evitar compactação. Utilizando a Equação 3.1 foi possível calcular a massa específica aparente (ρ_A):

$$\rho_A = \frac{m}{V} \quad (g.cm^{-3}) \quad (3.1)$$

3.2.3 Massa específica real

A massa específica real da biomassa seca (ρ_R) foi determinada a partir da relação entre a massa (m) e o volume da amostra, determinado pelo deslocamento de óleo de soja em uma proveta graduada. Inicialmente, o óleo foi colocado na proveta e seu volume foi lido e anotado (V_1). A seguir, foram colocados na proveta com óleo 30 g da biomassa. Após a deposição total da biomassa na proveta, fez-se a leitura do novo volume indicado pelo nível do óleo (V_2). O volume da biomassa foi obtido pelo volume de óleo deslocado ($V_2 - V_1$).

A massa específica real foi calculada pela Equação 3.2:

$$\rho_R = \frac{m}{(V_2 - V_1)} \quad (g.cm^{-3}) \quad (3.2)$$

3.2.4 Porosidade

A porosidade (ξ) foi calculada a partir de uma relação entre a massa específica aparente e a massa específica (KEEY, 1991), conforme a Equação 3.3.

$$\xi = 1 - \frac{\rho_A}{\rho_R} \quad (3.3)$$

3.2.5 pH

A determinação do pH foi realizada segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005), utilizando-se um pHmetro. Foi adicionado 1 g da biomassa a 20 mL de água destilada. Após agitação magnética por 20 minutos, a mistura foi filtrada em algodão. O filtrado foi recolhido para leitura.

3.2.6 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por calcinação em mufla a 550 °C (BRASIL, 2005). Inicialmente, cadinhos de porcelana previamente dessecados e tarados receberam 2 g de amostra. Após incineração da biomassa em bico de Bunsen, os cadinhos foram

mantidos na mufla até peso constante. Os cadinhos foram então resfriados e pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem mássica (m/m).

3.2.7 Umidade

A umidade da biomassa, em base seca, foi determinada pela diferença entre a massa da amostra úmida e após secagem em estufa a 105 °C (BRASIL, 2005). Pesou-se 5 g da amostra em recipientes previamente tarados, os quais permaneceram na estufa até massa constante, sendo em seguida resfriados e pesados. O resultado foi expresso em porcentagem (m/m).

3.2.8 Sólidos solúveis totais (°Brix)

A leitura do °Brix foi realizada diretamente em refratômetro de Abbe, segundo o procedimento descrito pelas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005). Após adição de 1 g da amostra a 20 mL de água destilada, a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos. Após filtração em algodão, o filtrado foi levado ao refratômetro para a leitura do °Brix. O valor obtido foi multiplicado pelo fator de diluição.

3.2.9 Açúcares redutores (AR) e Açúcares redutores totais (ART)

Os grupos redutores foram quantificados com base no procedimento descrito por Miller (1959), que consiste na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS), com a oxidação simultânea do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Em 100mL de água destilada, foi acrescentado 1 g da biomassa, a qual ficou sob agitação por 30 minutos. Após filtração com algodão, transferiu-se 1 mL do filtrado obtido para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução DNS. Os tubos contendo as réplicas do experimento e o branco, que era formado por 1 mL de DNS e 1mL de água destilada, ficaram em banho de água fervente por exatos 5 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados do banho e resfriados à temperatura ambiente. Após resfriarem, foram adicionados 8 mL de água destilada a cada tubo, e após homogeneização, foi feito a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 540 nm.

A determinação de ART foi realizada conforme o método de Somogy-Nelson (DEMIATE *et al.*, 2002). Após a diluição da amostra, fez-se a hidrólise ácida com a adição de ácido clorídrico (HCl) 2 mol/L, seguida de aquecimento por 5 minutos em banho de água fervente. Após resfriamento, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) a 1 mol/L. Depois, seguiu-se a mesma metodologia utilizada para a determinação de açúcares redutores, com a transferência de 1 mL da solução para tubos contendo 1 mL de DNS, aquecimento, adição de água destilada e leitura .

Os resultados foram expressos em gramas de açúcares redutores totais ou açúcares redutores por 100 g de amostra inicial (g açúcares/100 g amostra).

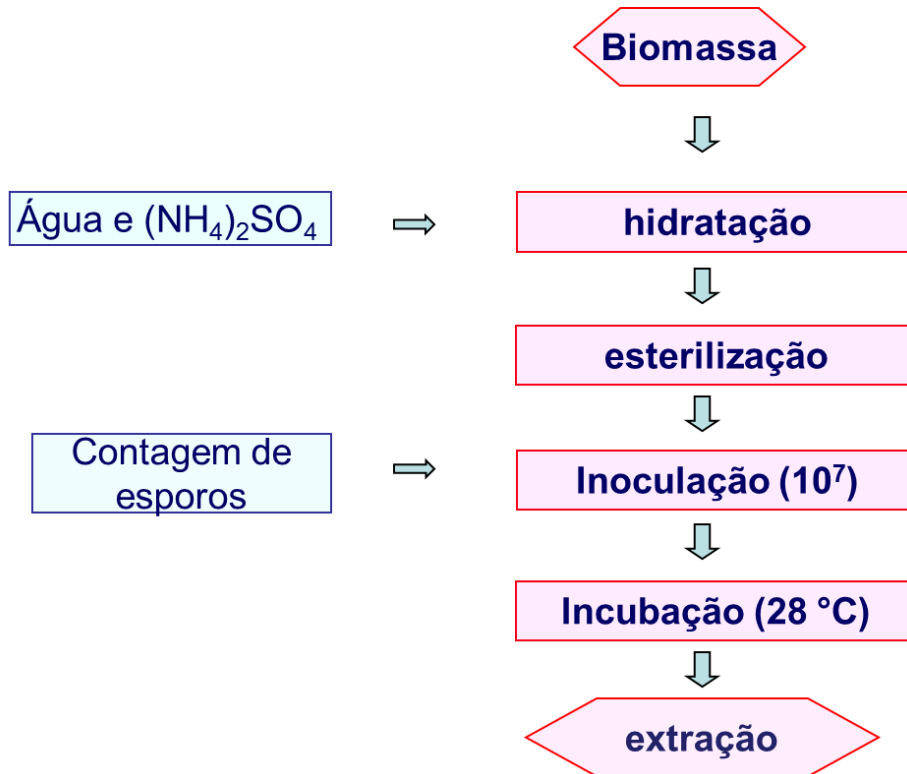
3.2.10 Determinação da concentração de celulose

A determinação do teor de celulose foi feita apenas com a biomassa da palma forrageira, para verificar a possibilidade da utilização da biomassa da palma em um processo de hidrólise enzimática para produção de açúcares redutores. O teor de celulose contido na biomassa da palma forrageira foi determinado por meio do método empregado por Xu *et al.* (2006), o qual consistiu no isolamento da celulase por meio de uma mistura de ácido acético a 80% com ácido nítrico a 70% na proporção de 10:1 (v/v). A amostra foi incubada a 120°C sob agitação. Em seguida foi adicionado hidróxido de sódio para precipitação da celulose. O precipitado foi separado e determinado gravimetricamente como celulose total.

3.3 O PROCESSO FERMENTATIVO

A o Fluxograma da Figura 3.3 mostra as etapas do processo fermentativo.

Figura 3.3 – Etapas do estudo do processo fermentativo processo fermentativo da biomassa da palma forrageira



As etapas do estudo da fermentação estão detalhadas nos tópicos seguintes.

3.3.1 Microrganismo e inóculo

O fungo *Trichoderma reesei* LCB 48 foi fornecido pela Embrapa Semiárido (Petrolina – PE). O fungo estava contido em blocos de ágar de 4-6 mm no interior de tubos tipo eppendorf, preenchidos com água destilada e estocados a temperatura de 8°C.

A repicagem do fungo foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu na incubação dos esporos contidos no tubo eppendorf em placas de Petri contendo meio básico estéril (autoclavado à 121 °C por 15 minutos). A composição do meio de cultura é mostrada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição básica do meio de cultura.

Componentes (P.A.)	Concentração (g/L)
Pectina cítrica	10,00
NaNO ₃	3,00
KH ₂ PO ₄	1,00
MgSO ₄	0,50
KCl	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Ágar-agar	20,00
Água destilada	q. s. p.*

Fonte: Couri e Farias (1995)

Após inoculação, as placas de Petri foram transferidas para estufa a temperatura de 28 °C. O tempo de incubação foi de 10 dias.

Do repique obtido nas placas de Petri, foi realizado um segundo repique utilizando arroz como meio de cultivo (CHÁVEZ-GARCIA *et al.*, 2008); conforme protocolo da EMBRAPA/CPATSA. Cerca de 300 g de arroz branco foram imersos em água destilada durante 30 minutos. Em seguida, o arroz úmido foi recolhido com o auxílio de uma peneira. Desse arroz, foram transferidos 15g para Erlenmeyer de 250 mL, os quais foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

Em cada placa de Petri do primeiro repique, adicionou-se cerca de 8 mL de Tween 80 à 0,3%. Com o auxílio de uma alça de platina, os esporos contidos no meio de cultivo foram desprendidos, formando uma suspensão homogênea. Em seguida, transferiu-se 1mL da suspensão de esporos para cada Erlenmeyer contendo o material esterilizado. Os Erlenmeyers foram incubados a 28 °C por período de 13 dias.

Para o preparo do inóculo, adicionou-se 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3% (v/v) nos Erlenmeyers contendo o arroz com esporos. Após, agitação, os esporos foram transferidos para béquer estéril com auxílio de gaze e algodão. A concentração de esporos foi determinada por meio de contagem em Câmara de Neubauer espelhada. De posse da concentração, foi calculado o volume da suspensão que deveria ser transferido para Erlenmeyers contendo a biomassa da palma já hidratado, de forma que foram inoculados 10⁷ esporos para cada grama de substrato.

3.3.2 Restabelecimento da umidade da biomassa

A hidratação da biomassa estocada foi calculada realizando-se um balanço de massa, segundo a Equação (3.4). Admitindo-se que a água tinha massa específica (ρ_{H_2O}) de 1g/mL na temperatura em que o experimento foi realizado, a massa de água foi convertida em volume de água.

$$V_{H_2O} = \frac{m_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} = m_{RES} \frac{(U_2 - U_1)}{(1 - U_2)\rho_{H_2O}} \quad (3.4)$$

Onde:

V_{H_2O} = Volume de água a ser adicionado

m_{H_2O} = Massa de água requerida para hidratação do meio

m_{RES} = Massa de resíduo seco tomado para fermentação

U_1 = Umidade presente na biomassa seca

U_2 = Umidade requerida pelo processo fermentativo

Obs.: U_1 e U_2 expressos em valores decimais

Ao volume de água medido para a hidratação, foi adicionado uma massa de sulfato de amônio correspondente a 1% da massa do meio a ser preparado para fermentação (SANTIAGO *et al.*, 2014). A solução foi adicionada à massa de resíduo, a qual foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos.

3.3.3 Substrato e cultivo semissólido

O substrato do processo fermentativo teve a raquete da palma como matéria-prima. Foram estudados segundo um planejamento fatorial 2^2 a influência da hidratação, ou seja, umidade em base úmida (U_{BU}) e da adição de sulfato de amônio (N). A Tabela 3.2 mostra os níveis do planejamento experimental. A Tabela 3.3 mostra a matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com três repetições no ponto central. Os níveis foram escolhidos com base na literatura consultada (SANTOS *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2014). A atividade monitorada foi a CMC_{case}, expressa em unidades de atividade por grama de substrato seco, U/gds (*Units per gram of dry fermented substrate*) e determinada conforme item 3.3.5.

Tabela 3.2- Níveis do planejamento experimental.

Variável	(-1)	(0)	(+1)
U _{BU} (%)	45	67,5	90
N (%)	0	0,5	1,0

Tabela 3.3- Matriz do planejamento experimental fatorial 2² com três repetições no ponto central.

Ensaio	U _{BU} (%)	N (%)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyer de 250 mL contendo 10g de cada substrato autoclavado a 121^oC por 15 minutos. Após inoculação, os Erlenmeyer foram mantidos em estufa a 28 ^oC por 48h, as enzimas foram extraídas com tampão acetato de sódio e a atividade enzimática em CMC_{ase} foi determinada para avaliação das condições dos processos fermentativos.

As condições mais adequadas foram selecionadas para uma nova fermentação, na qual foi feito um acompanhamento cinético para determinar o melhor tempo de cultivo e a atividade CMC_{ase} máxima possível.

O cultivo foi acompanhado por 208 horas, com a retirada de amostras em tempos determinados (15, 22, 28, 37, 45, 52, 61, 69, 76,85, 93, 100, 110, 134, 160, 184, 195, e 208 horas) para análise do teor de AR, umidade e atividade CMC_{ase}.

3.3.4 Extração das enzimas

Inicialmente, a extração do complexo enzimático para avaliação dos parâmetros da fermentação foi realizada de forma semelhante ao que fizeram Sousa, Silva e Conrado (2012). Em cada um dos Erlenmeyer foram adicionados 50 mL de tampão citrato de sódio 50×10^{-3} mol/L, pH 5,0. Em seguida, os Erlenmeyer foram transferidos para uma incubadora shaker da marca MARCONI à temperatura de 28°C, com velocidade de agitação de 150 rpm, por 30 minutos. A mistura obtida foi filtrada em filtro de gaze e algodão, ambos estéreis, para remoção dos esporos e partículas sólidas. O filtrado foi usado nas determinações de AR, CMC_{Case} e umidade. Posteriormente, fez-se um estudo da lixiviação para melhorar a eficiência deste processo. Tal estudo está descrito no item 3.3.6.

3.3.5 Determinação da atividade do complexo celulolítico

A atividade enzimática do complexo celulolítico foi determinada de acordo com o protocolo de Ghose (2007), com adaptações. As adaptações foram necessárias, uma vez que o extrato enzimático encontrava-se já bastante diluído, não sendo possível aplicar as diluições que o método original de Ghose (2007) propõe. Tais adaptações consistiram na alteração do tempo de incubação de 60 minutos por 1 hora e a quantidade de glicose produzida era diretamente proporcional à atividade enzimática presente, como fizeram Amorim (2010) e Lins (2012).

Foram determinadas as atividades em carboximetilcelulases (CMC_{Case}), celobiase e FPase (atividade sobre o substrato celulose amorfa).

A determinação da atividade de carboximetilcelulases ou endoglicanases foi determinada adicionando-se em um tubo de ensaio 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL de carboximetilcelulose a 1% (m/v), preparada em tampão citrato de sódio 50×10^{-3} mol/L de pH 4,8. Os tubos foram mantidos em banho termostático a 50°C por 60 minutos. Durante esse período, a reação entre as endoglicanases presentes no extrato e a carboximetilcelulose promoveu a liberação de açúcares redutores. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 1mL de DNS em cada tubo, dando início a quantificação dos açúcares redutores, conforme método descrito no item 3.2.9.

Uma amostra em branco foi realizada para cada análise, substituindo-se a carboximetilcelulose por 1 mL do tampão citrato. Dessa forma, determinou-se a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático sem a presença da carboximetilcelulose (AR_{branco}) e a concentração de açúcares redutores do extrato enzimático após incubação com a fonte de celulose ($AR_{\text{com substrato}}$).

Para todas as atividades enzimáticas testadas, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima (CMCase, FPase ou celobiase) capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto a 50°C. A atividade enzimática produzida na fermentação semissólida foi expressa em U/gds, a qual foi calculada seguindo a Equação 3.5. No caso de atividade por unidades de volume, a leitura de AR deve ser expressa em gramas de AR por mL, ao invés de gramas de AR por grama de meio fermentado.

$$\text{Atividade}_{(CMCase, FPase, celobiase)} (U / g) = \frac{AR_{\text{liberado}} \times 10^6}{180 \times 60} = \frac{(AR_{\text{com substrato}} - AR_{\text{branco}}) \times 10^6}{180 \times 60} \quad (3.5)$$

Nessa Equação, 10^6 é um fator de conversão que transforma grama em micrograma (portanto, mol em micromol), 180 é a massa molar da glicose (g/mol), 60 é o tempo de reação em minutos, $AR_{\text{com substrato}}$ é a leitura de açúcares redutores no tubo contendo o substrato, onde ocorreu reação enzimática e AR_{branco} é a leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, onde não houve reação enzimática por não haver substrato.

A atividade de celobiase foi feita de forma similar a anterior, sendo que a única diferença foi a substituição do substrato carboximetilcelulose por uma solução de celobiose 15 mM preparada no mesmo dia da análise. Uma amostra em branco foi realizada em cada ensaio, substituindo-se a celobiose pelo tampão citrato.

Por sua vez a atividade FPase ou FPU (celulase total) foi determinada por meio da dosagem de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0 x 6,0cm. Inicialmente, 1mL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 foi transferido para um tubo de ensaio, no qual foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático. O tubo foi transferido para um banho termostático a 50°C. A tira de papel foi imersa no tubo, dando início à reação das enzimas com a celulose do papel. O processo foi conduzido por 60 minutos. Em

seguida, os açúcares redutores foram quantificados conforme item 3.2.9. O ensaio em branco não continha o papel. O resultado foi calculado com o auxílio da Equação 3.5.

Neste trabalho, a atividade celulolítica pode estar expressa nas seguintes unidades:

- U/mL : Unidades de atividade enzimática por mililitro de extrato
- U/g: Unidades de atividade enzimática por grama de substrato úmido
- U/gds: Unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco

(Obs. Neste trabalho, para converter U/g em U/gds basta multiplicar o valor em U/g por dez, uma vez que dez gramas de substrato úmido contém 1 grama de palma seca nas condições de fermentação utilizadas)

3.3.6. Determinação das condições operacionais da lixiviação

Uma nova fermentação foi conduzida com os valores de umidade, fonte de nitrogênio e tempo determinados nos ensaios anteriores como os mais adequados. Na operação de lixiviação verificou-se a influência das variáveis: Agitação (Ag), tempo de contato (Tc) e relação solvente/substrato (Re, em mL/g) na extração das enzimas produzidas. A atividade CMC_{Case} foi medida para a avaliação destes parâmetros. O ensaio foi realizado em incubadora tipo Shaker (MARCONI). O estudo foi realizado segundo um planejamento experimental 2^3 . As Tabelas 3.4 e 3.5 exibem respectivamente os níveis e a matriz do planejamento. Os níveis foram baseados nos estudos de Sousa, Silva e Conrado (2012).

Tabela 3.4 - Níveis do planejamento experimental da lixiviação

Variável	(-1)	(0)	(+1)
Ag (rpm)	50	100	150
tc (min)	15	30	45
Re (mL/g)	2	3,5	5

Tabela 3.5 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central.

Ensaio	Ag (rpm)	tc (min)	Re (mL/g)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

3.3.7 Concentração do extrato bruto por precipitação.

O extrato proveniente da lixiviação encontrava-se bastante diluído. Tal característica não é desejável, pois além de impedir a utilização direta do extrato aumenta os custos do processo de concentração e purificação. Algumas técnicas como a precipitação com solvente e com sais têm sido utilizado com sucesso na precipitação de proteínas e enzimas.

Com o objetivo de avaliar a precipitação do complexo enzimático como operação inicial do processo de recuperação e concentração das enzimas do extrato bruto foram testadas duas técnicas: A precipitação por solvente e a precipitação por adição de sais, com base na metodologia empregada por Farinas e colaboradores (2011). Foram

testadas diferentes concentrações de saturação com solvente orgânico (etanol) e sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄).

3.3.7.1. Precipitação com solventes orgânicos.

Como agente precipitante, foi utilizado o etanol 95°GL, conforme a metodologia empregada por Santos (2011).

O etanol foi previamente aclimatado em freezer (entre -15 e -25°C, de acordo com o fabricante). Os testes foram realizados com 30mL do extrato enzimático e foram conduzidos em banho de gelo. O solvente foi acrescentado lentamente ao extrato enzimático sob leve agitação. As proporções de solvente testadas foram de 1:1; 1:2 e 1:3 (mL/mL). A precipitação ocorreu por 12 horas a no interior de um freezer vertical a cerca de -20 °C. Esta temperatura foi necessária para diminuir a solubilidade das enzimas e evitar sua desnaturação pela presença do álcool. Em seguida, os tubos foram centrifugados ainda frios, (com temperatura de aproximadamente 5°C) a 2000 rpm por 10 min. Os precipitados resultantes foram lavados com água destilada, deixados à temperatura ambiente até evaporação do solvente (constatada pela ausência do odor de álcool nos precipitados) e ressuspensos com tampão citrato 0,05M de pH 4,8. Em seguida, a atividade de CMCase foi determinada e comparada com aquela que o extrato bruto apresentava.

3.3.7.2 Precipitação com sulfato de amônio.

Inicialmente foram calculadas as massas de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) que resultasse em soluções com 20, 40, 60 e 80 % (massa/volume) da concentração de saturação do sal, quando adicionadas a 30 mL de extrato enzimático contidos em tubos tipo Falcon. As massas calculadas foram de, respectivamente, 4,236; 8,472; 12,708 e 16,944g. A adição foi feita com agitação branda, em banho de gelo, até completa solubilização do sal. As amostras foram então mantidas em geladeira por 12 horas, sendo em seguida centrifugadas a 2000 rpm a cerca de 5 °C por 10 min. Após leve lavagem com água destilada, o precipitado foi ressuspensado em tampão citrato de sódio (pH 4,8). A atividade CMCase foi determinada e comparada com a contida no extrato bruto.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

3.4.1 Determinação da temperatura ótima da atividade enzimática

O estudo da determinação da temperatura ótima da atividade enzimática foi baseado na metodologia empregada por Akcapinar, Gul e Sezerman (2012). A atividade de cada enzima em diferentes temperaturas (25, 40, 55, 70, 85 e 100°C) foi determinada com base na metodologia de Ghose (1987), descrita no item 3.3.5. Cada enzima (extrato) e substrato (CMC) foram pré-incubados separadamente na temperatura do ensaio por 5 minutos. Em seguida, 0,5 mL do substrato foram adicionados a 0,5 mL do extrato. Após 15 minutos, a reação foi interrompida com banho de gelo e adição de 1mL de DNS para quantificação de açúcares redutores. A atividade residual em cada ensaio foi calculada em relação ao ensaio de maior atividade, considerando a atividade de 100% na temperatura de maior atividade.

3.4.2 Determinação do pH ótimo da atividade enzimática

O estudo do efeito do pH na atividade enzimática foi baseado na metodologia empregada por Akcapinar, Gul e Sezerman (2012). A atividade de cada enzima em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0) foi determinada com base na metodologia de Ghose (1987), descrita no item 3.3.5. Para este ensaio, a extração das enzimas por lixiviação foi realizada com água destilada, e os ensaios para medição da atividade enzimática foram realizados na presença de tampões (tampão glicina-NaOH para pH 3,0; tampão acetato de sódio de sódio para pH entre 4 e 5,5 e tampão Tris-HCl para pH acima de 6,0. Todos com concentração de 0,1mol/L). A reação enzimática foi conduzida por 15 minutos, à temperatura de 55°C. Passado esse tempo, a reação foi interrompida com banho de gelo e adição de 1mL de DNS para quantificação de açúcares redutores. A atividade residual em cada ensaio foi calculada em relação ao ensaio de maior atividade, considerando a atividade de 100% no pH de maior atividade.

