

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EFEITO DA ADSORÇÃO E DA FILTRAÇÃO DURANTE A
PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Penicillium*
*echinulatum***

CARLA ELIANA TODERO RITTER

Caxias do Sul
2015

CARLA ELIANA TODERO RITTER

**EFEITO DA ADSORÇÃO E DA FILTRAÇÃO DURANTE A
PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Penicillium
echinulatum***

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de
Doutor em Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Co-orientadora: Prof. Dra. Mara Zeni Andrade**

Caxias do Sul

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

R614e Ritter, Carla Eliana Todero, 1972-
Efeito da adsorção e da filtração durante a produção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* / Carla Eliana Todero Ritter. – 2015.
147 f. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon. Co-orientação: Profa. Dra. Mara Zeni Andrade.

1. Enzimas. 2. Celulase. 3. Xilanase. 4. *Penicillium*. I. Título.

CDU 2.ed.: 577.15

Índice para o catálogo sistemático:

1. Enzimas	577.15
2. Celulase	547.458.8
3. Xilanase	547.455.526
4. <i>Penicillium</i>	582.282.123.2

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Paula Fernanda Fedatto Leal – CRB 10/2291

CARLA ELIANA TODERO RITTER

**EFEITO DA ADSORÇÃO E FILTRAÇÃO NA PRODUÇÃO DE
CELULASES E XILANASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

• Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Mara Zeni Andrade

TESE APROVADA EM 02 DE JUNHO DE 2015


Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon


Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Mara Zeni Andrade


Prof. Dr. Adriano Brandelli


Prof. Dr. Lademir Luiz Beal


Prof^a. Dr^a. Marli Camassola

*Dedico essa tese aos anjos que Deus me enviou, Guilherme e Natália,
e ao meu esposo, André Ritter*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a quem participou decisivamente no trabalho:

A Deus,

A minha família,

Ao Prof. Orientador Dr. Aldo José Pinheiro Dillon,

À Profa. Co-orientadora Dra. Mara Zeni,

À Profa. Dra. Marli Camassola,

Ao Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira,

Ao Prof. Dr. Lademir Luiz Beal,

À Dra. Roselei Claudete Fontana,

À Doutoranda Láisa dos Reis,

À MSc. Jocelei Duarte,

À Graduanda em Engenharia Química Kaliane Aver Regallin,

À Graduanda em Engenharia Química Jéssica Bonatto,

À Graduanda em Engenharia Química Rafaela Zortea,

Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassa e do Laboratório de Pesquisa de Química dos Materiais,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes),

Ao Prof. Dr. João Paulo Serejo Crespo da Universidade Nova de Lisboa (Portugal),

À Prof. Dra. Claudia Galinha da Universidade Nova de Lisboa (Portugal),

A todos que, por palavras, gestos ou pensamentos contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biomassas lignocelulósicas	3
2.2 Celulases e xilanases	5
2.2.1 Microrganismos produtores de celulases e xilanases	6
2.2.2 Processos de produção de celulases e xilanases	7
2.2.3 Fatores que influenciam na produção de celulases e xilanases	9
2.3 Processo de separação de mistura utilizando membranas e adsorventes	17
2.3.1 Uso de membranas para filtração	17
2.3.2 Uso de Adsorventes para remoção de componentes de uma mistura	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Microrganismo	31
3.2 Condições de cultivo	31
3.2.1 Meio sólido para crescimento e manutenção da linhagem	31
3.2.2 Meio para produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas em frascos agitados e biorreatores	31
3.2.3 Cultivos para pesquisa de repressão catabólica	32
3.2.4 Cultivos em biorreator com agitação mecânica	33
3.3 Determinação da produtividade volumétrica enzimática	34
3.4 Método de preparo de membranas tubulares e planas e de pellets	34
3.4.1 Preparo de membranas tubulares	34
3.4.2 Produção de membranas planas e ensaios a pressão reduzida	38
3.4.3 Preparo de pellets de PVDF contendo quitina e quitosana e ensaios de adsorção em cultivo submerso	40