3.5 PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DO EXTRATO UTILIZANDO SABs.

Para o estudo da purificação de celulases por meio de SABs, foram inicialmente testados SABs formados por polietilenoglicol e tampão citrato de sódio à temperatura ambiente (25 °C).

A formação dos SABs foi baseada em dados de equilíbrio presentes na literatura, como no trabalho de Porto *et al.* (2007), os quais auxiliaram na escolha das concentrações de PEG e citrato a serem testadas. Este sistema foi escolhido pela facilidade de operação, pelo baixo risco ambiental oferecido por seus constituintes e pelas aplicações existentes na literatura, onde esse tipo de SAB tem sido aplicado com sucesso na purificação de diversas biomoléculas, inclusive celulases, como no trabalho de Herculano *et al* (2012).

Os ensaios foram realizados segundo um planejamento experimental fatorial completo 2^4 com quatro repetições no ponto central. Foram estudados a influência da massa molar do polímero, concentração do polímero, concentração do sal e pH na partição e recuperação de celulases. O extrato utilizado foi proveniente da etapa de lixiviação. A matriz do planejamento encontra-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Matriz de planejamento para o estudo dos SABs

Ensaio	M PEG (g/mol)	C PEG (%)	C Citrato (%)	pH
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Os valores utilizados para cada nível estão exibidos na Tabela 3.7. Os níveis foram baseados nos utilizados por Herculano *et al.* (2012).

Tabela 3.7 - Valores descodificados utilizados no planejamento

Variável	-1	0	+1
Massa molar do PEG (g/mol)	4000	6000	8000
Concentração de PEG (%m/m)	18	20	22
Concentração de citrato (% m/m)	12	14	16
pH	5,0	6,0	7,0

3.6 AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS DE PURIFICAÇÃO

3.6.1 Determinação dos coeficientes de partição dos SABs

Os coeficientes de partição foram determinados segundo Prodanović e Antov (2008). O coeficiente de partição (K) é definido como a concentração de proteína ou atividade enzimática na fase superior dividida pelo valor correspondente na fase inferior, como exibido nas Equações 3.6 e 3.7.

$$K_p = \frac{C_T}{C_B} \quad (3.6)$$

$$K_E = \frac{A_T}{A_B} \quad (3.7)$$

Onde C_T e C_B são as concentrações de proteína total em mg/mL nas fases superior e inferior, respectivamente, e A_T e A_B são as atividades enzimáticas nas fases superior e inferior, respectivamente.

3.6.2 Avaliação dos processos de recuperação

Para melhor avaliação do processo de recuperação das celulases nos SABs foi necessário o cálculo de outros parâmetros além dos coeficientes de partição. Portanto calculou-se a atividade enzimática específica (AS), expressa em U/mg; o fator de purificação (FP) e a recuperação de enzimas na fase superior (RT) e na fase inferior (RB).

- A atividade enzimática específica da enzima em cada uma das fases será determinada conforme Equação 3.8:

$$AS_{fase} = \frac{A_{fase}}{C_{fase}} \quad (U / mg) \quad (3.8)$$

Onde A_{fase} e C_{fase} são a atividade enzimática em uma das fases ou etapas e a concentração de proteínas naquela fase respectivamente.

- O fator de purificação da atividade enzimática em cada uma das fases ou etapas será calculada de acordo com a Equação 3.9:

$$FP_{fase} = \frac{AS_{fase}}{AS_{extrato}} \quad (3.9)$$

Onde $AS_{extrato}$ corresponde a atividade enzimática específica do extrato após a operação de lixiviação (recuperação das enzimas a partir do meio semi-sólido fermentado).

- A recuperação de atividade enzimática nas fases superior e inferior dos SABs foram obtidas através das Equações (3.10) e (3.11).

$$Y_t (\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_b}{V_t} \cdot \frac{1}{K_e} \right)} \quad (3.10)$$

$$Y_b (\%) = \frac{100}{1 + K_e \cdot \frac{V_t}{V_b}} \quad (3.11)$$

Nas quais V_t e V_b são os volumes das fases superior e inferior, respectivamente.

3.6.3 Determinação do teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas no extrato e nas fases dos SABs foi realizada pelo método de Bradford (1976); utilizando-se albumina do soro bovino como padrão.

Para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 100mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95°GL. Em seguida adicionou-se 100mL de ácido fosfórico. A solução resultante foi diluída para um litro com água deionizada. A solução ficou sob agitação magnética por quatro horas, ao abrigo da luz, sendo em seguida filtrada em papel qualitativo e transferida para um vidro âmbar coberto com papel alumínio. O reagente foi guardado em geladeira (8 °C).

Para a leitura, foram misturados 0,5 mL da amostra com 3,5 mL do reagente. Após 15 minutos, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Na ocasião da leitura, foi elaborada uma curva de calibração a partir de soluções padrão de BSA, entre 0 e 0,1 mg/mL (as concentrações dos padrões foram 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06, 0,08, 0,09 e 0,1 mg/mL)

3.7 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.

3.7.1 - Material lignocelulósico e pré-tratamento

O extrato bruto proveniente da fermentação foi testado em um processo de sacarificação seguido de fermentação alcoólica para se verificar a aplicabilidade dos extratos produzidos na hidrólise de biomassa lignocelulósica. O material lignocelulósico escolhido foi a própria biomassa da palma, inclusive o material sólido que constituía o meio de cultura proveniente da etapa de filtração do extrato bruto obtido na etapa de extração sólido-líquido.

Portanto, o teste foi feito com dois tipos de materiais: Resíduo seco de palma (RP), obtido conforme o item 3.1.1 e resíduo da fermentação semissólida (RF), obtido por meio da secagem e moagem da torta úmida resultante da lixiviação e filtração da fermentação.

Inicialmente, as amostras foram pré-tratadas segundo a metodologia empregada por Sukumaran *et al.* (2009). Cerca de 10g das amostras de RP e RF foram imersas em NaOH 0,1mol/L e deixadas por 1 hora em autoclave a 120°C. Após esfriamento à

temperatura ambiente, as amostras foram lavadas várias vezes em água da torneira para neutralizar o pH (monitorado por meio de fenolftaleína), seguido por uma lavagem final em água destilada. Em seguida as amostras foram secas em estufa (65°C) e guardadas em geladeira para posterior utilização.

3.7.2 Sacarificação enzimática

A sacarificação enzimática da biomassa foi realizada conforme a metodologia empregada por Sukumaran *et al.* (2009), por meio da incubação da biomassa pré-tratada seca (RP ou RF) em extrato enzimático bruto ou proveniente da operação dos SABs. Foram transferidos 1 grama de biomassa para um balão de 250mL de capacidade, contendo 50 mL do extrato enzimático dissolvido em tampão citrato pH 4,8 (50mM). Os frascos foram tampados e permaneceram sob agitação em Shaker a 45°C a 100 rpm por 40 horas.

Medições de AR foram realizadas durante o período da hidrólise, em tempos regulares, para verificar se ocorreu produção de glicose, o que comprovaria a hidrólise do material lignocelulósico, assim como fizeram Baracho *et al.* (2009).

A produtividade em termos de glicose foi calculada dividindo-se a quantidade de glicose produzida pelo tempo que o processo levou para produzi-la, de acordo com a Equação 3.12.

$$P = \frac{AR_t - AR_i}{t} \quad (3.12)$$

Onde P é a produtividade, AR_t a quantidade de AR presente no tempo t, AR_i a quantidade de AR presente no tempo inicial (0h) e t o tempo de processo em horas. A produtividade foi expressa em miligramas de AR por litro por hora (mg/L.h).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são mostrados e discutidos os resultados que foram obtidos nesta pesquisa.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS

Os resultados da caracterização das biomassas, tanto da palma integral (PI) quanto da lavada (PL) estão apresentados na Tabela 4.1, em base seca.

Tabela 4.1. Caracterização das biomassas (base seca)

Parâmetros analisados	Valor PI	Valor PL
Umidade (%)	11,71 ± 0,28	9,40 ± 0,14
Cinzas (%)	5,80 ± 0,18	4,04 ± 0,30
ART (g/100g amostra)	14,44 ± 0,35	2,73 ± 0,02
AR (g/100g amostra)	9,47 ± 0,62	2,10 ± 0,06
Sólidos solúveis Totais (°Brix)	60,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
Celulose (%)	37,34 ± 3,97	-----
pH	4,62 ± 0,01	4,76 ± 0,05
Massa específica aparente (g/mL)	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Massa específica (g/mL)	1,25 ± 0,01	1,25 ± 0,01

De acordo com Batista, Carvalho e Rocha Filho (2013) a composição química da palma forrageira é influenciada pela espécie, idade da planta, variedade, ordem do cladódio e tratos culturais. Nas espécies tradicionalmente cultivadas no Nordeste do Brasil, dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, o teor de matéria seca (MS) varia de 99 a 101 g/kg MS; ou seja, a palma possui de 89,9 a 90,1% de água. A palma utilizada neste trabalho apresentou cerca de 90% de água.

A quantidade de água presente na palma garante a hidratação dos animais durante a época de seca, caso seja utilizada na alimentação de ruminantes. Porém, este percentual de água é o mínimo exigido por muitos microrganismos, como a *Saccharomyces cerevisiae*, para o cultivo semissólido em substrato formado pela biomassa da palma forrageira (Araújo *et al.*, 2005).

Após processamento da biomassa, a matéria seca triturada apresentou umidade residual de 11,71% para PI e 9,40% para PL. Estes valores de umidade são adequados

para o armazenamento das biomassas, uma vez que *Araújo et al.* (2005), ao estudarem o equilíbrio higroscópico da palma forrageira com o objetivo de determinar a umidade ótima para o cultivo semissólido desta biomassa, concluíram que não ocorre desenvolvimento microbiano na biomassa da palma seca com umidade residual de até 15%, o que corresponde a uma atividade de água abaixo de 0,35 na temperatura de 30°C, pois a atividade de água mínima para crescimento de microrganismos na biomassa de palma está em torno de 0,89.

Quanto ao teor de cinzas, Batista, Carvalho e Rocha Filho (2013) afirmam que o percentual de cinzas na palma varia de 81 a 192g/kg de matéria seca (8,1% a 19,2%). Este valor é influenciado por fatores tais como umidade e composição mineral do solo. O teor de cinzas encontrado neste trabalho para PI e PL foram, respectivamente, cerca de 5,80 e 4,04% (ou 58 e 40,4 g/Kg respectivamente). Porém, Santos *et al.* (2011) chegaram a encontrar um valor de 241,7 g/Kg para o teor de cinzas em base seca. Torres Neto (2010) encontrou um valor de 91,6 g/Kg para o teor de cinzas na matéria seca da palma. A diminuição do teor de cinzas da palma lavada (PL) foi provavelmente provocada pela perda de minerais solúveis durante o processo de lavagem. Embora o teor de cinzas das biomassas PI e PL tenha sido inferior aos relatados na literatura, é possível que as biomassas ainda apresentem micronutrientes suficientes para o desenvolvimento microbiano.

De acordo com Batista, Carvalho e Rocha Filho (2013), a cinza da palma é formada principalmente por cálcio, magnésio e potássio, além de outros minerais. Mandels e Reese (1956) estudaram a influência de minerais na produção de celulases por *Trichoderma viride* e concluíram que a presença de cátions metálicos tanto podem induzir quanto inibir a produção de celulases, dependendo da concentração, pois alteram o metabolismo do microrganismo. Porém, a combinação de pequenas quantidades de íons metálicos, tais como: cálcio, magnésio, estrôncio, zinco e cobalto é importante para o metabolismo do microrganismo e a excreção de celulases.

Na literatura, há relatos da produção de biomoléculas por fermentação semissólida da biomassa da palma utilizando fungos filamentosos, sem a necessidade de suplementação (SANTOS *et al.* 2011; SANTOS *et al.* 2012; CARVALHO *et al.*, 2012; SANTANA *et al.*, 2012), o que demonstra ter a palma forrageira nutrientes suficientes para o desenvolvimento dos microrganismos e sua manutenção durante o processo fermentativo.

Em relação ao teor de açúcares, Batista, Carvalho e Rocha Filho (2013) relatam que a massa seca da palma é constituída por 80% de carboidratos. Neste trabalho foram avaliados apenas o teor de ART e AR, que representam os carboidratos imediatamente disponíveis para o metabolismo dos microrganismos na fermentação semissólida. Fawole e Odunfa (2003) mencionam que é interessante que a glicose esteja disponível no substrato para o microrganismo em quantidade suficiente para proporcionar um crescimento inicial da população microbiana, mas não o bastante para impedir que o microrganismo seja capaz de metabolizar a fonte indutora, a celulose. Por outro lado, é importante que a fonte indutora não apresente um valor percentual acentuado de forma a inibir a excreção da enzima pelo microrganismo.

Os valores de ART obtidos para a biomassa seca da palma foi de 14,44% para a PI e 2,73% para a PL, o que mostra que apesar de ter removido boa parte dos açúcares, a lavagem não foi completa, exigindo mais tempo e mais água corrente para total remoção dos sólidos solúveis. Torres Neto (2010) encontrou para a palma forrageira um valor de ART inferior a este trabalho, cerca de 5,20%. Já os teores de AR para PI e PL foram de, respectivamente, 9,47 e 2,10%; o que demonstra ter a massa seca da palma um teor de monossacarídeos suficiente para adaptação do microrganismo ao substrato na fermentação semissólida.

Na produção de celulasas por *Trichoderma reesei*, tem sido relatado que a presença da glicose tem efeito inibidor na produção de celulasas, como constataram Mandels e Reese (1953), mas a presença da glicose no início da fermentação é tão importante quanto a de minerais. Segundo estes pesquisadores, em muitos casos, a produção de celulasas por *Trichoderma viride* só inicia quando os açúcares presentes são totalmente consumidos. Arantes e Saddler (2010) afirmam que, geralmente, as enzimas do complexo celulolítico sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise.

De acordo com Chandra, Viswanath e Reddy (2007), a adição de pequenas quantidades de sucrose e celulose ao meio de cultura (respectivamente 0,03 e 0,05g por grama de lignocelulose presente) no início da fermentação promove uma melhor proliferação do fungo e induz a produção de celulasas mais rapidamente. Por outro lado, Zúñiga *et al.* (2011) estudando a produção de celulasas por *Aspergillus niger* utilizando bagaço de cana e farelo de trigo como substrato, verificaram que a adição de sacarose ao meio de cultura não favorece a produção de celulasas. Isso é coerente com os estudos de Seiboth *et al.* (1997), os quais observaram que o sistema celulolítico microbiano pode sofrer repressão catabólica caso estejam na presença de elevadas

concentrações de açúcares, tais como glicose, maltose e arabinose. Fontana e Silveira (2012) constataram que concentrações de glicose acima de 10% provocam efeito inibitório na produção de poligalacturonases por *Aspergillus orizae* em substrato de farelo de trigo.

O teor de sólidos solúveis totais foi relativamente alto para a PI (60°Brix) quando comparado ao teor de ART. Isso significa que, além de açúcares, a palma apresenta um alto teor de outras substâncias solúveis, tais como ácidos orgânicos. Já o teor de sólidos solúveis para a PL foi de 10°Brix, significando que o processo de lavagem da palma removeu parte dos minerais e outras substâncias presentes no substrato, porém mais uma vez constata-se que o processo de lavagem não foi suficiente para remover todos os sólidos solúveis presentes na palma. Durante a lavagem, por mais que se acrescentasse água, não se percebia diminuição no °Brix.

O teor de celulose na biomassa da palma seca foi de 37,34 %. Este valor foi superior ao encontrado por Torres Neto (2010), que foi de 20,39%; e ao determinado por Tosto *et al.*(2007), que foi de 21,15% para a biomassa da palma forrageira seca. Lins (2012) determinou um teor de 32,37% de celulose para o resíduo agroindustrial do caju. Já Herrera *et al.* (2004) encontrou um percentual de celulose de 34% para a palha de sorgo. Portanto, o teor de celulose determinado para a palma neste trabalho é importante, porque além desse polissacarídeo ser uma fonte indutora na produção das celulases, também pode sofrer hidrólise enzimática, sendo transformado em açúcares fermentescíveis.

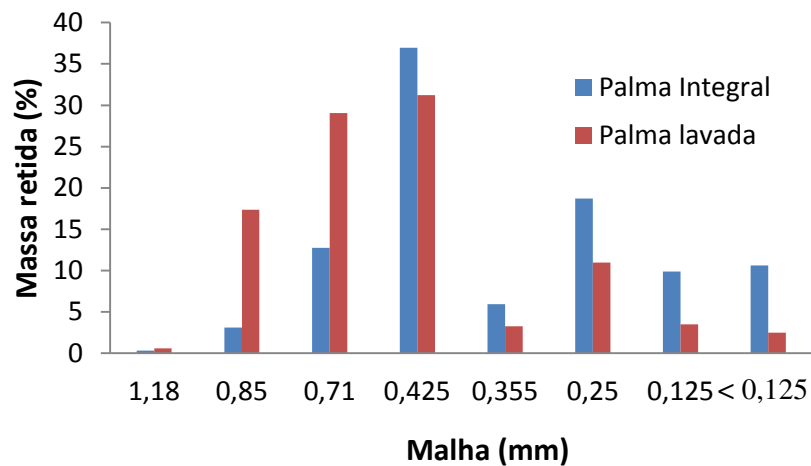
O pH, medido no extrato obtido da palma sólida seca, foi de: 4,62 para PI e 4,76 para PL, esses valores demonstram que esse material é um substrato adequado para o desenvolvimento de fungos filamentosos, pois, de acordo com Sohail *et al.* (2009), a produção de celulases por *Aspergillus niger* só tem início quando o substrato apresenta valores de pH próximos a 4,0. Segundo os mesmos autores, caso o pH inicial do meio seja maior que 4,0; ele diminuirá no decorrer da fermentação, estabilizando em valores entre 3,5 e 4,0.

O pH da PL foi mais elevado devido a possível remoção de ácidos orgânicos durante o pré-tratamento por lavagem. Estes valores foram um pouco superiores ao determinado por Santos *et al.* (2011) para a biomassa da palma, que foi de 4,45. Já o valor de pH medido por Torres Neto (2010) foi de 4,12. O pH é uma variável importante na obtenção de enzimas por fermentação semissólida, e o meio ácido é uma vantagem. Segundo Zheng e Shetty (2000), as enzimas produzidas por

microrganismos em processos de fermentação semissólida com resíduos cítricos apresentam maior estabilidade frente às variações de pH. Isto foi confirmado por Souza *et al.* (2010), que estudaram a produção de pectinases por *Aspergillus niger* em substrato formado por casca e albedo de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*), e verificaram que a enzima era estável em valores de pH entre 3,5 a 5,5.

A distribuição granulométrica das biomassas trituradas encontra-se representada na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Distribuição granulométrica das biomassa da palma integral e da palma lavada



A Figura 4.1 mostra que a lavagem da biomassa da palma resultou em um material com maior tamanho de grãos quando moído. Enquanto a biomassa da palma integral resultou em um material com 53% das partículas com tamanho superior a 0,425 mm, o material resultante da trituração da palma lavada apresentava 78,25% das partículas com tamanho superior a 0,425 mm. Portanto a lavagem da palma diminuiu consideravelmente a formação de partículas com reduzido diâmetro. Os finos (partículas não retidas pela peneira de 0,125 mm) representaram 10,63% para a palma integral. A palma lavada tinha apenas 2,49% de finos. É possível que o procedimento de lavagem tenha removido partículas solúveis que, na palma integral, formariam aglomerados frágeis e quebradiços durante a secagem, originando uma grande quantidade de partículas com reduzido tamanho.

Em relação à granulometria do leito para a fermentação semissólida, os estudos realizados por Botella *et al.* (2007), que utilizaram diferentes granulometrias de partículas para a produção de pectinases e xilanases (0,06 a 1,00 mm; 0,74 a 1,00 mm

e 1,00 a 1,60 mm) mostraram que o tamanho das partículas não teve influência significativa na produção das enzimas.

Porém, de acordo com Souza *et al.* (2010), o tamanho das partículas pode ter influência no processo de fermentação semissólida, uma vez que, embora partículas de reduzido tamanho ofereçam maior área superficial para o ataque microbiano, as partículas tendem a compactar-se mais facilmente, dificultando a aeração do sistema e a respiração das células. Já as partículas maiores facilitam a aeração por promoverem mais espaço interpartículas, porém prejudicam a absorção dos nutrientes pelo microrganismo. Por isso, Pinto *et al.* (2005), ressaltam que o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais, para que o ar necessário ao desenvolvimento microbiano atravesse os espaços vazios do meio.

O valor da massa específica aparente para a palma integral e a palma lavada foi de 0,30 e 0,27 g/cm³ respectivamente. De acordo com Souza *et al.* (2010), os valores de massa específica aparente revelam que estes resíduos não apresentam tendência à compactação, gerando os espaços vazios entre suas partículas, suficientes para a respiração e o metabolismo do microrganismo quando aplicados na fermentação semissólida. Quanto à massa específica, ambos os resíduos apresentaram, como era de se esperar, o mesmo valor: 1,25 g/cm³.

Com os valores de massa específica e massa específica aparente foram calculadas as porosidades máximas que o leito da fermentação semissólida pode apresentar. Estes valores foram $0,760 \pm 0,01$ e $0,780 \pm 0,01$ para a biomassa processada da palma integral e da palma lavada respectivamente. A palma integral apresentou maior porosidade porque tinha maior quantidade de partículas de tamanho reduzido. Esses valores de porosidade são suficientes para favorecer a aeração do sistema, tornando disponível o oxigênio necessário ao desenvolvimento dos microrganismos.

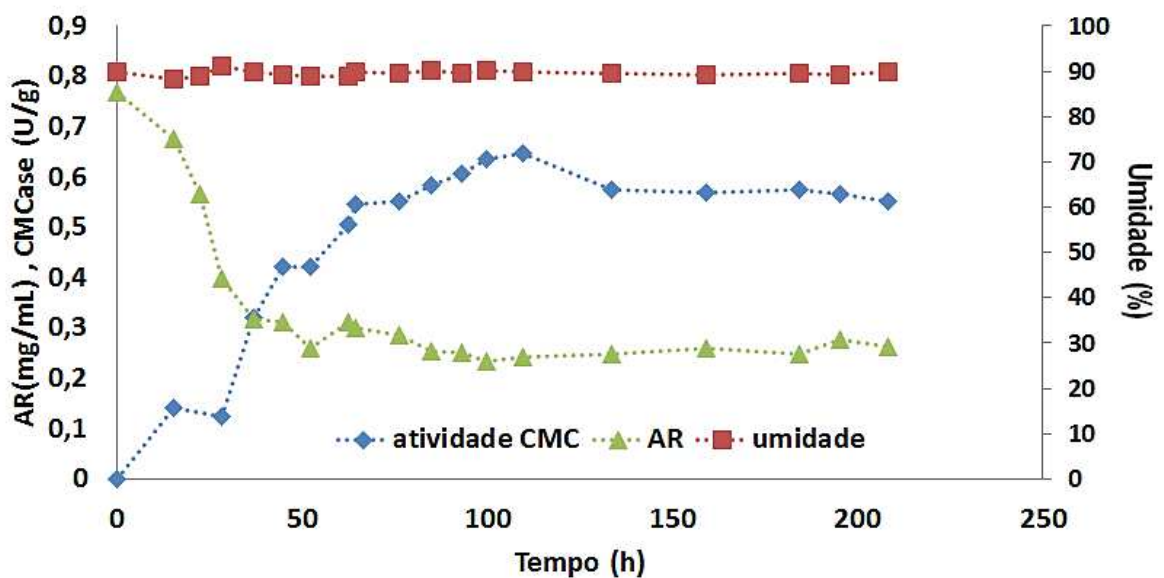
4.2 - FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.

4.2.1 Acompanhamento cinético

Uma fermentação foi conduzida utilizando a biomassa seca da palma forrageira sem a operação de lavagem (PI). Os parâmetros iniciais do processo foram baseados na bibliografia consultada. A umidade foi fixada em 90% (ARAÚJO *et al.* 2005). Já os

demais parâmetros, como a adição de 1% de sulfato de amônio e inoculação de 10^7 esporos de *Trichoderma Reesei* LCB 48 por grama de substrato, seguiram a metodologia utilizada por Amorim (2010) e Lins (2012) no cultivo semissólido de *Trichoderma reesei* em resíduo de caju. A fermentação ocorreu a 28°C por 280 horas. Durante o processo, foram recolhidas amostras periodicamente para acompanhamento da variação de AR, umidade e atividade CMCCase no meio fermentado. Os resultados deste procedimento estão na Figura 4.2. Os dados de atividade no gráfico estão expressos em unidades de atividade por grama de substrato hidratado (U/g), para facilitar sua comparação com outros parâmetros de mesma ordem de grandeza.

Figura 4.2. Acompanhamento cinético da produção de CMCCase na fermentação semissólida da Palma Integral



A Figura 4.2 mostra que, durante as primeiras 50 horas, houve uma grande redução no total de açúcares redutores presentes. Desde as primeiras horas da fermentação, o microrganismo passou a metabolizar os açúcares presentes, não havendo a necessidade de excretar enzimas para hidrolisar a celulose da palma e produzir mais açúcares.

Porém, a partir de 25 horas de fermentação, observa-se uma crescente produção de atividade CMCCase, ao mesmo tempo em que o teor de glicose continua diminuindo, até estabilizar após 100 horas de fermentação.

A atividade CMCase atinge um máximo em 110 horas (0,645U/g ou 6,45 U/gds). Neste ponto, a produtividade foi de 0,006 U/g.h.

Há uma pequena redução na atividade de CMCase depois das 110 horas. O gráfico mostra a tendência da fermentação ser conduzida por muito mais tempo, porém com redução de produtividade, a qual era 0,002U/g.h nas 208 horas de processo.

Trabalhos desenvolvidos com base na fermentação semissólida da palma forrageira têm, geralmente, encontrado atividade ótima em torno de 72 horas (Santos *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2012).

O extrato enzimático com maior atividade obtido nesta etapa deste trabalho foi 0,129 U/mL. Em geral, a produção de celulases por fermentação semissólida tem produzido extratos com atividade inferior a 1U/mL. Rajeev *et al.* (2009) estudando a produção da enzima celulase empregando *T. reesei* Rut C-30 em farelo de trigo quimicamente tratado como substrato, produziram níveis apreciáveis de atividade de endoglucanase (0,45 U/mL). Já Victor *et al.* (2003) obtiveram 0,0743, 0,0573 e 0,0502 U/mL de celulase durante 120h de fermentação utilizando serragem, bagaço de cana e sabugo de milho, respectivamente, como substratos para produção de celulases por uma cepa de *Aspergillus flavus*.

Estes valores não diferem muito quando se trata de fermentação submersa, pois Aguiar e Menezes (2000) estudaram a produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* por meio da fermentação submersa utilizando o bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram atividade de CMCase de 0,20 U/mL.

A Figura 4.2 mostra que a umidade permaneceu praticamente constante, em cerca de 90%. Portanto, havia atividade de água suficiente para os microrganismos manterem-se viáveis após 200 horas de fermentação.

4.2.2 - Avaliação da lavagem da biomassa, da umidade e da adição de fonte de nitrogênio.

A lavagem da biomassa da palma triturada teve por objetivo a remoção dos açúcares e sólidos solúveis. Tal procedimento foi realizado porque em ensaios preliminares verificou-se que, na palma lavada, os fungos se desenvolviam mais rapidamente. Além disso, o procedimento de lavagem diminui o teor de glicose no substrato, forçando os microrganismos a buscarem fontes alternativas de carbono, como a celulose, sendo induzidos a produzirem celulases para quebrar a molécula de

celulose e obter glicose para seu metabolismo. Assim, como observaram Amorim (2010) e Lins (2012), a produção de celulase na biomassa lavada inicia-se mais rapidamente. Nesta etapa, a avaliação dos resultados foi feita pela determinação da atividade em carboximetilcelulose (CMCase). O ensaio foi conduzido por 110 horas. Os resultados obtidos estão na Tabela 4.2, junto com os respectivos desvios-padrão.

Tabela 4.2 - Avaliação da influência da lavagem, adição de nitrogênio e umidade na obtenção de CMCase.

Ensaio	U (%)	N (%)	CMCase PI (U/gds)	CMCase PL (U/gds)
1	-1 (45)	-1 (0)	0,089 ± 0,101	0,628 ± 0,011
2	+1 (90)	-1 (0)	2,078 ± 0,205	4,296 ± 0,058
3	-1 (45)	+1 (1)	0,000 ± 0,007	0,640 ± 0,002
4	+1 (90)	+1 (1)	4,870 ± 0,044	3,780 ± 0,046
5	0 (67,5)	0 (0,5)	1,601 ± 0,031	1,774 ± 0,011
6	0 (67,5)	0 (0,5)	1,501 ± 0,046	1,622 ± 0,032
7	0 (67,5)	0 (0,5)	1,349 ± 0,025	1,580 ± 0,044

Como pode ser verificado na Tabela 4.2, o procedimento de lavagem da matéria prima diminuiu a quantidade de água necessária para o desenvolvimento dos microrganismos, uma vez que na palma lavada, além da maior proliferação dos fungos observou-se a produção de atividade enzimática no substrato com umidade inicial de 45%, conforme mostra a comparação entre os valores dos resultados dos ensaios 1 e 3.

Além disso, os mais altos valores de atividade em ambos os casos foram obtidos com o teor mais elevado de umidade. Isto representa uma vantagem, pois, como a raquete da palma possui cerca de 90% de umidade, é possível aplicar a biomassa da palma como substrato para fermentação semissólida *in loco* com um mínimo de processamento (apenas trituração e esterilização), sem a necessidade de se adicionar água nesta etapa do processo.

Uma vez que o maior valor de atividade foi obtido para a palma integral, não há vantagens em lavar a biomassa da palma para compor o substrato da fermentação, mesmo porque, sendo a água um recurso escasso no semiárido, o procedimento de lavagem iria desperdiçar grande quantidade de água e produzir um rejeito rico em

matéria orgânica que poderia poluir os poucos mananciais e reservatórios da região ou elevar os custos de produção com seu tratamento antes de ser lançado no ambiente.

De acordo com os estudos de Araújo *et al.* (2005), a umidade de 90% equivale a uma atividade de água (a_w) de 0,89 (a 30°C) que é a mínima necessária para o cultivo semissólido de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando a biomassa da palma forrageira. Santos *et al.* (2011), estudando a produção de celulases de *Rhizopus sp.* por cultivo semissólido de palma, determinaram que os melhores valores de atividade de água para a produção de CMCase era de 0,949. Já Carvalho *et al.* (2012), que estudaram a produção de celulases pela fermentação da biomassa da palma doce com *Aspergillus niger* determinaram a atividade de água de 0,985; equivalente a uma umidade de 85% como a mais adequada.

Entretanto, Amorim (2010) estudou a produção de celulases por *Trichoderma sp* em bagaço de caju lavado e sem lavar e observou que, para umidade de 45%, o pico de atividade foi atingido mais rapidamente quando se utilizou a matéria-prima lavada.

Lins (2012) alega que o teor de umidade do substrato é um dos fatores que mais afetam o crescimento microbiano e a formação de produto, pois determina a quantidade de água inicial disponível para o microrganismo (a_w) e promove a dilatação do substrato, facilitando a penetração de micélio para a utilização do substrato.

Alcântara, Leite e Silva (2013); que estudaram a produção de pectinases por *Aspergillus niger* na fermentação semissólida do resíduo do caju, determinaram que a atividade de água mais favorável para a síntese das enzimas era superior a 0,9; o que era atingido, no caso da utilização do resíduo do caju como substrato, em teores de umidade acima de 35%. Os autores ressaltam que a atividade de água, a qual está relacionada à umidade, é um fator limitante na fermentação semissólida, pois pode interferir no crescimento do microrganismo e em suas reações metabólicas.

Em relação à palma integral, ou seja, a biomassa de palma não lavada, os resultados da Tabela 4.2 mostram que os ensaios conduzidos com 45% de umidade (1 e 3) resultaram em baixa ou nenhuma atividade celulolítica.

No ensaio 2, com umidade inicial de 90% foi possível obter atividades maiores. No ensaio 4, observa-se que, com a suplementação de nitrogênio, a atividade celulolítica mais que dobrou. Este ensaio apresentou a maior produtividade (0,101 U/gds.h), sendo, possivelmente uma condição adequada para operação da FSS.

Em relação ao ponto central (Ensaio 5, 6 e 7), com teor médio de umidade e suplementação, observa-se que os valores foram intermediários aos obtidos com os

valores mínimos dos fatores (ensaio 1) e máximos (ensaio 4), sugerindo que a atividade tem comportamento linear para os níveis estudados.

Além disso, foi observado que os extratos obtidos nos ensaios com baixa umidade apresentavam-se mais escuros que aqueles produzidos na presença de umidades maiores, como pode ser observado na Figura 4.3. Observa-se também que os extratos de cores mais claras possuem maior atividade, os mais escuros provavelmente possuem maior concentração de impurezas.

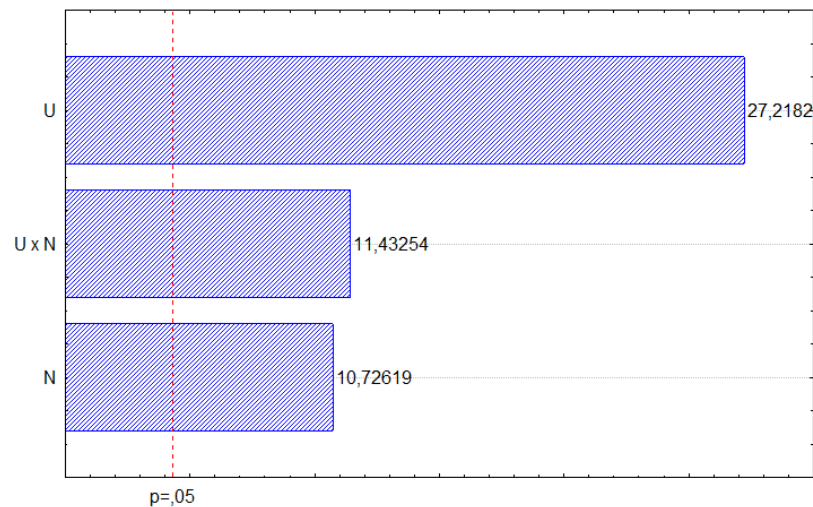
Figura 4.3- Aspecto dos extratos brutos recolhidos em cada ensaio da PI



Para melhor avaliação dos dados experimentais, foi feito o tratamento estatístico dos dados obtidos com a ajuda do software Statistica 5.0.

O diagrama de Pareto (Figura 4.4) mostra que tanto a umidade quanto a adição de fonte de nitrogênio são parâmetros estatisticamente significativos no processo fermentativo, influenciando positivamente na obtenção de atividade celulolítica.

Figura 4.4- Influência das variáveis fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na fermentação da biomassa da palma integral (PI)



O modelo de regressão de primeira ordem proposto está na Equação 4.1. Tal modelo explica 98,9% das variações.

$$CMCase = 1,64114 + 1,71475U + 0,67575N + 0,72025UN \quad (4.1)$$

Conforme relatam Alcântara, Leite e Silva (2013), a suplementação do substrato com sulfato de amônio em pequenas quantidades geralmente resulta em um efeito positivo na produção enzimática. Porém, em alguns casos, tal efeito pode ser considerado desprezível diante de outros efeitos mais significativos, como o tempo de fermentação ou a umidade.

A Tabela 4.3 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos resultados para PI e o resultado do Teste F, o qual representa a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} . Sempre que esta relação for maior que 1, a regressão é estatisticamente significativa, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4,0 (BARROS NETO *et al.* 1995).

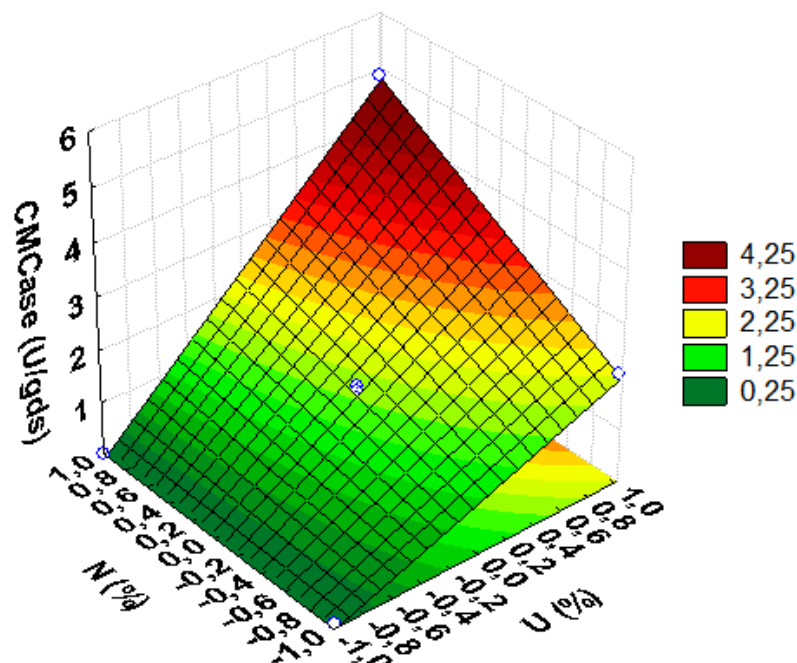
Tabela 4.3. Análise de variância ANOVA para os resultados do planejamento experimental da fermentação com a biomassa da palma integral (PI)

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}
Regressão	15,66	3	5,22	87,00
Resíduo	0,17	3	0,06	
Falta de ajuste	0,14	1		
Erro puro	0,03	2		
Total	15,83	6		
%R ²	98,9			
F _{tabelado} = 9,28			Teste F _{5%} = 9,37	

Como pode ser observado na Tabela 4.3, o modelo matemático obtido poderá ser usado para fins preditivos, pois o Teste F apresentou valor superior a 4,0.

A Figura 4.5 exibe a superfície de resposta que mostra a influência da umidade inicial e concentração de nitrogênio no meio fermentado sobre a atividade CMC_{Case}.

Figura 4.5. Produção de CMC_{Case} em função da adição de fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na fermentação da biomassa da palma integral (PI)



Verifica-se a grande influência que a umidade tem na produção de CMC_{Case} e que também a suplementação de nitrogênio contribui para o aumento da atividade da CMC_{Case} produzida por *Thichoderma reesei* LCB 048.

As condições operacionais do Ensaio 4 para a fermentação da palma integral (PI), com umidade inicial de 90% e concentração de sulfato de amônio em 1% são as mais adequadas para a condução do processo fermentativo utilizando a biomassa da palma integral (PI) como substrato.

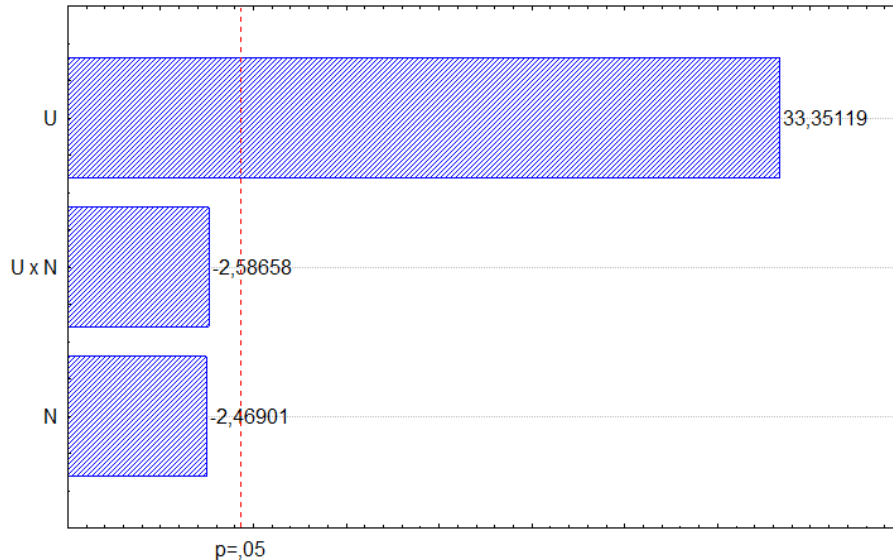
Para os ensaios realizados com a biomassa da palma lavada (PL), os resultados da Tabela 4.2 mostram que os ensaios conduzidos com o menor valor de umidade, 45%, (ensaios 1 e 3) também resultaram em valores mais baixos de atividade CMC_{ase}, embora sejam muito superiores aos valores obtidos nas mesmas condições para a PI.

O ensaio 2, com umidade inicial de 90% e nenhuma suplementação foi o que resultou no valor mais alto de atividade CMC_{ase} (4,296 U/gds), apresentando uma produtividade de 0,0895 U/gds.h. Este ensaio representa uma condição adequada para o processo da FSS usando PL. Porém, este valor é inferior ao resultado obtido no ensaio 4 para PI (4,870 u/gds com produtividade de 0,101 U/gds.h).

Em relação ao ponto central (Ensaio 5, 6 e 7), observa-se que os valores de atividade foram superiores aos ensaios 1 e 3, com umidade de 45%; mas inferiores aos valores dos ensaios 2 e 4, com umidade inicial de 90%, sugerindo um comportamento linear. A média dos três pontos foi de 1,6587 U/gds; com coeficiente de variação de 6,15%; indicando baixa dispersão, ou seja, boa reprodutibilidade das três repetições.

Para os ensaios conduzidos com a palma lavada (PL), o diagrama de Pareto (Figura 4.6) mostra que apenas a umidade foi estatisticamente significativa (para $p < 0,05$) o que significa que a influência deste parâmetro na atividade obtida é superior à influência da suplementação de nitrogênio e à combinação desses dois fatores, que inclusive tiveram influência negativa no processo.

Figura 4.6- Digrama de Pareto mostrando a influências das variáveis adição de fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na produção de CMCase na fermentação semi-sólida da biomassa da palma lavada (PL)



O modelo de regressão de primeira ordem proposto para a operação com palma lavada (PL) está na Equação 4.2. Os parâmetros em negrito são aqueles estatisticamente significativos com 95% de confiança. Os coeficientes negativos na equação do modelo indicam que nos níveis mais baixos destas variáveis é onde se obtêm os maiores valores da resposta analisada.

$$CMCase = \mathbf{2,0457} + \mathbf{1,702U} - 0,126N - 0,132UN \quad (4.2)$$

O ajuste do modelo exibido na Equação 4.2 foi de 0,94; indicando que o modelo linear é adequado para a representação deste processo. Como a influência da suplementação com nitrogênio e sua interação com o valor de umidade não são estatisticamente significativos, o modelo pode ser simplificado para (Equação 4.3):

$$CMCase = 2,045 + 1,702U \quad (4.3)$$

A análise de variância (ANOVA) para os ensaios com PL encontra-se na Tabela 4.4.

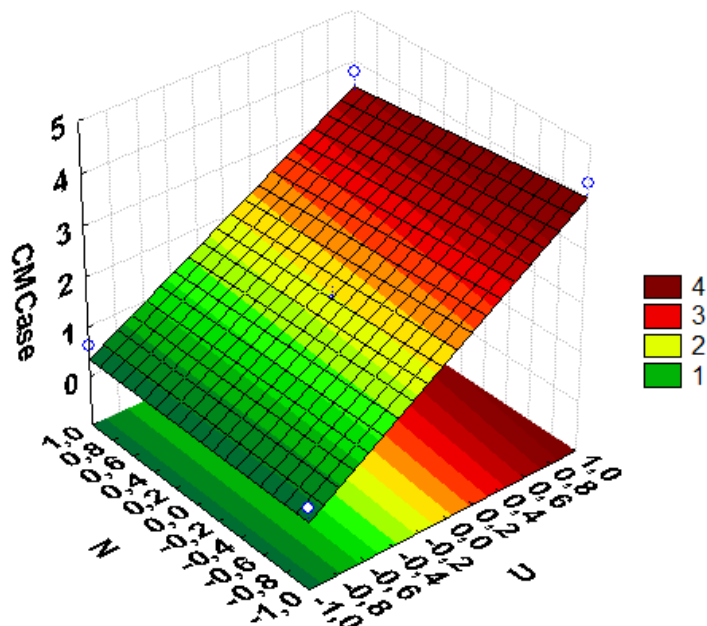
Tabela 4.4- Análise de variância ANOVA para os resultados do planejamento experimental da fermentação com a biomassa da palma lavada (PL)

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}
Regressão	12,37	1	12,37	309,25
Resíduo	0,15	5	0,04	
Falta de ajuste	0,79	1		
Erro puro	0,02	2		
Total	15,53	6		
%R ²	93,56			
F _{tabelado} = 6,61			Teste F _{5%} =	46,79

O Teste F na Tabela 4.4 teve um valor superior a 4,0. Portanto o modelo matemático obtido pode ser usado para fins preditivos.

Na Figura 4.7 é exibida a superfície de resposta que mostra a influência dos parâmetros umidade e fonte de nitrogênio na obtenção de CMCase.

Figura 4.7. Produção de CMCase em função da adição de fonte de nitrogênio (N) e umidade (U) na fermentação semissólida da biomassa da palma lavada (PL)



A superfície da Figura 4.7 mostra a grande influência que a umidade tem na produção de CMCase. Porém, neste caso, a suplementação com fonte de nitrogênio reduziu a produção de atividade CMCase pelo *Thichoderma reesei* LCB 048.

Portanto, as condições operacionais do Ensaio 2 para a fermentação da palma lavada (PL), com umidade inicial de 90% e nenhuma suplementação é a melhor condição operacional para o processo fermentativo usando a palma lavada.

Comparando-se os dois processos, percebe-se que a lavagem da palma apenas diminui o tempo em que o complexo celulolítico começa a ser produzido, não influenciando muito na obtenção das celulases. Além disso, devido às características hidrofílicas e viscosas que as partículas da palma apresentam quando é triturada, o processo de lavagem torna-se difícil e consome muita água (cerca de 200 litros de água corrente para cada quilo de palma cortada e triturada), o que faz esse processo inviável, principalmente em regiões semiáridas. Além disso, o maior valor de atividade foi obtido para a palma sem lavar (PI). Portanto, o pré-tratamento da biomassa da palma baseado na sua lavagem em água corrente deve ser descartado.

Uma observação importante a ser feita é que a palma *in natura* possui cerca de 90% em umidade. Isso significa que a condução de um processo que utilize a palma *in loco* não necessita de água para hidratação do substrato, apenas esterilização com vapor úmido, não havendo necessidade de suplementação.

Embora esse teor de umidade se distancie um pouco do conceito de fermentação semissólida, o meio de cultura não fica tão líquido como em uma fermentação submersa, pois a biomassa da palma absorve muita água, tanto que após a esterilização (autoclave a 121 °C por 15 minutos) o meio torna-se bastante pastoso. Foi observado que o desenvolvimento dos fungos dá-se principalmente na superfície do substrato.

4.3 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

A Tabela 4.5 mostra os resultados do ensaio de lixiviação realizado a partir de uma fermentação conduzida nas melhores condições de umidade, concentração de fonte de nitrogênio e tempo que proporcionou a maior atividade das enzimas CMCase para PI e PL.

Tabela 4.5 - Resultados obtidos na variação dos parâmetros agitação (Ag), tempo de contato (tc) e relação solvente/substrato (Re) na extração da CMCCase produzida

Ensaio	Ag (rpm)	tc (min)	Re (mL/g)	CMCase (U/gds)	*Concentração de CMCCase (U/mL)
1	-1(50)	-1 (15)	-1 (2)	2,623 ± 0,045	0,013
2	+1(150)	-1 (15)	-1 (2)	2,678 ± 0,067	0,013
3	-1 (50)	+1 (45)	-1 (2)	2,695 ± 0,025	0,013
4	+1 (150)	+1(45)	-1 (2)	2,519 ± 0,056	0,013
5	-1 (50)	-1 (15)	+1 (5)	6,036 ± 0,071	0,012
6	+1 (150)	-1 (15)	+1(5)	5,974 ± 0,143	0,012
7	-1 (50)	+1(45)	+1(5)	5,816 ± 0,116	0,012
8	+1 (150)	+1 (45)	+1(5)	5,473 ± 0,169	0,011
9	0 (100)	0 (30)	0 (3,5)	4,060 ± 0,217	0,012
10	0 (100)	0 (30)	0 (3,5)	4,039 ± 0,121	0,012
11	0 (100)	0 (30)	0 (3,5)	4,153 ± 0,090	0,012

*Obs:Os desvios dos valores de concentração foram todos inferiores a $\pm 0,001$ U/mL.

Os valores de CMCCase para os ensaios de 1 a 4; de 5 a 8 e de 9 a 11 foram muito próximos. Estes ensaios tinham em comum o mesmo valor do parâmetro relação solvente/substrato (RE).

O menor valor de atividade recuperada (2,519 U/gds) foi para o quarto ensaio, que teve tempo e agitação máximos e relação RE mínima. O maior valor observado, de 6,036 U/gds foi para o ensaio 5, que teve tempo e agitação mínimos, mas relação máxima. Valores intermediários a esse foram observados nos pontos centrais.

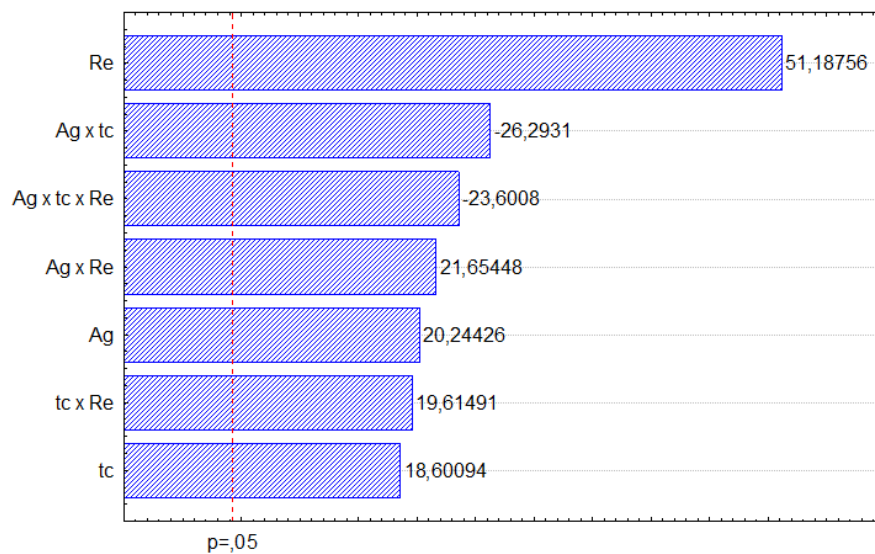
Além disso, foi verificado que a utilização de menores volumes de solvente não contribui significativamente para a obtenção de extratos mais concentrados em atividade enzimática, uma vez que a concentração enzimática variou muito pouco em função da variação do volume de tampão adicionado (os valores de atividade nos extratos variaram entre 0,011U/mL e 0,013U/mL), revelando que não se obtém extratos brutos mais concentrados ao se trabalhar com pequenos volumes de tampão.

Aparentemente, o principal obstáculo à recuperação das celulasas é sua baixa solubilidade. Os valores de concentração nos extratos foram próximos porque o tampão, provavelmente ficou saturado de enzimas em todos os ensaios, o que justifica

uma maior recuperação de atividade do meio fermentado com o aumento do volume de tampão.

O gráfico de pareto, exibido na Figura 4.8, mostra que a relação solvente/substrato é o parâmetro que mais influencia neste processo, embora os demais parâmetros e suas interações também sejam estatisticamente significativos no nível de confiança de 95%.

Figura 4.8 Influência dos parâmetros testados na extração de CMC_{Case}



O gráfico de Pareto mostra ainda que a contribuição da agitação e sua interação com o tempo de contato tem influência negativa no processo. Para os mais altos valores de tempo de contato e agitação houve uma redução na atividade enzimática, causada possivelmente pela agitação do meio, o que pode ter danificado a estrutura das enzimas, diminuindo sua atividade.

O modelo de regressão linear proposto é mostrado na Equação 4.4, no qual: A=Agitação, B= tempo de contato e C=relação solvente/substrato

$$CMCase = 3,8241 + 0,434A + 0,399B + 1,0980C + 0,564AB + 0,464AC + 0,421BC - 0,506ABC \quad (4.4)$$

A tabela 4.6 mostra a análise de análise de variância para os resultados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial para o estudo da extração.

Tabela 4.6 - Análise de variância ANOVA para os ensaios de extração

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}
Regressão	20,16	7	2,88	33,23
Resíduo	0,26	3	0,09	
Falta de ajuste	0,28	1		
Erro puro	0,007	2		
Total	20,45	10		
%R²	98,60			
F_{tabelado} = 8,89			Teste F_{5%} = 3,73	

Como o valor do Teste F foi inferior a 4,0 o modelo é significativo, mas não é preditivo para representar a operação de lixiviação com valores de parâmetros fora da faixa estudada.

Os valores testados para a relação solvente/substrato foram pequenos porque se pretendia obter extratos mais concentrados. Porém, foi demonstrado que a recuperação de atividade do meio sólido fermentado é proporcional à razão solvente/soluto empregada. Ou seja, é possível uma recuperação maior de atividade com o aumento do volume de tampão. Há trabalhos na literatura em que foram usadas relações de até 20 mL/g para a recuperação de celulases (AMORIM, 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho são similares aos encontrados por Pirota *et al.* (2013) que estudaram a lixiviação de endoglucanases produzidas por *Aspergillus niger* na fermentação semissólida do farelo de trigo. Usando um planejamento experimental, os autores verificaram a influência da temperatura, da razão solvente/substrato e da agitação na recuperação da atividade celulolítica produzida no meio fermentado. O estudo mostrou que apenas a relação solvente/substrato era estatisticamente significativa e que as condições mais favoráveis para a extração de endoglucanases era a utilização de tampão acetato de sódio 0,2 mol / L, pH 4,8 como solvente, tempo de contato de 10 minutos e uma relação solvente/substrato de 9:1 (9mL/g).

Como o maior valor de relação solvente/substrato testado neste trabalho foi de 5:1, houve a necessidade de verificar se era possível aumentar a atividade recuperada do meio de fermentação pelo aumento da relação solvente substrato. Portanto, um novo teste foi realizado, variando-se apenas a razão (RE) nos valores de 7,5:1; 10:1;

15:1 e 20:1. O tempo de contato foi fixado em 15 minutos, com agitação de 50rpm a temperatura de 28°C. Os resultados deste teste estão na Tabela 4.7.

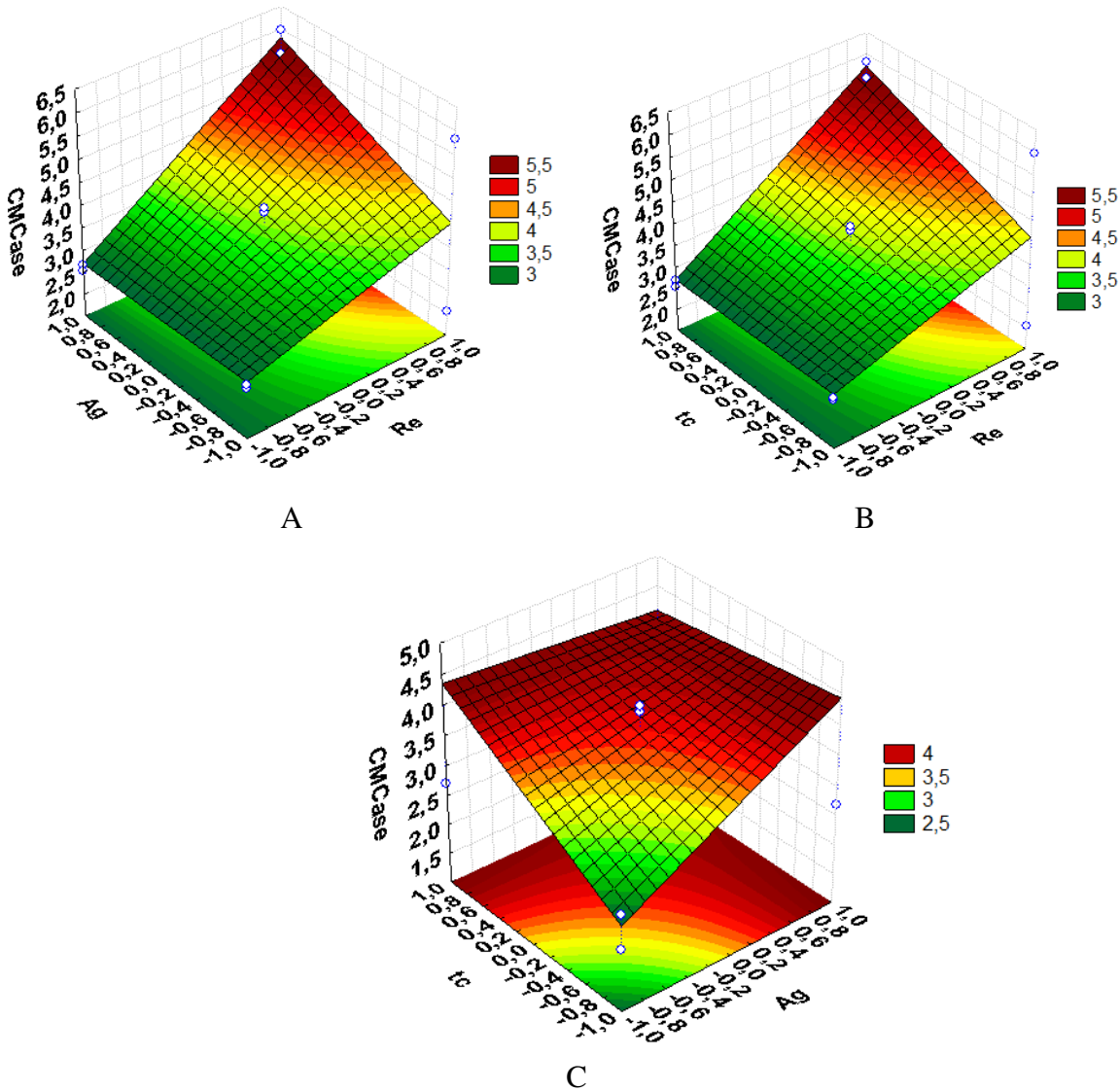
Tabela 4.7- Resultados das atividades CMCase obtidas para as relações solvente/substrato testadas

Ensaio	Relação (mL/g)	CMCase (U/gds)
1	7,5	7,501 ± 0,124
2	10	9,214 ± 0,625
3	15	12,632 ± 0,190
4	20	15,145 ± 0,292

Como pode ser observado na Tabela 4.7; a utilização de uma relação solvente/substrato adequada favorece uma maior recuperação da atividade produzida. Portanto, pode-se afirmar que o fungo *Trichoderma reesei* LCB 048 chegou a produzir atividades de até 15,145 U/gds em 110 horas de fermentação semissólida de palma forrageira suplementada com 1% de fonte de nitrogênio e umidade de 90%. A produtividade nesse caso foi de 0,137 (U/gds.h). Em relação ao ensaio 5 da Tabela 4.7 no qual foi utilizado uma razão solvente/substrato de 5:1 (mL/g), o ensaio no qual se utilizou 20:1 (mL/g) apresentou um aumento na recuperação da atividade produzida no meio semissólido de cerca de 150%.

As superfícies de resposta da Figura 4.9 ilustram a ação dos parâmetros da lixiviação sobre a atividade recuperada do meio fermentado. Mais uma vez fica evidente a influência do parâmetro Relação solvente/substrato (RE) na atividade recuperada.

Figura 4.9. Atividade CMC_{case} em função da agitação e relação (A); Tempo de contato e relação (B); e tempo de contato e agitação (C)



As Figuras 4.9A e 4.9B mostram a grande influência que tem a variável relação solvente/substrato no processo de lixiviação, pois para os valores mais altos deste parâmetro é que se observam as maiores atividades em CMC_{case}. A Figura C mostra que o tempo de contato (t_c) e a agitação (A_g) têm influência positiva no processo. É possível que a influência da relação solvente/substrato (R_e) seja tão elevada que mascare as influências do tempo de contato e agitação.

Segundo Fernández e colaboradores (2012), a relação entre a quantidade de sólido a tratar e o volume de solvente é de grande importância. A intensidade e o caráter do processo de extração sólido-líquido dependem em grande parte da difusividade do soluto na fração do solvente selecionado, assim como da concentração

de saturação do soluto no solvente, pois está diretamente relacionado com a força motriz do processo. Por outro lado, é necessário levar em consideração que um grande volume de solvente na extração dos solutos aumenta consideravelmente os custos de purificação e recuperação do produto de interesse.

4.3.1 - Recuperação de enzimas por precipitação

Foram testadas duas técnicas de precipitação utilizadas para recuperação de proteínas: A precipitação com etanol e a precipitação com adição de sulfato de amônio.

4.3.1.1 - Precipitação com etanol

Os resultados do ensaio de precipitação do complexo enzimático com etanol estão na Tabela 4.8

Tabela 4.8- Atividade recuperada por precipitação com etanol

Ensaio	Concentração de etanol	CMCase (U/gds)	Recuperação
Extrato bruto	0	3,64 ± 0,11	-
1	50%	0,81 ± 0,02	22,25 %
2	67%	0,47 ± 0,05	12,91 %
3	75%	0,51 ± 0,05	14,01 %

Para os ensaios de precipitação foram utilizados extratos fermentados brutos com atividade em CMCase de 3,64 U/gds. Na Tabela 4.8, a coluna recuperação refere-se ao percentual dessa atividade original que foi precipitada pela adição de etanol.

Observa-se que a precipitação com etanol não foi eficiente, pois foi recuperada por precipitação no máximo 22,25% da atividade contida no extrato bruto. A melhor recuperação foi para a adição de etanol na razão de 1:1.

Nos ensaios 2 e 3 foi precipitada uma quantidade visivelmente maior de proteínas, porém o precipitado apresentava aspecto gelatinoso, uma evidência de desnaturação protéica.

Mawadza *et al.* (2000) usaram acetona a 55% na precipitação de celulasas produzidas por *Bacillus strains*. A recuperação das enzimas foi realizada por

cromatografia, entretanto só foram recuperados 12% da atividade inicial do extrato bruto.

4.3.1.2 - Precipitação com Sulfato de amônio

Dentre as frações de concentração testadas, 20, 40, 60 e 80 % (p/v), a de 20 % não apresentou turvação. As frações de 40, 60 e 80% apresentaram turvação crescente, sendo a de 80% a que apresentou maior turvação, portanto maior efeito salting out. Porém, o precipitado formado era visivelmente pulverulento e não apresentou tendência de sedimentação. Além disso, o extrato apresentava-se um pouco viscoso. Nas condições de centrifugação testadas não houve a formação do pelet, nem a detecção de atividade enzimática. Leite *et al* (2003) atestam que tal técnica não é eficiente quando se tem extratos muito diluídos.

Leite e colaboradores (2007) utilizaram uma saturação de 80% de sulfato de amônio para precipitar β -glicosidases de *Aureobasidium pullulans* e *Thermoascus aurantiacus*, centrifugando a mistura a 10.000 rpm por 20 minutos, obtendo rendimento de 91,5%.

Entretanto, Santos (2011), estudando a precipitação de celulasas produzidas por uma linhagem mutante de *Aspergillus niger*, em farelo de trigo, nas mesmas condições que este trabalho obteve recuperações de 18,3% para FPase; 88,4 para CMCase; 64,4 % para β -glicosidase e 108,6% para protease. Ainda de acordo com o autor, a presença de proteases no complexo enzimático não é desejável, já que as proteases podem promover a desnaturação de enzimas.

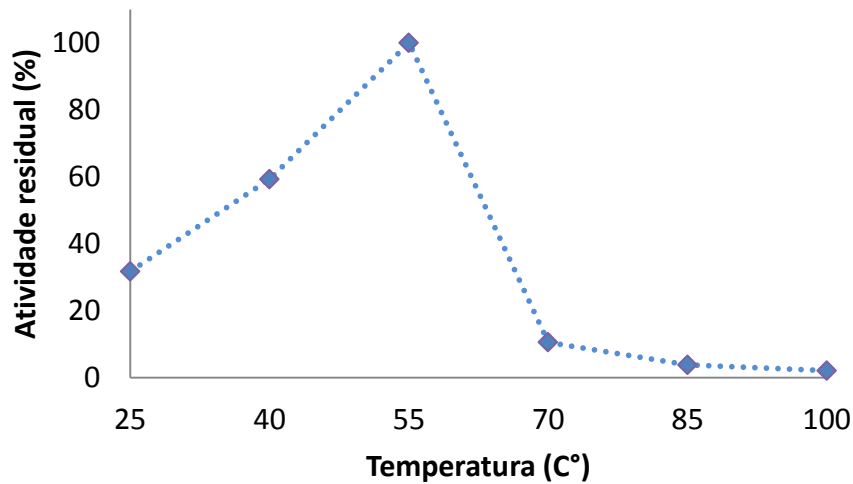
De qualquer forma, a etapa de precipitação, seja com sal ou com solvente, embora tenha ampla utilização em ensaios de bancada, não parece uma alternativa adequada para uma planta, como uma biorrefinaria implantada no semiárido, pois, além de não serem eficientes para tal substrato, tais técnicas utilizariam grandes quantidades de sal ou etanol, aumentando os custos do processo e o volume de rejeitos.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

4.4.1 Temperatura ótima da atividade CMCCase

O efeito da temperatura na atividade CMCCase é mostrado na Figura 4.10.

Figura 4.10. Efeito da temperatura na atividade enzimática

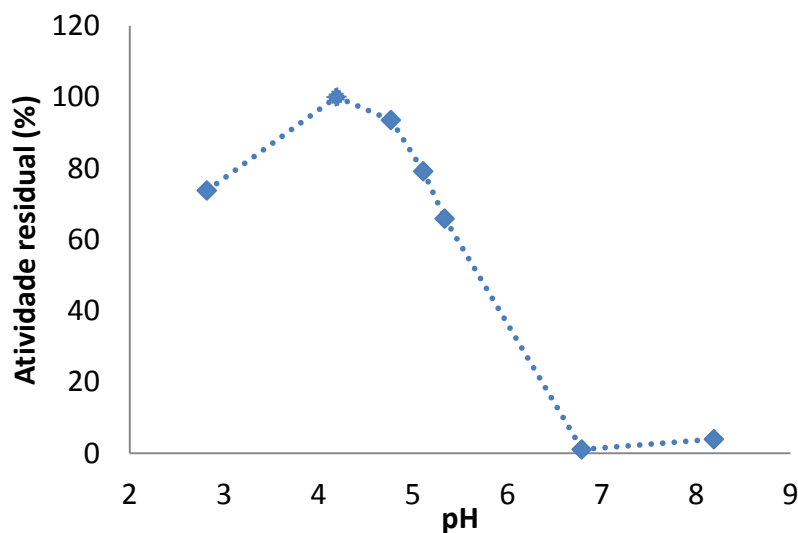


Como mostra o gráfico da Figura 4.10, o extrato apresentou atividade CMCase máxima na temperatura de 55°C. Este resultado concorda com os de Akcapinar, Gul e Sezerman (2012), que ao estudarem o efeito da temperatura de endoglucanases produzidas por *Trichoderma Reesei* e *Pichia pastoris*, determinaram que a atividade máxima (CMCase) era obtida em temperaturas entre 45 e 55 °C.

4.4.2 pH ótimo

Os valores de atividade CMCase testados nos pHs entre 2,5 e 8,5 são exibidos na Figura 4.11.

Figura 4.11. Efeito do pH na atividade enzimática



A atividade enzimática de complexos enzimáticos excretados por fungos têm atuação na faixa de pH ácida. Os maiores valores de atividade foram obtidos para pHs entre 4,0 e 5,0. A partir do pH 5,0; a atividade enzimática decaiu acentuadamente, não sendo mais detectada em pH 7,0.

Este resultado é similar aos encontrados por Akcapinar, Gul e Sezerman (2012) determinaram que o pH ótimo para endoglucanases produzidas por *Trichoderma Reesei* e *Pichia pastoris* era 5,0.

Os valores de pH e temperatura ótimos encontrados neste trabalho concordam também com os obtidos por Medina, Núñez e Ordeñez (2010), que encontraram como valores ótimos a temperatura de 50°C e o pH de 5,3 para o complexo celulolítico produzido pelos fungos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Lentinula edodes*, na fermentação semissólida da biomassa da bananeira.

Portanto, no que diz respeito ao comportamento quanto ao pH e temperatura, a enzima produzida por *Trichoderma reesei* LCB 48 é similar ao apresentado pelo complexo enzimático de outros fungos, até mesmo quando induzidos por outras matérias-primas.

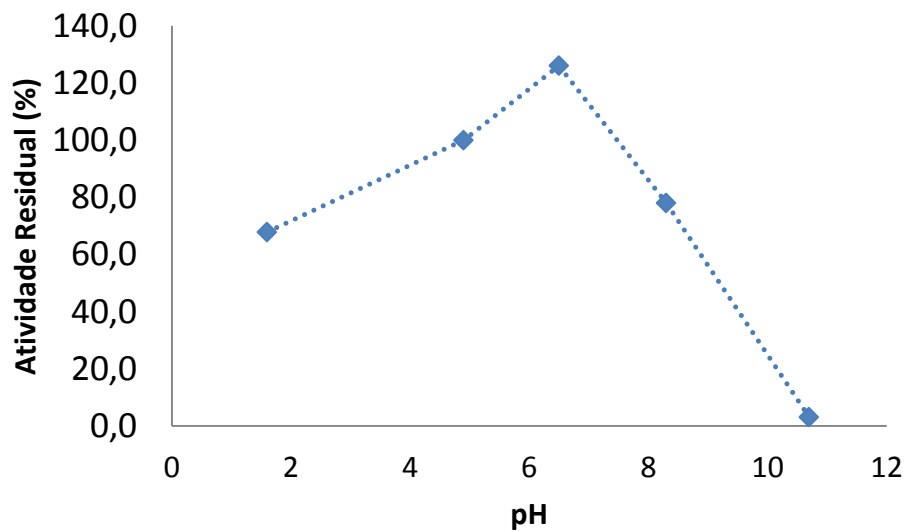
Os métodos presentes no protocolo da IUPAC, preparado por Ghose (1987), para medição da atividade celulolítica de extratos enzimáticos produzidos por fungos são conduzidos em pH 4,8 e temperatura de 50°C, por serem estes valores ótimos de pH e temperatura normalmente apresentados por celulases fúngicas.

4.4.3 Estabilidade enzimática frente ao pH

Mudanças no pH de um determinado meio podem alterar a estrutura das enzimas presentes por meio de interações de natureza elétrica. Mudanças brandas no valor do pH podem promover a dissociação da enzima, que tanto podem levá-la a formas mais ativas quanto promoverem sua desativação (Nelson e Cox, 2011).

O gráfico da Figura 4.12 representa a atividade residual do extrato, em CMC_{case}, após inoculação por 24 horas em diferentes valores de pH.

Figura 4.12. Atividade residual do extrato após inoculação em diferentes valores de pH.



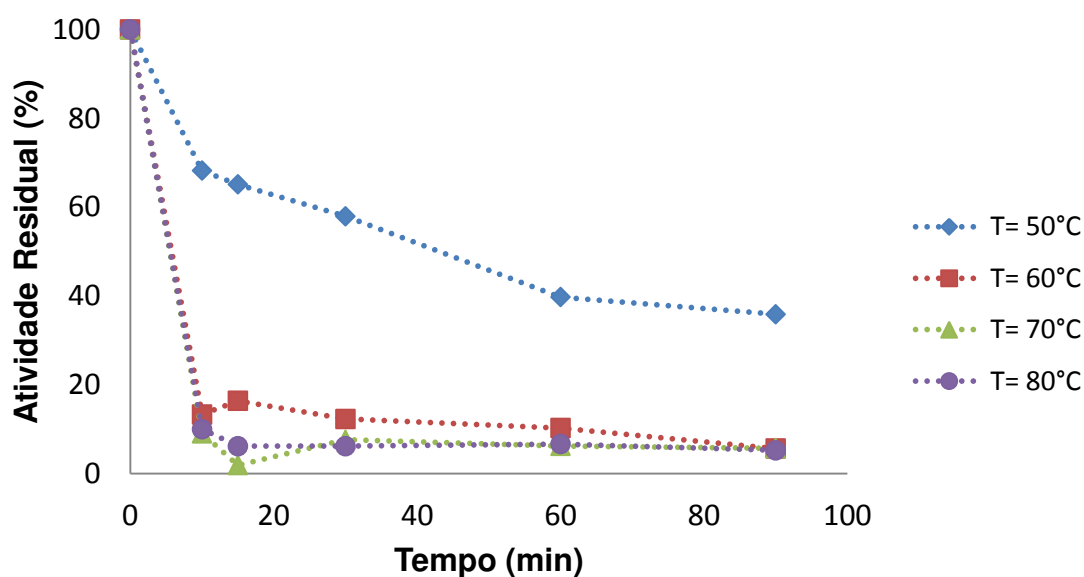
A atividade residual foi calculada em relação à atividade do extrato no pH padrão de leitura da atividade CMCCase (pH 4,8), ao qual foi atribuído o valor de 100% (0,210U/mL). Conforme pode ser observado na Figura 4.13, a incubação do extrato bruto em valores de pH superiores a 4,8 promoveram um aumento da atividade CMCCase, atingindo o valor máximo de 26% quando a enzima foi incubada no pH de 6,5 (0,265 U/mL). Porém, em valores de pH acima de 6,5 a atividade enzimática sofre uma redução muito brusca, sofrendo desativação irreversível em valores de pH acima de 7,0. No pH de 10,7 a atividade residual era de apenas 3% (0,006 U/mL). Tal comportamento indica que a enzima possui baixa estabilidade frente ao pH.

Os valores encontrados são similares aos apresentados na literatura para celulasas fúngicas. Gao *et al.* (2008) verificaram que as celulasas CMCCase e β -glicosidase produzidas por *Aspergillus terreus* M11 em substrato de palha de milho exibem considerável estabilidade na faixa de pH de 2 a 5.

4.4.4 Estabilidade enzimática da CMCCase frente à temperatura

A estabilidade da CMCCase frente à temperatura é mostrada na Figura 4.13, na forma de atividade residual

Figura 4.13. Atividade residual do extrato após inoculação a diferentes valores de temperatura



A enzima CMCase produzida mostrou-se sensível à temperatura, desativando-se irreversivelmente durante o período de incubação. Além disso, houve diminuição da atividade com o tempo de incubação em todas as temperaturas estudadas. A redução de atividade foi mais rápida nas temperaturas mais elevadas. Na temperatura de 50°C, a enzima ainda apresentava mais de 40% de sua atividade inicial em 90 minutos de incubação. Nas temperaturas superiores a 60°C, a enzima já tinha perdido mais de 80% de sua atividade nos dez primeiros minutos de ensaio, o que demonstra que a estabilidade da enzima frente à temperatura é baixa, não sendo adequada sua utilização em processos acima de 50°C.

Akcapinar, Gul e Sezerman (2012), ao estudarem a termoestabilidade de endoglucanases produzidas por uma cepa mutante de *Trichoderma reesei*, verificaram que as enzimas produzidas por este microrganismo era estável por até 72 horas na temperatura de 50 °C, mantendo ainda 53% de sua atividade inicial após este período. Porém, o microrganismo utilizado por esses autores foi modificado geneticamente para produzir celulases mais estáveis.

4.5 APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO OBTIDO NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA DA PALMA.

O extrato enzimático utilizado nos ensaios de hidrólise apresentou os valores de atividade exibidos na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Valores de Atividade celulolítica e AR do extrato empregado na hidrólise

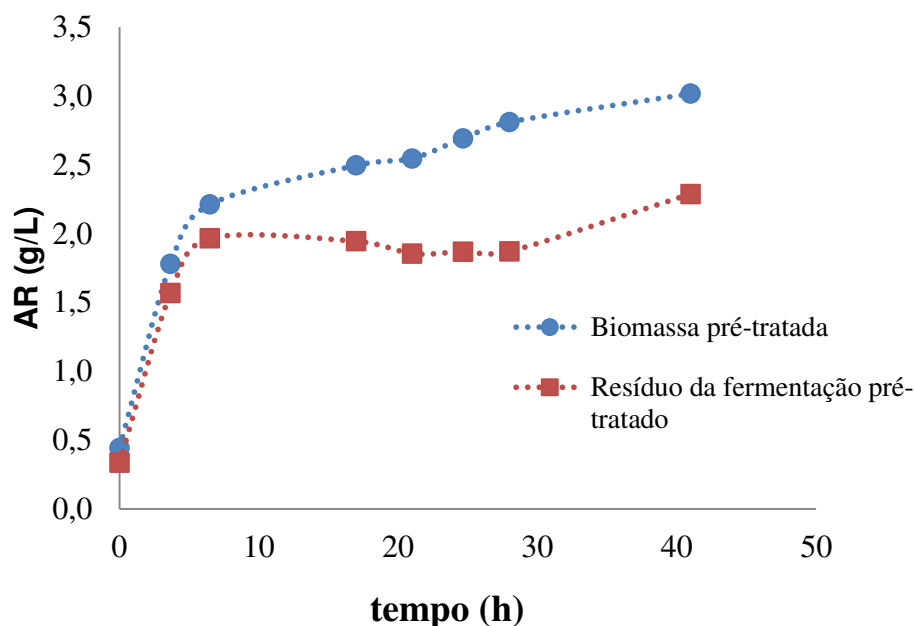
Parâmetro	Valor
Açúcares redutores (mg/mL)	0,318 ± 0,013
Atividade CMCase (U/mL)	0,181 ± 0,006
Atividade FPase (U/mL)	0,101 ± 0,005
Atividade Celobiase (U/mL)	0,028 ± 0,007

Os dados da Tabela 4.9 revelam a presença de açúcares redutores no extrato bruto, os quais podem atuar como inibidores da atividade celulolítica.

Quanto a atividade enzimática, o extrato bruto apresentava maior atividade de CMCase e menor atividade de celobiase, sendo o valor de atividade FPase praticamente intermediário. De acordo com Ogeda e Petri (2010), o *Trichoderma reesei* produz um extrato enzimático que pode conter no máximo 4% de enzimas que atuam sobre a celobiose, as β -glucosidases, por isso chamadas de celobiasas, Ainda segundo esses autores, parte das celulasas excretadas por esse fungo atuam sobre carboximetilcelulose (cerca de 45%). Isso explica porque a atividade em CMCase no extrato foi superior a de celobiase. A FPase depende da ação sinérgica das demais enzimas do complexo, por isso apresentou atividade intermediária.

Como foram empregados 50 mL do extrato para cada balão contendo 1g de biomassa ou de resíduo da fermentação, havia na mistura reacional um total de 9,05U de CMCase; 5,05 U de FPase e apenas 1,4 U de celobiase. A Figura 4.14 mostra um aumento na concentração de açúcares redutores (glicose) durante o período de 52 horas de processo, o que significa que as enzimas presentes no extrato foram capazes de catalisar a clivagem da celulose da biomassa da palma e do resíduo da fermentação da palma em açúcares redutores. Os resultados da hidrólise são mostrados na Figura 4.14.

Figura 4.14- Ensaio de hidrólise da biomassa da palma e do resíduo da fermentação semissólida pelas enzimas obtidas na fermentação



Observa-se que, para um tempo de 48 horas houve em geral um aumento na concentração de AR. Para a biomassa pré-tratada, observou-se um aumento de 0,442 g/L para 3,016 g/L, o que corresponde a um aumento de 6,8 vezes. Já para o resíduo da fermentação, a variação do teor de AR no mesmo período foi de 0,335 g/L para 2,287 g/L, o que corresponde também a um aumento de cerca de 6,8 vezes. Nesse período, a produção de AR foi de 2,57 g/L para a biomassa pré-tratada e 1,95 g/L para o resíduo da fermentação pré-tratado.

Observa-se que, já nas primeiras horas do processo, há a conversão de celulose em glicose ($AR_{Biomassa}$ e $AR_{Resíduo}$, para a hidrólise da biomassa e do resíduo da fermentação respectivamente), sendo que por volta de 6,5 horas do início do processo, a taxa de conversão diminui. A produtividade máxima ocorre nas primeiras horas do processo. Os valores de produtividade ($P_{Biomassa}$ e $P_{Resíduo}$) são exibidos na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Produtividade de AR durante o processo de hidrólise da biomassa da palma e do resíduo da fermentação semissólida

Tempo (h)	AR _{Biomassa} (mg)	AR _{Resíduo} (mg)	P _{Biomassa} (mg/L.h)	P _{Resíduo} RF (mg/L.h)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0	0
4	66,87 ± 0,01	61,65 ± 0,00	334,4	308,2
7	88,42 ± 0,00	81,48 ± 0,00	252,6	232,8
17	102,60 ± 0,04	80,41 ± 0,00	120,7	94,6
21	105,10 ± 0,01	75,90 ± 0,08	100,2	72,2
25	112,41 ± 0,01	76,61 ± 0,00	90,0	61,2
28	118,36 ± 0,01	76,76 ± 0,01	84,6	54,8
41	128,66 ± 0,01	97,60 ± 0,01	62,8	47,6

Ogeda e Petri (2010) apontam que a redução na produtividade de glicose pode ser causada por inibição pelos produtos da hidrólise, como glicose e celobiose. Portanto, esta etapa pode ainda ser otimizada, seja com o aumento da concentração do extrato ou com o melhoramento do pré-tratamento da biomassa da palma. Destaca-se ainda que este ensaio demonstrou ser o resíduo da fermentação semissólida da palma forrageira uma fonte de celulose que pode ser hidrolisada. Portanto a biomassa utilizada na fermentação pode ser reaproveitada no processo de hidrólise subsequente.

Embora os valores de conversão obtidos sejam baixos, deve-se levar em consideração o fato do extrato bruto não ter passado por nenhum processo de concentração e apresentar valores baixos de atividade por encontrar-se diluído. Sukumaran *et al.* (2009), por exemplo, obtiveram extratos contendo os produtos da hidrólise de bagaço de cana; palha de arroz e biomassa de aguapé. A concentração de AR ao final de 48h de hidrólise foi de 14,20 g/L; 26,30 g/L e 17,79 g/L. Porém, o extrato enzimático de *Trichoderma Reesei* RUT 30 produzido na fermentação semissólida do farelo de trigo, que apresentava valores iniciais de atividade FPase e CMCase de 1,4U/mL e 14,98 U/mL respectivamente, teve seus valores de atividade aumentados para 13,65 e 45,22 U/mL respectivamente, mediante precipitação com acetona gelada na razão de 4:1 (4 partes de acetona para cada parte de extrato).

Ogeda e Petri (2010) ressaltam que a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos geram glicose e celobiose, que por serem inibidores das celulasas

acabam diminuindo o rendimento da operação. Este problema pode ser contornado com adição de mais celulasas, ou o uso de extratos mais concentrados, o que eleva os custos. Uma solução apontada por estes autores seria o processo conhecido como sacarificação simultânea e fermentação (SSF), no qual o microrganismo fermentador é adicionado no mesmo vaso em que ocorre a hidrólise, convertendo imediatamente a glicose e celobiose geradas em etanol, evitando perda de atividade. Além disso, o etanol produzido impede o desenvolvimento de microrganismos oportunistas, que degradariam os açúcares produzidos.

Lever, Ho e Cord-Ruwish (2010) concordam que a sacarificação e fermentação simultânea é o melhor caminho. Os autores defendem ainda que o processo seja realizado no mesmo local em que a matéria lignocelulósica é gerada, de preferência sem tratamento algum do extrato fermentado bruto, como foi feito nesta pesquisa, de forma a reduzir os custos.

4.6 PARTIÇÃO DE CELULASES POR MEIO DE SABS

O extrato bruto utilizado nos ensaios de partição não passou por nenhum tratamento além da centrifugação, tendo sido obtido diretamente da etapa de lixiviação, nas melhores condições do processo. As características do extrato enzimático bruto utilizado nos ensaios estão exibidas na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Características do extrato usado nos ensaios de partição

Parâmetro	Valor
pH	4,8 ± 0,01
Densidade (g/ml)	1,00 ± 0,05
Teor de proteínas solúveis (µg/ml)	32,3 ± 2,9
Açúcares redutores (mg/mL)	0,248 ± 0,000
Atividade CMCase (U/mL)	0,104 ± 0,008
Atividade FPase (U/mL)	0,055 ± 0,005
Atividade Celobiase (U/mL)	0,033 ± 0,001

A Tabela 4.11 mostra que o extrato bruto apresentava reduzido teor de proteínas solúveis.

Após a formação dos SABs, constatou-se que a fase superior era rica em PEG e a fase inferior era rica em citrato de sódio.

4.6.1 – Atividade de CMCase

Os valores dos parâmetros: coeficiente de partição de proteínas (K_p), coeficiente de partição de CMCase (K_{CMC}); fator de purificação na fase inferior (FP_b), fator de purificação na fase superior (FP_t), recuperação da enzima na fase inferior dos SABs (Y_b) e recuperação da enzima na fase superior dos SABs (Y_t) estão exibidos na Tabela 4.12, além dos valores de Massa molar de PEG (MM), composição de PEG (P), composição de citrato (C) e pH utilizados nos ensaios.

Tabela 4.12. Parâmetros de partição para a enzima CMCase

E	MM	P (%)	C (%)	pH	K_p	K_{CMC}	FP_b	FP_t	Y_b (%)	Y_t (%)
1	4000	18	12	5	0,07	0,72	0,53	5,31	36,22	63,78
2	8000	18	12	5	0,16	0,55	0,79	2,71	50,09	49,91
3	4000	22	12	5	0,14	0,84	0,56	3,38	33,61	66,39
4	8000	22	12	5	0,11	0,64	0,67	3,87	42,31	57,69
5	4000	18	16	5	0,22	0,85	0,75	2,90	47,94	51,74
6	8000	18	16	5	0,67	0,62	1,28	1,19	57,92	42,08
7	4000	22	16	5	2,48	1,37	1,89	1,05	30,59	69,41
8	8000	22	16	5	1,26	0,99	1,57	1,22	41,92	58,08
9	4000	18	12	7	0,81	1,21	0,77	1,15	38,78	61,22
10	8000	18	12	7	0,55	0,79	0,85	1,24	52,35	38,51
11	4000	22	12	7	0,60	2,08	0,44	1,53	23,82	76,18
12	8000	22	12	7	0,55	1,57	0,58	1,60	29,10	70,10
13	4000	18	16	7	2,42	5,16	0,45	0,92	16,00	83,43
14	8000	18	16	7	3,33	2,40	1,07	0,77	31,78	68,22
15	4000	22	16	7	1,74	18,20	0,10	1,09	4,26	95,74
16	8000	22	16	7	2,41	4,25	0,45	0,74	17,43	81,72
17	6000	20	14	6	1,28	2,03	0,60	0,95	28,73	71,27
18	6000	20	14	6	1,17	2,34	0,58	1,16	25,59	74,41
19	6000	20	14	6	1,13	2,77	0,49	1,20	22,42	77,58
20	6000	20	14	6	1,03	3,14	0,39	1,18	20,35	79,65

O valores do coeficiente de partição de proteínas, K_p , mostrados na Tabela 4.12 revelou que as proteínas particionaram-se preferencialmente para a fase inferior, rica em citrato, nos ensaios conduzidos a pH 5,0. O valor mais expressivo foi observado para o ensaio 1, que apresentava os menores valores dos níveis testados no

planejamento. Neste mesmo ensaio foi observado o maior valor do fator de purificação da CMCase (FP_{CMC}), o qual foi de 5,31 vezes.

As enzimas CMCases particionaram-se preferencialmente para a fase superior, rica em PEG, em quase todos os ensaios. Aparentemente, o aumento do pH contribuiu para uma maior partição das enzimas na fase superior dos SABs. O ensaio 15 foi o que apresentou o maior valor de partição de CMCase ($K_{CMC} = 18,20$).

Alvarez, Mendoza e Hernández (2009), também verificaram a preferência das CMCases pela fase rica em Peg ao estudarem a partição de celulases produzidas por *Aspergillus niger* em SABs formados por PEG 1500 e tampão fosfato de sódio. Nesse sistema, os autores observaram uma recuperação de 90% da atividade enzimática na fase superior dos SABs. Herculano *et al.* (2012) estudaram a partição de celulases produzidas por *Aspergillus japonicus* URM5620 em SABs formados por PEG e citrato de sódio. Os autores observaram um coeficiente de partição máximo de 3,03 para o sistema formado por 20% de PEG1000 e 20% de citrato de sódio em pH 6,0.

O ensaio 15 apresentava os valores mais elevados de concentração de pH e concentração de citrato (%Citrato). Observando-se os resultados de K_{CMC} na Tabela 4.16, percebe-se que o pH e a composição de citrato de sódio (C) tiveram grande influência no processo, pois foi nos níveis mais elevados destas variáveis que foram observados os mais altos valores de partição e conseqüentemente o mais alto valor de recuperação na fase superior (Y_t) que foi de 95,74%.

De acordo com Raja *et al.* (2011), o efeito do pH no particionamento de proteínas em SABs dá-se por meio da alteração da carga da proteína. A carga líquida da proteína depende de se o pH é maior do que o ponto isoelétrico (negativo), menor que o ponto isoelétrico (positivo), ou igual ao o ponto isoelétrico (zero). O ponto isoelétrico (PI) das principais endoglucanases produzidas por *Trichoderma Reesei* varia entre 3,9 e 7,5 (Ogeda e Petri, 2010); portanto os níveis de pH testados (5,0; 6,0 e 7,0) eram superiores aos PI de algumas dessas enzimas, carregando-as negativamente. Nessa situação, a enzima concentra-se preferencialmente na fase superior, elevando o valor do coeficiente de partição (Raja *et al.*, 2011).

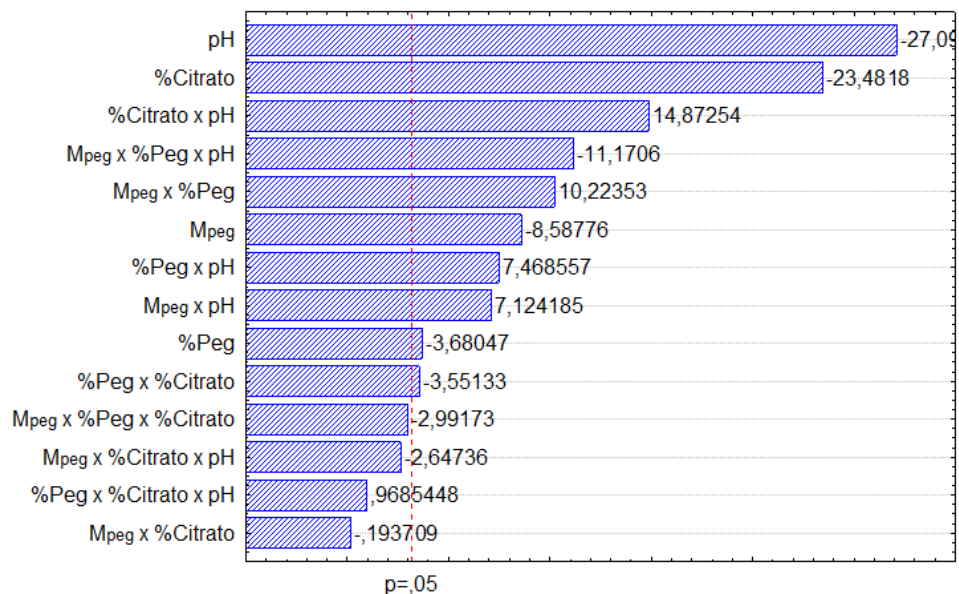
O Fator de purificação (Fp) é um parâmetro que reflete o aumento de pureza da enzima em uma das fases do SAB. Esse parâmetro revela o quanto a atividade específica da fase aumentou em relação à atividade específica do extrato bruto. O valor máximo observado foi de 5,31 para a fase superior do ensaio 1. Isso significa que na

fase superior deste SAB havia proporcionalmente uma relação entre a atividade enzimática e a concentração de proteínas totais 5,31 vezes maior que no extrato bruto.

Esse valor é superior ao observado por Fisher *et al.* (2014), que estudaram a partição do complexo celulolítico produzido pelo *Aspergillus niger* na fermentação semissólida de farelo de arroz e bagaço de cana. Os autores observaram um fator de purificação máximo de 2,0 quando trabalharam com SABs compostos por 22% PEG 2000 e tampão citrato de pH 7,0.

De acordo com Fisher *et al.* (2014) a purificação não ocorre de forma homogênea para todas as enzimas do complexo celulolítico. A influência dos valores dos parâmetros testados na variável-resposta fator de purificação na fase superior dos SABs, FP_t , é exibida no diagrama de Pareto da Figura 4.15.

Figura 4.15. Diagrama de Pareto para o fator de purificação da CMCase



Uma vez que o processo de purificação de uma determinada proteína em SABs é um processo complexo, influenciado por muitas variáveis, não é possível avaliar ou perceber a contribuição de cada parâmetro individual quando se varia mais de uma variável ao mesmo tempo, apesar disso, os resultados do planejamento experimental pode revelar algumas tendências.

O diagrama de Pareto da Figura 4.15 mostra que os valores do FP_t foram fortemente influenciados pelos valores de pH e da concentração de citrato. Porém, estas variáveis apresentam efeito negativo na variável resposta FP_t , o que significa que

são nos menores valores destes parâmetros que são obtidos os valores mais elevados de fator de purificação ou aumento de pureza. A massa molar do PEG (M_{PEG}) também apresentou efeito negativo.

O modelo de regressão linear de primeira ordem apresentado na Equação 4.5 foi proposto para a avaliação do Fator de purificação das CMCase, FP_t . Os valores em negrito são os estatisticamente significativos a 95% de confiança. Como a eliminação de variáveis não estatisticamente significativas ao nível de 95% não resultou em melhorias no modelo, elas foram mantidas. No modelo, A= Massa molar do PEG; B= Composição de PEG; C= Composição de citrato e D= pH

$$FP_t = 1,758 - 0,249A - 0,682B - 0,682C - 0,787D + 0,297AB - 0,006AC + 0,207AD - 0,103BC + 0,217BD + 0,332CD - 0,087ABC - 0,324ABD - 0,077ACD + 0,028BCD \quad (4.5)$$

O modelo da Equação 4.5 apresentou R^2 igual a 0,92; sendo capaz de explicar 92% das variações presentes no processo. A análise de variância (ANOVA) para este processo está na Tabela 4.13.

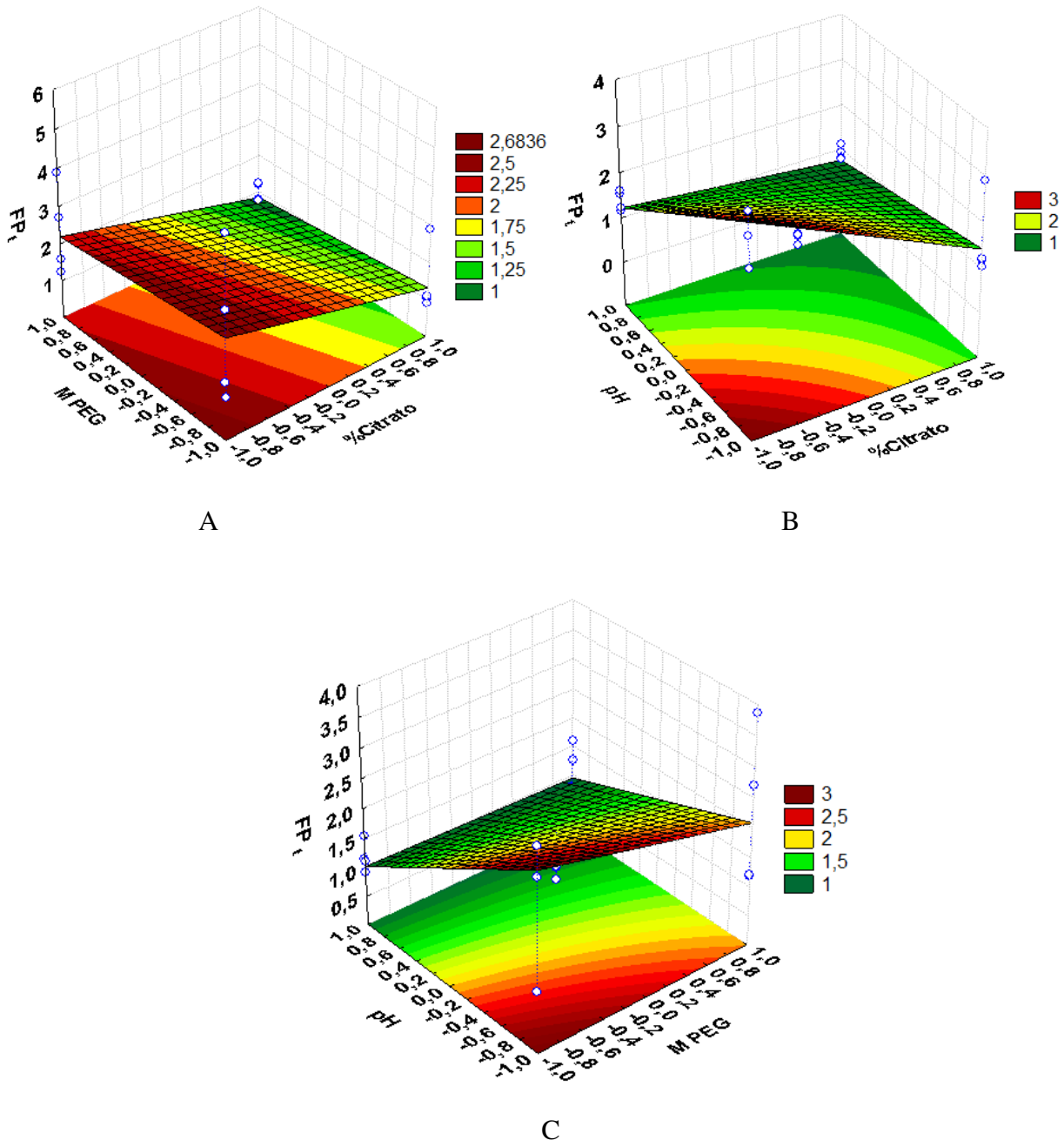
Tabela 4.13 - ANOVA para o fator de purificação da CMCase

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	26,21	10	2,62	10,08
Resíduo	2,35	9	0,26	
Falta de ajuste	2,09	2		
Erro puro	0,04	3		
Total	28,56	19		
% R^2	92,56			
$F_{\text{tabelado}} =$	3,14		Teste $F_{5\%} =$	3,21

A análise de variância para o fator de purificação da CMCase na Tabela 4.13 dá um resultado de 3,21 para o Teste F. Portanto é possível obter um modelo estatisticamente significativo, porém ele não poderá ser usado para fins preditivos, já que o Teste F apresentou um valor inferior a 4,0 (BARROS NETO, SCARMÍNIO E BRUNS, 1995).

As superfícies de resposta da Figura 4.15 mostram a influência das três variáveis que mais afetam o valor do Fator de purificação: pH, concentração de citrato (% Citrato) e massa molar do PEG (M_{PEG}) no FP_t da CMCase.

Figura 4.15. Superfícies de resposta mostrando a influência dos parâmetros testados no fator de purificação da CMCCase (FP_t): A =Influencia da massa molar de peg (M PEG) e composição de citrato (% Citrato), B= Influencia do pH e composição de citrato. C= Influencia do pH e massa molar de PEG (M PEG)



As superfícies de resposta da Figura 4.15 mostram que são nos menores níveis das variáveis pH, concentração de citrato e massa molar de PEG que se obtém os maiores

valores do fator de purificação. Tais superfícies mostram ainda, que o aumento no valor qualquer uma dessas variáveis resulta na diminuição do fator de purificação das CMCases, apresentando efeito negativo para o processo de purificação. Portanto, a melhor condição experimental para o FP_{CMC} foi com 18% de PEG 4000 e 12% de tampão citrato pH 5,0.

4.6.2 - Atividade em FPase

Os valores dos parâmetros: coeficiente de partição de proteínas (K_p), coeficiente de partição de FPase (K_{FPase}); fator de purificação na fase inferior (FP_b), fator de purificação na fase superior (FP_t), recuperação da enzima na fase inferior dos SABs (Y_b) e recuperação da enzima na fase superior dos SABs (Y_t) estão exibidos na Tabela 4.14, além dos valores de Massa molar de PEG (MM), composição de PEG (P), composição de citrato (C) e pH utilizados nos ensaios.

Tabela 4.14 - Parâmetros de partição para a FPase

E	MM	P (%)	C (%)	pH	K_p	K_{FPase}	FP_b	FP_t	Y_b (%)	Y_t (%)
1	4000	18	12	5	0,07	0,45	0,04	0,24	47,63	52,37
2	8000	18	12	5	0,16	2,75	0,02	0,43	16,66	83,34
3	4000	22	12	5	0,14	2,96	0,01	0,32	12,54	87,46
4	8000	22	12	5	0,11	1,87	0,04	0,74	19,97	80,03
5	4000	18	16	5	0,22	2,20	0,23	2,29	26,20	73,80
6	8000	18	16	5	0,67	3,04	0,22	1,00	22,02	77,98
7	4000	22	16	5	2,48	19,00	0,09	0,66	3,09	96,91
8	8000	22	16	5	1,26	3,85	0,23	0,70	15,60	84,40
9	4000	18	12	7	0,81	1,40	0,73	1,26	35,33	64,67
10	8000	18	12	7	0,55	0,96	0,68	1,19	47,63	52,37
11	4000	22	12	7	0,60	1,20	0,67	1,34	35,23	64,77
12	8000	22	12	7	0,55	1,13	0,77	1,59	39,50	63,74
13	4000	18	16	7	2,42	3,38	0,85	1,19	24,80	77,48
14	8000	18	16	7	3,33	1,08	1,83	0,59	51,00	49,00
15	4000	22	16	7	1,74	2,83	0,62	1,01	22,24	77,76
16	8000	22	16	7	2,41	1,89	0,94	0,73	32,24	67,76
17	6000	20	14	6	1,28	9,19	0,09	0,65	8,18	91,82
18	6000	20	14	6	1,17	11,53	0,06	0,58	6,54	93,46
19	6000	20	14	6	1,13	1,83	0,33	0,53	30,47	69,53
20	6000	20	14	6	1,03	4,00	0,14	0,55	16,68	83,32

Os dados de K_{FPase} exibidos na Tabela 4.14 revelam que a enzima F_{PASE} particionou-se preferencialmente para a fase superior, rica em PEG. O maior valor de K_{FPase} foi observado para o ensaio 7 ($K_{FPase} = 19$), que possuía os maiores níveis de composição em PEG e citrato, e os menores níveis de massa molar de PEG e pH testados, 4000g/mol e 5,0 respectivamente.

Herculano *et al.* (2012) também observaram a partição da FPase para a fase superior, ao estudarem a recuperação do complexo celulolítico do *Aspergillus japonicus* URM5620 por meio de SABs. Os autores observaram valores de coeficiente de partição de no máximo 2,98 para SABs formados por 24% de PEG1000, 15% de Citrato e pH 8,0; valor inferior ao obtido neste trabalho.

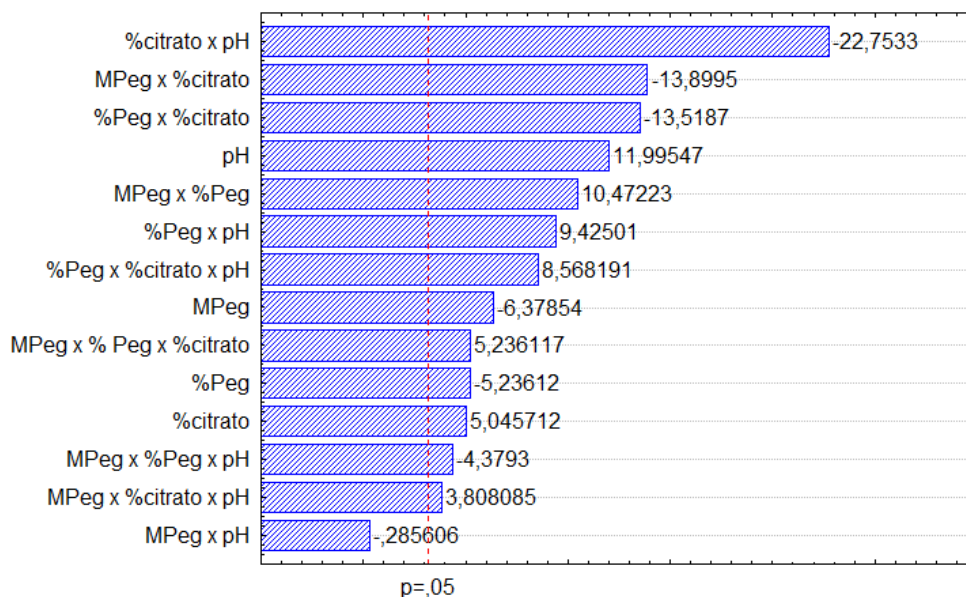
Neves *et al.*(2012) observaram um valor de coeficiente de partição de 14,42 para a fitase produzida por *Absidia blakesleeana* URM5604, em um SAB composto por 26% PEG 400 e 20% citrato de sódio em pH 6,0. Assim como neste trabalho, o valor máximo obtido por esses autores foi observado no SAB de maior concentração de PEG, maior concentração de citrato, menor massa molar de PEG e menor valor de pH.

Conforme mostram os dados de fator de purificação na fase superior dos SABs (FP_t) exibidos na Tabela 4.14 o maior valor de FP_t foi encontrado para o ensaio 5, cujo valor foi de 2,29.

Semelhantemente, Neves *et al.* (2008) observaram um valor de fator de purificação de 1,75 para a fitase produzida por *Absidia blakesleeana* URM5604, em SABs formados por PEG 8000 e citrato de sódio de pH 6. Já Yücekan e Önal (2011) encontraram valores de fator de purificação de até 3,3 para a partição da invertase do tomate em SABs formados por PEG 2000 e sulfato de sódio em pH 5,0.

Os efeitos observados para os parâmetros testados são exibidos no Diagrama de Pareto da Figura 4.16.

Figura 4.16 – Influências dos parâmetros testados no fator de purificação de FPases.



Como pode ser observado na Figura 4.16, as interações entre os parâmetros apresentaram maior influência no processo do os valores individuais. A concentração de citrato (%Citrato), por exemplo, tem pouca influência sozinha, mas as combinações dessa variável com cada um dos demais parâmetros estudados representam os efeitos mais significativos do processo.

O pH mostrou-se uma variável importante, pois foi a que apresentou maior efeito isoladamente. Porém, seu efeito positivo é inferior ao efeito negativo produzido pela interação dessa variável com a concentração de citrato, de efeito negativo. Além disso, a interação da concentração de citrato com a massa molar do PEG e a concentração de PEG também apresentaram efeitos significativamente elevados e negativos, sendo essas interações as variáveis que mais influenciam no valor de FP_{FPASE} . Essa afirmação corrobora com o fato de que o maior valor de FP_{FPASE} foi observado no ensaio 5 da Tabela 4.14 (2,29), o qual apresentava o nível máximo de concentração de citrato e os níveis mínimos das demais variáveis.

Um modelo de regressão de primeira ordem proposto para este processo está na Equação 4.6. As variáveis em negrito são estatisticamente significativas a 95%.

$$\begin{aligned}
 FP_i = & \mathbf{0,8795} - \mathbf{0,1675A} - \mathbf{0,1375B} + \mathbf{0,1325C} + \mathbf{0,3150D} + \mathbf{0,2750AB} - \\
 & \mathbf{0,3650AC} - \mathbf{0,0075AD} - \mathbf{0,3550BC} + \mathbf{0,2475BD} - \mathbf{0,5975CD} + \mathbf{0,1375ABC} - \\
 & \mathbf{0,1150ABD} + \mathbf{0,1000ACD} + \mathbf{0,2250BCD}
 \end{aligned} \quad (4.6)$$

O modelo da Equação 4.6 apresentou R^2 igual a 0,88. Ele é capaz de explicar 88% das variações apresentadas pelo processo.

A análise de Variância exibida na Tabela 4.15 foi utilizada se verificar a consistência do modelo proposto:

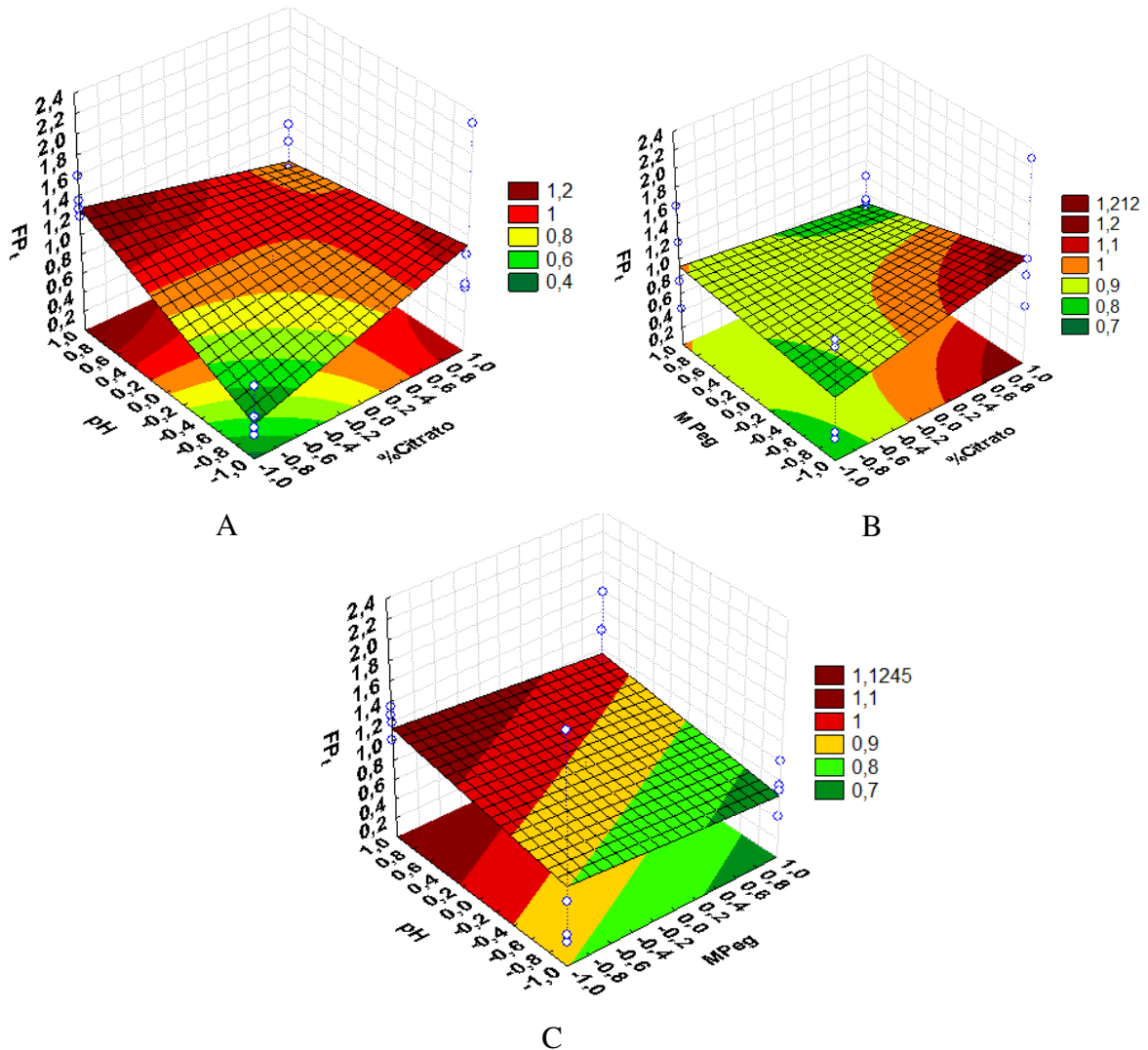
Tabela 4.15- Anova para o fator de purificação de FPase

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{calculado}
Regressão	4,039	13	0,311	3,45
Resíduo	0,540	6	0,090	
Falta de ajuste	0,531	2		
Erro puro	0,008	3		
Total	4,579	19		
%R²	88,2			
F_{tabelado} = 3,96			Teste F_{5%} = 0,87	

A análise de variância mostrada na Tabela 4.15 para o fator de purificação de FPase apresentou valor do Teste F inferior à unidade. Portanto, o modelo sugerido não representa adequadamente as influências dos parâmetros no processo, devendo ser descartado.

As superfícies de resposta da Figura 4.17 foram construídas para a obtenção de tendências a respeito da influência das variáveis que mais influenciam no Fator de purificação da FPase.

Figura 4.17 - Superfícies de resposta mostrando a influência dos parâmetros testados no fator de purificação da FPase (FP_t): A = Influencia do pH e composição de citrato B= Influência da massa molar de peg (MPeg) e composição de citrato (% Citrato), C= Influência do pH e massa molar de PEG (MPeg)



A Figura 4.17 A, embora não mostre uma relação muito clara entre os parâmetros pH e concentração de citrato (% Citrato) no fator de purificação da FPase, mostra que valores baixos de pH, assim como valores baixos de concentração de citrato não contribuem para o aumento no fator de pureza da FPase (FP_t). Na Figura 4.17 B, pode-se perceber que altas concentrações de citrato favorecem o fator de purificação, e que a

massa molar do PEG, contribui muito pouco no processo, ou seu efeito é muito pequeno quando comparado ao da concentração de citrato. Porém, PEGs de massas molares menores contribuem para o aumento de FP_t . A Figura 4.17 C também mostra que são nos menores valores de massa molar de PEG que são observados os mais elevados valores de FP_t . O aumento do pH aumenta o fator de purificação das FPases (FP_t)

4.6.3 - Atividade em Celobiase

Os valores dos parâmetros: coeficiente de partição de proteínas (K_p), coeficiente de partição de Celobiase (K_{Celo}); fator de purificação na fase inferior (FP_b), fator de purificação na fase superior (FP_t), recuperação da enzima na fase inferior dos SABs (Y_b) e recuperação da enzima na fase superior dos SABs (Y_t) estão exibidos na Tabela 4.12, além dos valores de Massa molar de PEG (MM), composição de PEG (P), composição de citrato (C) e pH utilizados nos ensaios.

Tabela 4.16 - Atividade em celobiase

E	MM	P (%)	C (%)	pH	K_p	K_{Celo}	FP_b	FP_t	Y_b (%)	Y_t (%)
1	4000	18	12	5	0,07	0,83	5,43	61,64	33,23	66,77
2	8000	18	12	5	0,16	0,70	7,23	31,93	43,88	56,12
3	4000	22	12	5	0,14	0,85	4,98	30,57	33,23	66,77
4	8000	22	12	5	0,11	0,75	6,10	38,26	39,34	61,69
5	4000	18	16	5	0,22	4,97	0,92	21,10	13,58	86,42
6	8000	18	16	5	0,67	3,2	2,03	9,74	21,15	78,85
7	4000	22	16	5	2,48	0,86	26,05	9,01	41,40	58,60
8	8000	22	16	5	1,26	0,52	17,31	7,16	57,72	42,28
9	4000	18	12	7	0,81	4,90	1,89	11,42	13,48	86,52
10	8000	18	12	7	0,55	0,89	4,21	6,82	49,58	50,42
11	4000	22	12	7	0,60	0,47	16,29	12,66	58,24	41,76
12	8000	22	12	7	0,55	0,47	16,39	14,14	57,78	42,22
13	4000	18	16	7	2,42	0,81	27,25	9,06	54,91	45,9
14	8000	18	16	7	3,33	0,69	32,27	6,72	61,74	38,26
15	4000	22	16	7	1,74	0,79	13,82	6,29	50,51	49,49
16	8000	22	16	7	2,41	0,30	32,84	4,12	74,78	25,22
17	6000	20	14	6	1,28	1,04	24,53	19,90	44,11	44,11
18	6000	20	14	6	1,17	1,22	21,36	22,15	39,88	39,88
19	6000	20	14	6	1,13	1,57	21,56	29,87	33,82	33,82
20	6000	20	14	6	1,03	1,02	18,95	18,95	43,98	43,98

Os valores obtidos para o coeficiente de partição de celobiase, K_{CELO} , foram bastante variáveis, conforme mostram os resultados para esta variável na Tabela 4.28. Na maioria dos ensaios, a enzima particionou-se preferencialmente para a fase inferior, rica em sal. Já para os ensaios 5, 6, 9 e pontos centrais, a enzima foi particionada para a fase superior, rica em PEG.

Gautam e Simon (2006) também observaram a partição preferencial de β -glucosidase, (um tipo de celobiase) produzida por *Trichoderma reesei*, para a fase inferior de SABs formados por PEG 4000 e fosfato de potássio quando o pH atingia valores superiores a 6,5.

O maior valor de partição (4,97) foi encontrado no ensaio 5, o qual apresentava os menores valores dos parâmetros: massa molar de PEG, concentração de citrato e pH, dentre os níveis estudados.

O valor de K_{CELO} obtido neste trabalho foi superior ao encontrado por Herculano *et al.* (2012) para a partição de β -glucosidase (um tipo de celobiase) produzida por *Aspergillus japonicus*, que foi de 3,89 para SABs formados por 24% PEG 8000 e 20% citrato de sódio em pH 8,0.

Apesar de a literatura mencionar que as β -glucosidases particionam-se preferencialmente para a fase rica em sal (GALTAM e SIMON, 2006) os maiores valores de coeficiente de partição de celobiases neste trabalho foram observados na fase rica em PEG, conforme pode ser verificado nos ensaios 5 e 9 da Tabela 4.28. O mesmo foi observado por Herculano *et al.* (2012), que determinaram uma das condições em que a β - glucosidase concentrava-se na fase superior como a mais adequada.

Gautam e Simon (2006) verificaram que a superfície de β - glucosidase tornou-se positivamente carregada quando o pH do sistema foi aumentado de 6,0 para 8,0. Os autores perceberam aumento na partição da enzima, que apresenta PI de 8,7, para a fase rica em sal. De acordo com Ratanapongleka (2010) deve-se levar em consideração a possibilidade de desnaturação da enzima durante o processo de partição. Nesses casos, a enzima desnaturada tem uma área superficial significativamente maior do que a proteína nativa, e a superfície exposta é muito mais hidrofóbica, causando também diferente particionamento entre a enzima ativa e a desnaturada.

Neste trabalho, porém, não levou-se em consideração a presença de celulases desnaturadas nos SABs. A avaliação dos efeitos dos parâmetros testados foi realizada com base nas atividades enzimáticas presentes nas fases dos extratos.

Uma outra explicação para o fato da enzima celobiase ter tido o mais alto valor de coeficiente de partição na fase PEG pode ser dada com base no argumento de Mayerhoff e Franco (2004), de que a fase de PEG pode eliminar inibidores durante a extração e a composição do sistema acaba favorecendo a atividade da enzima, elevando seu valor. Esta suposição explica por que alguns pesquisadores acabam detectando recuperações de atividade superiores a 100% em uma das fases, como Herculano *et al.* (2012) e Porto *et al.* (2007).

Dentre as enzimas estudadas, a celobiase foi a que apresentou maior fator de purificação, conforme mostram os resultados deste parâmetro na Tabela 4.16

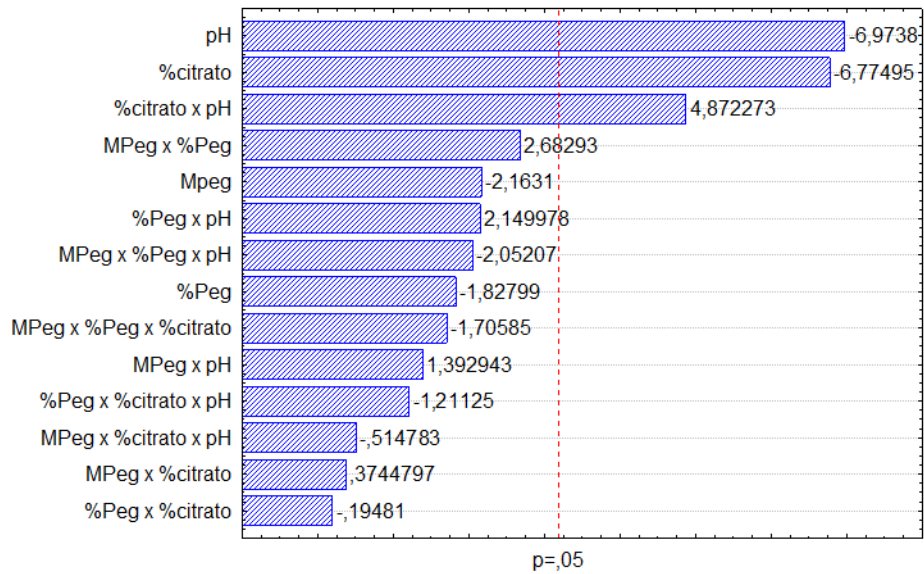
O valor de FP_{CELO} de 61,64 foi observado no ensaio 1, o qual possuía os menores níveis de todos os parâmetros testados. O valor obtido neste trabalho foi muito superior ao encontrado por Herculano *et al.* (2012), que foi de apenas 1,97 para a partição de β -glucosidase produzida por *Aspergillus japonicus*. O SAB mais eficiente era formado por 24% PEG 8000 e 20% citrato de sódio em pH 8,0. Hemavathi e Raghavarao (2011) encontraram um fator de purificação de 3,3 para a β -glucosidase da cevada, utilizando SABS formados por PEG 1500 e sulfato de amônio.

Há relatos na literatura de que elevados valores de fator de purificação podem ser obtidos nas operações com SABs. Mohamadi e Omidinia (2007), por exemplo, encontraram um fator de purificação de 474,3 ao estudarem a partição de fenilalanina desidrogenase de *Bacillus badius* em SABs formados por PEG, sulfato de amônio e NaCl.

Observando-se os valores de fator de purificação obtidos em cada ensaio, percebe-se o quanto este parâmetro varia mediante alterações nas condições operacionais do processo. Isso mostra a importância de se otimizar as condições operacionais dos SABs.

O digrama de Pareto da Figura 4.18 mostra a influência das variáveis estudadas no fator de purificação da celobiase.

Figura 4.18. Contribuição das variáveis testadas no fator de purificação da celobiase



O pH e a concentração de citrato nos SABs foram os principais fatores que influenciaram o fator de purificação da celobiase.

O modelo proposto para representar o processo é exibido na Equação 4.7. Os parâmetros em negrito são significativos ao nível de confiança de 95%.

$$\begin{aligned}
 FP_{celo} = & \mathbf{18,576} - 2,679A - 2,264B - \mathbf{8,390C} - \mathbf{8,636D} + 3,322AB + 0,464AC + \\
 & 1,725AD - 0,0241BC + 2,662BD + \mathbf{6,034CD} - 2,113ABC - 2,541ABD - \\
 & 0,637ACD - 1,500BCD
 \end{aligned}
 \tag{4.7}$$

O modelo da Equação 4.7 apresentou R² igual a 0,95. Ele explica, portanto, apenas 95% das variações apresentadas pelo processo.

A análise de variância deste processo é exibida na Tabela 4.17

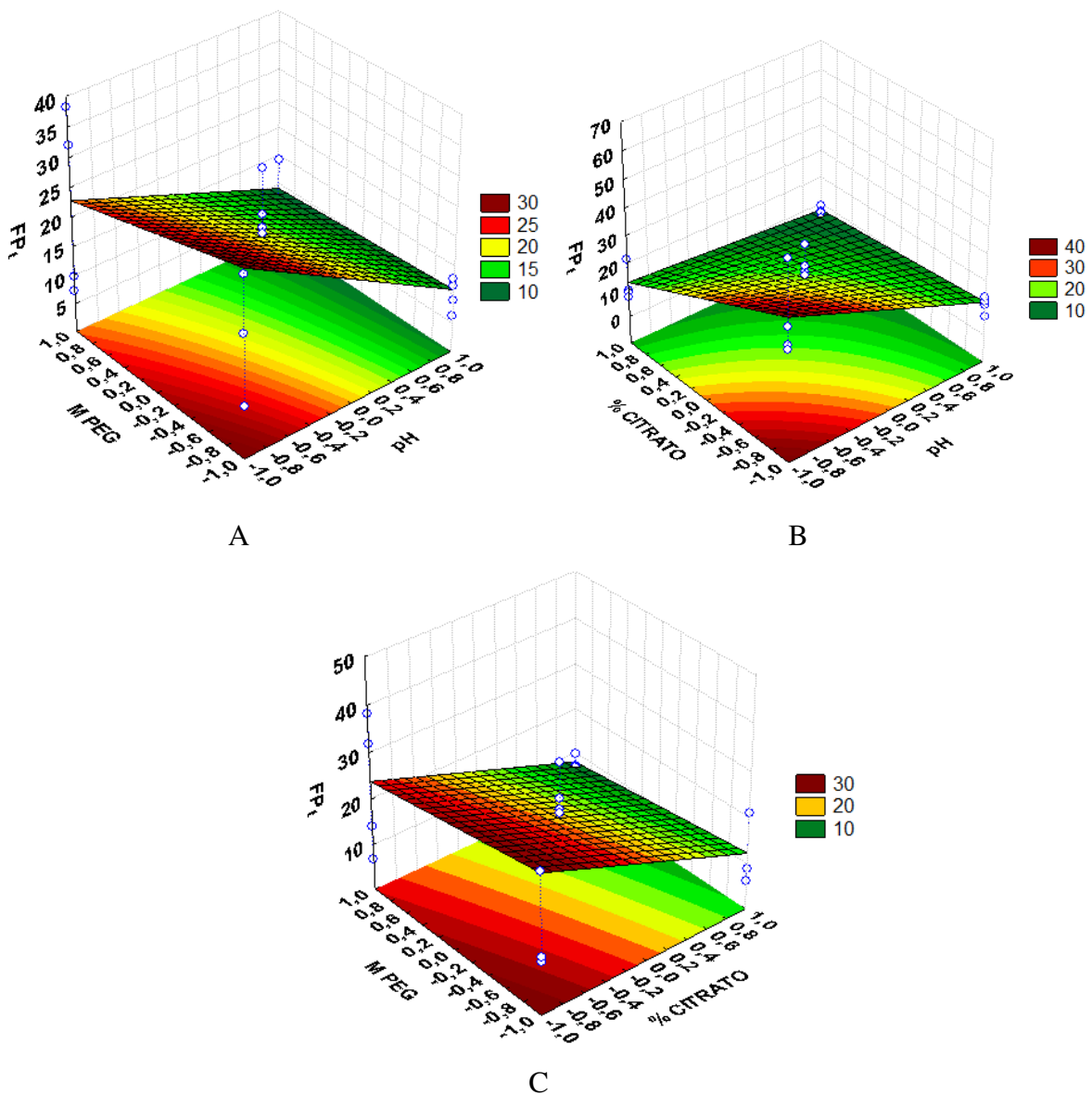
Tabela 4.17 - Teste F para o fator de purificação de celobiase

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}
Regressão	2902,13	3	967,37	16,36
Resíduo	945,65	16	59,10	
Falta de ajuste	115,98	2		
Erro puro	73,613	3		
Total	3847,78	19		
%R ²	95,01			
F _{tabelado} = 3,24			Teste F _{5%} = 5,05	

O Teste F da Tabela 4.17 apresentou valor superior a 4,0. Portanto, o modelo proposto para o fator de purificação de celobiose é significativo e preditivo.

As superfícies de resposta obtidas para o modelo são mostradas na Figura 4.19.

Figura 4.19. Superfícies de resposta mostrando a influência dos parâmetros testados no fator de purificação da FPase (FP_t): A = Influência do pH e massa molar de PEG (MPeg), B= Influencia do pH e composição de citrato, C= Influência da massa molar de peg (M PEG) e composição de citrato (% CITRATO)



As superfícies de resposta mostram que as variáveis pH e citrato apresentam grande influência no fator de purificação das celobiose (FP_t), sendo que a interação entre esses dois parâmetros é bastante significativa, conforme mostra a superfície da

Figura 4.19 B. São nos menores níveis das variáveis pH e citrato que são observados os mais altos valores de FP_t . A massa molar do PEG também influencia, sendo que nos menores valores de massa molar de PEG foram observados os maiores valores de purificação de celobiase na fase superior dos SABs (FP_t).

4.7 – AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DOS SABs

Uma das vantagens que a utilização dos SABs oferece é a promoção do aumento de pureza nos extratos, representado pelo fator de purificação (FP).

A Tabela 4.18 resume os valores dos parâmetros que resultaram em máximo fator de purificação para os ensaios de partição realizados.

Tabela 4.18 - Condições operacionais dos ensaios com maior fator de purificação (FP)

Enzima	M _{PEG}	%PEG	%Citrato	pH	K	FP	Y _t (%)
CMCase	4000	18	12	5	0,72	5,31	63,78
FPase	4000	18	16	5	2,2	2,29	73,80
Celobiase	4000	18	12	5	0,83	61,64	66,77

De acordo com a Tabela 4.18, o PEG de massa molar 4000 foi o mais adequado, dentre as massas molares testadas, para o aumento de pureza das três atividades investigadas. Os maiores valores de fator de purificação para todas as atividades foram observados nos ensaios conduzidos com o menor teor de PEG (18%) e o menor valor de pH (5,0) entre os níveis testados.

Quanto ao teor de citrato, apenas a atividade expressa em FPase foi beneficiada pelo aumento na concentração de sal dos sistemas.

Pode-se afirmar que, no geral, os valores dos parâmetros que resultaram em máximo fator de recuperação foram praticamente os mesmos, o que significa que o um SAB formado por 18% PEG 4000 e 12% Citrato de sódio em pH 5,0 vai promover o aumento de pureza tanto das CMCases quanto das celobiasas, sendo essa uma condição adequada para aplicação de SABs em um processo de purificação de celulasas.

Quanto a FPase, como já foi mencionado anteriormente, trata-se de uma atividade promovida pelo sinergismo de diferentes celulasas, entre endoglucanases e exoglucanases. Portanto o aumento de pureza deve levar em conta a ação e

quantidade de cada enzima envolvida na degradação da celulose amorfa. Por isso a condição operacional em que deu-se seu maior aumento de pureza diferiu das CMCase e celobiasas apenas pelo fato da concentração de citrato ser maior para este processo. O fato das condições operacionais terem sido praticamente as mesmas revela uma vantagem: O fato de poder promover um aumento na pureza de todas as atividades testadas em uma única operação.

A purificação de enzimas individuais é de interesse quando se quer recuperar apenas a enzima alvo. No caso das celulases destinadas a processos de hidrólise de biomassa, é interessante que tenha um preparado enzimático composto por todas as enzimas que atuam na conversão da celulose em glicose. Por isso, dentre as atividades testadas, a FPase tem maior importância para esse processo, por representar verdadeiramente a capacidade do preparado enzimático na conversão da celulose em glicose.

Para a utilização das celulases produzidas na hidrólise de matérias lignocelulósicas, é interessante a produção de extratos que aproveitem o máximo da sinergia entre as celulases, sendo a atividade FPase muito importante nesse processo. Uma vez que a celobiasa é a enzima que transforma dímeros de açúcares em glicose, e que é a enzima produzida em menor quantidade pelo fungo (OGEDA e PETRI, 2006), um processo que consiga enriquecer a quantidade dessa enzima no extrato certamente aumentará a atividade em FPase e a aplicabilidade do extrato produzido.

As condições elencadas na Tabela 4.18 podem servir de ponto de partida para um estudo de otimização dos SABs, seja testando níveis menores para as variáveis estudadas ou estudando outros parâmetros que não foram testados neste trabalho, com a finalidade de se obter enzimas em proporções otimizadas no extrato para aplicação na hidrólise enzimática.

Além disso, é possível que a utilização de extratos mais concentrados nos SABs resulte em processos mais eficientes, onde a quantidade de enzimas recuperadas e aumento de pureza promovido nessa etapa torne viável a aplicação dos SABs como parte de um processo de *downstream* de celulases.

O coeficiente de partição e a recuperação das enzimas também deve ser levado em conta, uma vez que a melhor operação de um SAB é aquela em que se tem elevada recuperação da enzima em uma das fases, com máximo aumento de pureza possível. A Tabela 4.19 resume os valores dos parâmetros que resultaram em máximo coeficiente de partição (K) e recuperação (Y_t) para as enzimas estudadas.

Tabela 4.19 - Condições operacionais dos ensaios com maior coeficiente de partição enzimática (K) e recuperação na fase superior (Y_t)

Enzima	M_{PEG}	%PEG	%Citrato	pH	K	Y_t (%)
CMCase	4000	22	16	7	18,20	95,74
FPase	4000	22	16	5	19,00	96,91
Celobiase	4000	18	16	5	4,97	86,42

Os dados da Tabela 4.19 revelam que o valor de massa molar do PEG que mais influenciou a recuperação das enzimas também foi a menor dentre as testadas, ou seja, o PEG 4000. Além disso, a concentração de citrato em seu nível superior (16%) influenciou positivamente a partição e recuperação das três atividades celulolítica testadas. As melhores condições para a recuperação de cada enzima diferem de uma para a outra em apenas um parâmetro: o pH ou a concentração de PEG.

A semelhança entre as condições operacionais que resultam em máxima recuperação das enzimas é também vantajosa no que diz respeito a otimização do processo para obtenção de um extrato com variável composição de cada uma das atividades pelo simples ajuste dos parâmetros operacionais.

5 CONCLUSÃO

- Os resultados da caracterização físico-química da biomassa da palma forrageira revelaram que este material é adequado para utilização em processos de fermentação semissólida.
- O estudo cinético da fermentação semissólida mostrou que a atividade CMCase atinge um pico de atividade de 6,45 U/gds em 110 horas de processo. Além disso, o estudo concluiu que não há necessidade de se lavar a biomassa para remoção de inibidores e que a adição de $(\text{NH}_3)_4\text{SO}_4$ em 1% favorece o processo fermentativo. A umidade do substrato deve ser de 90%, o que é vantajoso, pois a biomassa da palma in natura já apresenta esta umidade.
- A relação solvente/substrato o parâmetro que mais influencia no processo de extração das enzimas a partir do meio fermentado. Uma condição adequada para a máxima recuperação de atividade a partir da biomassa da palma fermentada é: relação solvente/substrato de 20 mL/g, tempo de contato de 15 minutos e agitação de 50rpm.
- A CMCase apresentou temperatura ótima de 55°C e pH ótimo entre 4,0 e 5,0. O extrato mantém 40% de sua atividade quando incubada a 50°C por 1 hora.
- O extrato bruto produzido pela fermentação semissólida da biomassa da palma tem aplicação potencial na hidrólise de materiais lignocelulósicos. A biomassa da palma forrageira e o resíduo da fermentação semissólida mostraram-se úteis na produção de glicose por meio da hidrólise enzimática. Foi observada uma produtividade de AR máxima de 334 mg/Lh e 308 mg/Lh em 4h, para a hidrólise da biomassa da palma e do resíduo da fermentação, respectivamente.
- A CMCase apresentou um coeficiente de partição máximo de 18,20 com recuperação máxima de 95,74% Quando o SAB era composto por 22% PEG 4000 e 16% de citrato de sódio em pH 7,0. O maior valor de fator de purificação foi de 5,31; para o SAB composto por 18% PEG 4000 e 12% citrato de sódio em pH 5,0.
- A FPase apresentou um coeficiente de partição máximo de 19 com recuperação máxima de 96,91% quando o SAB era também composto por 22% PEG 4000 e 16% de citrato de sódio, porém de pH 5,0. O maior valor de fator de purificação

foi de 2,29; para o SAB composto por 18% PEG 4000 e 16% citrato de sódio em pH 5,0.

- A Celobiase apresentou um coeficiente de partição máximo de 4,97 com recuperação máxima de 86,42% quando o SAB era também composto por 18% PEG 4000 e 16% de citrato de sódio, porém de pH 5,0. O maior valor de fator de purificação foi de 61,64; para o SAB composto por 18% PEG 4000 e 12% citrato de sódio em pH 5,0.
- Os SABs formados por PEG e citrato de sódio mostraram-se adequados como etapa inicial de um processo de recuperação e purificação de celulasas obtidas da fermentação semissólida da palma forrageira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana de açúcar. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.18, n.1, p.57-70, 2000.

AKCAPINAR, G. B.; GUL, O.; SEZERMAN, U. O. From in silico to in vitro: Modelling and production of *Trichoderma reesei* endoglucanase 1 and its mutant in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, n.159, p.61– 68, 2012

ALBERTSSON, P. A. Chromatography and partition of cells and cells fragments. **Nature**, n.177, p.771-774, 1956

ALBERTSSON, P. A. **Partitioning of Cell Particles and Macro-molecules**. Wiley–Interscience, New York, p.8-38, 1986.

ALBUQUERQUE, R. C. Brasil: evolução social de longo prazo e médio prazo. **Estudo e Pesquisa**, Rio de Janeiro, n.491, 2012.

ALCÂNTARA, S. R.; LEITE, N. J.; SILVA, F. L. H. Scale up of polygalacturonase production by solid state fermentation process. In: MUZZALUPO, I (org). **Food Industry. Intech**, 2013, p.401-420

AMID, M.; SHUHAIMI, M.; SARKER, M. Z. I; MANAP, M. Y. A. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. Chokanan) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. **Food Chemistry**, v.132, p. 1382–1386, 2012.

AMORIM, B. C. **Estudo da produção de celulases por fermentação semissólida em bagaço de caju (anarcadium occidentale lineu) utilizando o microorganismo *Trichoderma sp.*** Campina grande, 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) UFCG, Campina Grande, 2010.

AMRITKAR, N.; KAMAT, M.; LALI, A.; Expanded bed affinity purification of bacterial - amylase and cellulase on composite substrate analogue–cellulose matrices. **Process Biochemistry**. v.39, p.565–570, 2004.

ANTOV, M.G.; JUGOVIĆ, B. Z. GVOZDENOVIĆ, M.M; JUGOVIĆ, Z.D.K. Partitioning of cellulolytic activity in the polyethylene glycol/dextran two-phase systems. **APTEFF**, v.43, p.151-158, 2012

ARAKAWA, T., TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent-cation salts - Balance between hydration and salt binding. **Biochemistry**, v.23, n.25, p.5912-5923, 1984.

ARAKAWA, T.; KITAB, Y; SHIRAKIC, K; OHTAKED,S. The mechanism of protein precipitation by salts, polymers and organic solvents. **Global Journal of Analytical Chemistry**. n.4, v.2 p. 152-167, 2011).

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n.4. 2010.

ARAÚJO, L. F. A., OLIVEIRA, L. S. C., PERAZZO NETO, A., ALSINA, O. L. S., SILVA, F. L. H. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, n.3, p.379-384, 2005

ARAÚJO, L. F.; SILVA, F. L. H.; BRITO, E. A.; JÚNIOR, S. O.; SANTOS, E. S. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p.401-407, 2008

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. Biotecnologia Industrial. v. 2. São Paulo: Blucher, 2001.

BARACHO, T. H. A.; SILVA, F. L. H.; NETO, A. B. T. Utilização de matérias-primas lignocelulósicas para produção de álcool etílico: estudos da hidrólise ácida da palma forrageira e da destilação do hidrolisado fermentado. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2009, Uberlândia. **Anais...**, Uberlândia, MG, Brasil, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 480 p.

BASU, S. N., WHITAKER, D. R. Inhibition and stimulation of the cellulase of *Myrothecium verrucaria*. **Arch. Biochem. & Biophys.**, n.42, p.12-24, 1953

BATISTA, A. M. V; CARVALHO, F. F. R.; FILHO, R. R. R. A palma forrageira na alimentação de ruminantes no semiárido brasileiro. In II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES. 2013, Itapetinga. **Anais...** Itapetinga, UESB, 2013. Disponível em: http://www.uesb.br/eventos/simpósio_ruminantes/arquivos/ANAIS-II-SBPR.pdf ; acesso em 22/03/2014.

BEIJERINCK, M. W. Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen stärke. **zbl. bakt. II Natur**. n.627,p.697-699; 1896

BEZERRA, J. D. P.; SANTOS, M. G. S.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (*Cactaceae*) and preliminary screening for enzyme production. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v.28, p.1989–1995, 2012

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advanced**, v.18, n.5, p.355-383, 2000

BHAVSAR, K.; RAVI KUMAR, V.; KHIRE, J. Downstream processing of extracellular phytase from *Aspergillus niger*: chromatography process vs. aqueous two phase extraction for its simultaneous partitioning and purification. **Process Biochem.** n.7, v. 47, p.1066-1072, 2012

BIAZUS, J. P.M; SANTANA, J. C. C; SOUZA, R. R. TAMBOURGI, E. B. Purificação de amilases de malte de *zea mays*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, n.30, v.1, p.218-223, jan.-mar. 2010

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, Ed. Interciência, 2008, 506 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** n.72, p.248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária. **Métodos Físico-químicos para análise de alimentos**. Brasília: Editora MS. 2005, 1017p.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger* . **Process Biochemistry.** n. 2, v.34, p. 181-186, 1999.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010

CHÁVEZ-GARCÍA, M.; MONTAÑA-LARA, J. S.; MARTÍNEZ-SALGADO, M. M.; MERCADO-REYES, M., RODRÍGUEZ, M. X.; QUEVEDO-HIDALGO, B. Effects of substrate and light exposition in the production of *Trichoderma sp.* **Universitas Scientiarum**, n.3, v.12, p. 1-8, 2008.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid sate fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p.323-328, 2007.

CLÁUDIO, A. F. M.; FERREIRA, A. M.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**. v. 192, p. 142–149, 2012

COURI, S.; FARIAS, A. X. A manipulação genética de *Aspergillus niger* para o aumento da síntese de enzimas pectinolíticas. **Revista de Microbiologia**, n.26, p.314-317, 1995

COUTINHO, M. J. F.; CARNEIRO, M. S. R.; SOUZA, M. S.; EDVAN, R. L.; PINTO, A. P. A pecuária como atividade estabilizadora no Semiárido Brasileiro. **Vet. e Zootec.** n.20, v.3 p.9-17, set. 2013

DAMASO, M. C. T.; terzil, S. C.; FARIAS, A. X.; OLIVEIRA, A. C. P.; FRAGA, M. E.; COURI, S. Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates. **Braz. arch. biol. technol.** n.4, v.55, p. 513-520, 2012

DAMISA, D., KUTA; F.A.; ADABARA, N.U. Mutagenic treatment of *aspergillus niger* with hydroxylamine for improved cellulase synthesis from cellulosic wastes. **Journal of Biotechnological Sciences**. n.1, v.2 p. 65-72, 2013

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345-1351. 2006.

DA SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Purification of soybean peroxidase (*Glycine max*) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr B**. v.743, p.287-294, 2000

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PREDELA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology** n.107, p.517-521, 2012

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D.M.F., 2001. Fermentação em estado sólido. In: SCHIMEDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, v. 2, p. 247-276.

DEMIATE, I. M.; WOSIAKYI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Analysis of total and reducing sugar in foods. A comparative studies between colorimetric and titration techniques. **Exact and Soil Sciences, Agrarian and S. Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65-78, 2002.

DEUTSCHER, M. P. **Methods in Enzimology**. San Diego: Academic Press, 1990, p.285-306,

DO NASCIMENTO, I.S.B.; COIMBRA, J. S. R, MARTINS, J.P.; SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; PIROZZI, M. B.; CINQUINI, A. Partitioning of glutenin flour of special wheat using aqueous two phase systems. **J.Cereal Sci.** N.2, v.52, p. 270-274, 2010

DOMINGUES, O.. **Origem e introdução da palma forrageira no Nordeste**. Instituto Joaquim Nabuco de Pesquisas Sociais. Recife, Brasil. 1963. 76 p.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. California, Academic Press. 2005.

DUSTET, J.; CARMENATE,M.; HARAMBOURE,T.; HERNÁNDEZ, O.;MARTÍNEZ, J.L. Obtención de celulasas de *aspergillus niger*.Técnicas de cultivo y método de separación. In: IX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA, XIII CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA, II CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA. 2001, Veracruz. **Anais...Veracruz**, 2001. Disponível em http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/II_bioingenieriafermentaciones.html (acesso em 24/09/2013).

DWYER, J. L. Scaling up bio-product separation with high performance liquid chromatography. **Bio/Technology** v.2, p.957-964, 1984.

ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher *Basidiomycetes*. **Applied Biotechnology and Microbiology**, v.29, p.257-266, 1993

FARINAS, C. S. SCARPELINI, L. M.; MIRANDA, E. A.; BERTUCCI NETO, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Braz. J. Chem. Eng.** n.1, v.28, p. 17-26, 2011

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 223-227, 2003.

FERNANDES-SALOMÃO, T. M., AMORIM, A. C. R., CHAVES-ALVES, V. M., COELHO, J. L. C., SILVA, D. O., ARAÚJO, E. L. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 15-18, 1996

FERNÁNDEZ, D. R.; LEÓN, J. A. R; CARVALHO, J. C.; KARP, S. G.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. Process Development to Recover Pectinases Produced by Solid-State Fermentation. **J Bioprocess Biotechniq.** n.4, v.2, p. 1-7, 2012

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: current status, challenges, and future direction. **Energy & Fuels**, n.20, p.1727-1737,2006

FERREIRA, C. A.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, D. C.; SANTOS, M. V. F.; SILVA, J. A. A. LIRA, M. A.; MOLICA, S. G. Utilização de Técnicas Multivariadas na Avaliação da Divergência Genética entre Clones de Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.). **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, p.1560-1568, 2003

FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. **Braz. J. Chem. Eng.** n.4, v.29, p. 683-690, 2012

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y., Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover, **Bioresource Technology**, v.99, p.7623–7629, 2008.

GALATI, E. M; MENDELLO, M. R.; GIUFFRIDA, D.; MICELI, N. Anticancer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*): ultra structural study. **J Ethnopharmacol** n.76, p.1-9, 2001

GAUTAM, S.; SIMON, L.; Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly (ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p.104-108, 2006

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOJA, A. M.; YANG, H; CUI, M.; LI, C. Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. **J Bioprocess Biotechniq.** n.1, v.4, p. 1-8, 2013

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Quim. Nova**, v. 32, n.3, p.582-587, 2009

GÓMEZ, G. N.; NERLI, B.; ACOSTA, O. C.; PICÓ, G. A.; LEIVA, L. C. Aplicación de Sistemas Bifásicos Acuáticos (SBA) para el aislamiento de toxinas ofídicas. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Resumen: E-008. 2006

GONG, C. S., TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Process**, v.3, p.111-139, 1975.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENGEDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.

HEMAVATHI, A. B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Differential partitioning of α -galactosidase and β -glucosidase using aqueous two phase extraction. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 649-655. 2011

HERCULANO, P. N.; MACIEL, M. H. C.; MOREIRA, K. A.; PORTO, T. S.; SOUZA-MOTTA CRISTINA MARIA; PORTO, A. L. F. Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by *Aspergillus japonicus* URM5620 using PEG-Citrate in an aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v.335, p.8-13, 2012.

IBARRA-HERRERA, C. C.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Application of an aqueous two-phase systems strategy for the potential recovery of a recombinant protein from alfalfa (*Medicago sativa*). **Sep Purif Technol.** n.1, v.77, p.94-98, 2011

INSA. INSTITUTO NACIONAL DO SEMIÁRIDO. **Insa investe R\$ 500 mil na revitalização da cultura da palma forrageira.** Boletim informativo, ano I, Nº 02, 18 A 22 de fevereiro de 2013. Disponível em: <http://www.insa.gov.br/wpcontent/uploads/2013/04/BOLETIM-Informativo2-Retificado1.pdf>. Acesso em 05/04/2014.

JANSON, J.C.; RYDÉN, L. (orgs) **Protein purification - principles, high resolution methods, and applications.** 2nd ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 1998.

KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. **ADV. Protein Chem.**, n.14, p.1-63, 1959

KEEY, R.B. **Drying of loose and particulate materials.** New York: Hemisphere, 1991, 57 p.

KETNAWA, S.; SAI-UT, S.; THEPPAKORN, T.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Partitioning of bromelain from pineapple peel (*Nang Lae* cultiv.) by aqueous two phase system. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, n.4, v.2, p. 457-468, 2009

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

LEE, J. C.; KIM, H. R.; KIM, J.; JAM, Y. M. Antioxidant property of anethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **J Agric Food Chem**, n.50, p.6490-6496, 2002

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, p.1-24, 1997.

LEVER, M.; HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, n.101, p.7083–7087, 2010

LEITE, R.S.R.; GOMES, E.; SILVA, R., 2007. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidase from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochem.**, v.42, p.1101–1106, 2007

LIMA, M. E. O.; MORAES, I. V. M.; GONDIM, V. I. L.; BASTOS, M. S. R.; EGITO, A. S. Avaliação do armazenamento refrigerado e do congelamento sobre a atividade proteolítica e coagulante de proteases obtidas de semente de girassol. in: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, Fortaleza, 2010. **Resumos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34457/1/RE10140.pdf>. Acesso em 01/05/2013.

LINS, S. A. S. **Produção de celulasas por fermentação semissólida em bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48**. Campina Grande, 2012. 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) UFCG, Campina Grande, 2012.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; WU, H.; XU, D.; TANG, Z.; SHEN, Q. Thermo stable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n.65, p.717-725, 2011

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** n.66, v.3, p.506-77, Sep, 2002

LUIZ, J. R. L. F. L.; KAMINSKI, M.; KOZAK, R. H.; NDIAYE, P. M. Bioetanol, biodiesel e biocombustíveis. **IPEA. Boletim Regional, Urbano e Ambiental**. v.03, p.53-57, dez. 2009

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2011

MANDELS, M.; REESE, E. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Biology Branch, Pioneering Research Division, U. S. Army Quartermaster Research and Development Center**. v.73, p.269-278, 1956

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

MEDINA, D. A. P.; NÚÑEZ, M.F.A.; ORDOÑES, M.S. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. **Revista Tecnológica ESPOL - RTE**, n.23, v. 1, p. 81-8. 2010

MEHRNOUSH, A., MUSTAFA, S.; SARKER, M. I.; YAZID, A. M. M. Optimization of serine protease purification from mango (*Mangifera Indica* cv. Chokanan) peel in polyethylene glycol/dextran aqueous two phase system. **Int J Mol Sci**, v.13 p. 3636-3649, 2012

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v. 31 p. 4266-4268, 1959.

MOLINARI, H. B. C.; SILVA, A. S.; TEIXEIRA, R. S. S., BARCELOS, C. A.; PEREIRA JR, N.; BON, E. P. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. Matérias-primas sacarinas e lignocelulósicas para biorrefinarias. In: VAZ JÚNIOR, S.(org) **Biorrefinarias: cenários e perspectivas** Brasília, Embrapa Agroenergia, 2011. 176 p.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, n.5, p.9-23, 2009.

MORAES, I. O.; ARRUDA, R. O. M.; MORAES, R. O. Bioprodutos para agricultura orgânica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., Curitiba, 2007. **Anais...** Curitiba: 2007.

MOHAMADI, H.S.; OMIIDINIA, E. Purification of recombinant phenylalanine dehydrogenase by partitioning in aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B** 854, 273-278, 2007

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI,V.H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. **Process Biochem**. v.43, p.1293-1299, 2008

NEHETE, J. Y.; BHANBAR, R. S.; NARKHEDE, M. R.; GAWALI, S. R. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. **Pharmacogn Rev.** n.7, v.14, p.107–116, 2013

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 5nd, Artmed, 1273p., 2011.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BR AUN, R.. Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, p.49-58, 2002

NITSAWANG, S.; HATTI-KAUL, R.; KANASAWUD, P. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. **Enzyme Microb Tech.** n. 5, v.39, p.1103-1107, 2006

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, v.33, No.7, p.1549-1558, 2010

OHMIYA, K.; SHIMIZU, M.; TAYA, M.; SHIMIZU, S.; Purification and properties of cellobiosidase from *ruminococcus albus*. **J. Bacteriol**, v.150, p.407-409, 1982

ONOFRE, S. B.; SILVA, G.C.; MATTIELLO, S. P.; GROTH, D.; MALAGI, I. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus flavus* using solid state fermentation based on sugarcane bagasse. **American Journal of Biochemistry**, v.3, n.2, p.25-28, 2013

OOI, C.W.; TEY, B.T.; HII, S.L.; KAMAL, S. M. M; LAN, J. C. W; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochem** n.10, v.44, p.1083-1087, 2009

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v.77, p.149-162, 1999.

PARK, E.; KAHNG, J.; LEE, S.; SHIN, K. An anti-inflammatory principle from cactus. **Fitoterapia**, v.72 p.288-290, 2000

PANCERA, S. M.; SILVA, L.H.M.; LOH, W.; ITRI, R.; PESSOA JR., A.; PETRI, D.F.S. **Colloids Surf.B** v. 26 291–300, 2002

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In: **Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, p.45. 2008.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado técnico EMBRAPA, 2005**. Disponível em www.cnpat.embrapa.br/home/down/index.php?pub/cot_102.pdf. Acesso em 20 de julho de 2014.

PIROTA, R. D. P. B.; MIOTTO, L. S.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.30, n.01, p.117-123, January - March, 2013.

PORTO, T. S.; PESSÔA-FILHO, P. A.; NETO, B. B. FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L.; PESSOA, A. JR. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **J Ind Microbiol Biotechnol**. v.34, n.8 p.547-52, Aug. 2007

PRODANOVIC, J. M., ANTOV, M.G. The influence of molecular weight of polyethylene glycol on separation and purification of pectinases from penicillium cyclopium in aqueous two-phase system. **APTEFF**, 39,1-212, 2008

RAGHUWANSHI, S; DESWAL, D; KARP, M; KUHAD, R. C. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel*, n.124. p.183-189, 2014

RAJA, S; MURTY, V. R. THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR, V. RAMESH, V. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. **Science and Technology**, v.1, n.1, p. 7 -16, 2011.

RAJEEV, K. S.; REETA, R. S.; GINCY, M. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v.34, p.421-424, 2009.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004

SANDGREN, M. STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.89, p.246–291, 2005

SANTANA, R. S. M.; GONÇALVES, Z. S.; BONOMO, R. C. F; FRANCO, M. Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v.25, n.1, p.188-193, jan.-mar., 2012

SANTOS, D.T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C. PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semissólida em biotecnologia. **Janus**, Lorena, ano 3, n.4, p.164-182, 2006.

SANTOS, T. C.; AMORIM, G. M.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Determinação da atividade de CMCase e FPase da estipe fúngica *Rhizopus sp.* através da bioconversão do resíduo de seriguela (*Spondias purpurea* L.). **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**; n.13 v.3, p.145-9. 2011

SANTOS, S. F.; MELO, B. C. A.; LIMA, O. B. V. Estudo do enriquecimento protéico da palma forrageira do sertão pernambucano com foco para alimentação animal. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA (CONNEPI 2011), 12, 2011, Natal, RN. **Anais...** Natal, 2011. Disponível em: http://periodicos.ifsertaope.edu.br/ocs2/index.php/jinci/jinci_2011/paper/downloadSuppFile/191/226. Acesso em 25/02/2014.

SANTOS, T. C.; SOARES, G. A.; ROCHA, T. J. O.; FERREIRA, A. N.; PACHECO, C. S. V.; FRANCO, M. Quantificação da atividade de CMCase e FPase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Exatas on-line**. v.2, n.2, p.22-29, agosto, 2011

SANTOS, T. C.; FILHO, J. A.; ROCHA, T. J. H.; FONSECA, S. F.; FRAN, M. Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas. **Revista Verde** (Mossoró – RN), v.7, n.2, p 270-276, 2012

SANTOS, T. C. S.; FILHO, G. A.; ROCHA, T. J. H.; FERREIRA, A. N.; DINIZ, G. A.; FRANCO, M. Produção e quantificação de celulases por meio da fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais . **Scientia Agraria Paranaensis - SAP**, v.12, n.2, abr./jun., p.115-123, 2013

SARAVANAN, S.; RAO, J.R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly (acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, ph and temperature. **Process Biochem** . n.9, v.43, p. 905-911, 2008

SEIBOTH, B.; HAKOLA, S.; MACH, R.L.; SUOMINEN, P.; KUBICEK, C.P. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.5318-5320, 1997.

SHAHSAVARANI, H.; HASEGAWA, D.; YOKOTA, D.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; BOONCHIRD, C.; HARASHIMA, S. Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.115 n.1, p.20-23, 2013

SHARMA, S. KANWAR, S.S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. **The Scientific World Journal**. n.1, v. 2014, p. 1-15, 2014

SILVA, J. S. A.; SWARNAKAR, R. Preparo de extrato celulolítico do bagaço de caju in natura e seu uso na hidrolise enzimática da palma forrageira. in 1º CONGRESSO QUÍMICO DO BRASIL, de 29 de março a 1 de abril de 2010. IFPB. João Pessoa, PB. **Anais...** Disponível em: <http://aquimbrasil.org/congressos/2010/arquivos/T99.pdf>. Acesso em 01/05/2014.

SILVA, V. L.; COSTA, L.S; BASTOS, M. P. V.; FACURI, L. M. A. M; JÚNIOR, N. O. R.; SILVA, M. V. Caracterização físico-química e bioquímica do farelo de palma forrageira redonda (*Opuntia ficus*) utilizado na alimentação de ruminantes. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia - PUBVET**, Londrina, v.5, n.2, Ed.149, Art. 1002, 2011.

SILVA, C.A.S.; COIMBRA, J.S.R.; ROJAS, E.E.G.; MINIM, L.A.; DA SILVA, L.H.M. Partitioning of caseinomaclopeptide in aqueous two-phase systems, **J. Chromatogr. B** 858, 20, 2007.

SOHAIL, M.; SIDDIQI, R.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**. v.25, n.6 2009

SOMMERS W, VISSER J, ROMBOUTS FM, VAN'T RIET K. Developments in downstream processing of (poly)saccharide converting enzymes. **J. Biotechnol**; v.11, p.199–222. 1989.

SOUSA, C. A. B.; SILVA, F. L. H. CONRADO, L. S. Lixiviação de poligalacturonases obtidas pela fermentação semissólida da casca e albedo do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.16, n.7, p.790–794, 2012.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semissólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.9, p.987–992, 2010.

SUASSUNA, J. **Semi-Árido: proposta de convivência com a seca**, 2002. Website da Fundação Joaquim Nabuco. Disponível em: http://www.fundaj.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=659&Itemid=376 acesso em 19/02/2014.

SU, C.H., CHUNG M.H.;HSIEH, H. J.; CHANG,Y. K.; DING, J. C.; WU, H. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in ionic liquid media for fermentable sugar production. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.** v.43, n.4, p.573-577, July, 2012

SUKUMARAN, R. H.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy** v.34, p.421-424, 2009

TEIXEIRA, J. C.; EVANGELISTA, A. R; PEREZ, J. R. O; TRINDADE, I. A. C. M; MORON, I.R. (1999) Cinética da digestão ruminal da palma forrageira (*Nopalea cochenillifera* (L.) Lyons (*Cactaceae*) em bovinos e caprinos. **Ciência e Agrotecnologia** 23:179–186.

TIANWEI, T., QING, H., QIANG, L. Purification of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza uralensis* fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system. **Journal of Biotechnology Letters**, v.24, p.1417–1420, 2002.

TJERNELD, F.; PERSSON, I; ALBERTSSON, P. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. 1: partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p.1036-1043, 1985

TORRES NETO, A. B. **Estudo da pré-hidrólise ácida da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill)**. Campina Grande, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) UFCG, Campina Grande, 2010.

TOSTO, M. S. L.; ARAÚJO, G. G. L.; OLIVEIRA, R. L.; BAGALDO, A. R.; Composição química e estimativa de energia da palma forrageira e do resíduo desidratado de vitivinícolas. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.8, n.3, p. 239-249, 2007

UENOJO, M; PASTORE, G.M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** n.3, v.26, p.509 - 515 , 2006

VAZ JUNIOR, S. **Biorrefinarias: cenários e perspectivas**. Brasília, Embrapa Agroenergia, 176 p. 2011.

VICTOR, O.T.; OGBE, S. B.; ERIOLA.B.; KOLAWOLE, L. S.; BAMIKOLE A. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in saw dust, bagasse and corn cob. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.6, p.150–152, 2003

XU, F.; SUN, J. X.; LIU, C. F.; SUN, R. C. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 253-261, 2006.

YÜCEKAN, I.; ÖNAL.; S. Partitioning of invertase from tomato in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**. V.46, n.1, p.226–232. 2011

ZAMPIERI, D. **Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum***. Caxias do Sul, 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

ZHANG, J. **Protein-Protein Interactions in Salt Solutions, Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools**. Dr. Weibo Cai (Ed.), 2012. Disponível em : <http://www.intechopen.com/books/protein-protein-interactions-computational-and-experimental-tools/protein-protein-interactions-in-salt-solutions>. Acesso em 05/11/2013.

ZHANG, X.; ZHANG, F.; LUO, G.; YANG, S.; WANG, D. Extraction and separation of phycocyanin from spirulina using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **Journal of Food and Nutrition Research**, n.1, v.3, p. 15-19, 2015

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculants production. **Process Biochemistry**, v.33, n.8, p.323-329, 2000.

ZÚÑINGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V. COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.