3.5 Ensaio de retenção de proteínas do extrato enzimático e meio de cultivo a pressão reduzida	40
3.6 Caracterização das membranas tubulares	42
3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
3.6.2 Fluxo de água pura	42
3.6.3 Eficiência de retenção	42
3.6.4 Compactação das membranas	43
3.6.5 <i>Fouling</i>	43
3.7 Zimogramas para proteínas totais	44
3.8 Estudo da adsorção de glicose e enzimas por banho finito	44
3.9 Métodos analíticos para determinação de enzimas e proteínas totais	45
3.9.1 Determinação da atividade em papel de filtro (FPA)	45
3.9.2 Determinação de endoglicosidases	46
3.9.3 Determinação de β -glicosidases	46
3.9.4 Determinação de celobioidrolases	46
3.9.5 Determinação de xilanases	47
3.9.6 Determinação de proteínas totais	47
3.10 Análise estatística dos resultados	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares impregnadas com solução de PVDF e PA	49
4.2 Remoção por filtração de açúcares causadores de repressão catabólica durante produção de celulasas e xilanases	62
4.3 Adsorção de repressores catabólicos favorecem a produção de celulasas e xilanases em cultivo submerso por <i>Penicillium echinulatum</i>	75
4.4 Adsorção de repressores catabólicos durante a produção de celulasas e xilanases em biorreatores por <i>Penicillium echinulatum</i>	90
4.5 Incremento na produção de celulasas e xilanases através da remoção de açúcares por nanofiltração	107
4.6 Nanofiltração na remoção de inibidores de celulasas durante cultivo submerso de <i>Trichoderma reesei</i>	117
5 DISCUSSÃO GERAL	130
6 CONCLUSÃO E SUGESTÕES	132

6.1 Conclusões	132
6.2 Sugestões	133
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura de material lignocelulósico	3
Figura 2. Representação do sinergismo de ação de celulases nas estruturas amorfas e cristalinas da celulose.	5
Figura 3. Modelo de indução de celulases em <i>Penicillium purpurogenum</i> .	16
Figura 4. Modelos de biorreatores com módulo externo (A) e interno (B) de membranas para tratamento de efluentes.	22
Figura 5. Classes e subgrupos de classificação das isotermas.	28
Figura 6. Processo de adsorção.	30
Figura 7. Fluxograma do sistema de compactação de membranas tubulares cerâmicas.	38
Figura 8. Fluxograma das etapas e condições utilizadas no preparo das membranas de PVDF.	39
Figura 9. Membranas planas de Psf 17% (1,5μm); Psf 17% (0,4μm).	39
Figura 10. Sistema a vácuo para filtração de extrato enzimático (A) e membrana tubular com protetor (B) e sistema de filtração em sistema crossflow utilizando bomba peristáltica para circulação do emio e bomba a vácuo paa remoção do permeado (C).	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual de material lignocelulósico.	4
Tabela 2. Comparação das características do cultivo no estado sólido (FES) e do cultivo submerso (FS).	8
Tabela 3. Indução de celulases em <i>Trichodema viride</i>.	10
Tabela 4. Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a atividade enzimática.	10
Tabela 5. Produção de xilanases por diversos microrganismos em diferentes substratos em cultivos no estado sólido.	12
Tabela 6. Diferentes fontes de nitrogênio empregadas na produção de xilanases por <i>Chaetomium thermophilum</i> em meio contendo 1% (m/v) de palha de trigo como fonte de carbono.	14
Tabela 7. Caracterização dos processos com membranas	18
Tabela 8. Polímeros mais usados na produção de membranas, sua morfologia e aplicação.	20
Tabela 9. Parâmetros de operação para membranas poliméricas usadas em ultrafiltração.	21
Tabela 10. Materiais adsorventes e suas aplicações.	26
Tabela 11. Métodos de impregnação de membranas tubulares cerâmicas (alumina).	36
Tabela 12. Método de impregnação de membranas tubulares poliméricas (suporte de polipropileno).	37
Tabela 13. Membranas planas e PVDF, PA66 e Psf em ensaio a pressão reduzida com extrato enzimático contendo celulases e xilanases.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AR: açúcares redutores

BG: β -glicosidase

CBH: celobiohidrolase

CMC: carboximetilcelulose

CS: cultivo submerso

DNS: ácido 3,5-dinitrossalicílico

EC: *Enzyme Comission*

EG: endoglicanase

FPA: atividade enzimática sobre papel-filtro (atividade celulásica total)

PA: poliamida

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PVDF: polifluoreto de vinilideno

p-NPG: p-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfonato de sódio

RESUMO

A produção de enzimas do complexo celulases e de xilanases se destaca no cenário mundial, pois estas são importantes para a geração de biocombustíveis, resinas, álcoois, xilitol, sorbitol, e para a indústria de detergentes e ração animal e processos de biobranqueamento, extração de óleos, pigmentos e essências a partir de biomassa lignocelulósica. A secreção e produção destas enzimas são afetadas pela repressão catabólica, devido à presença da glicose liberada. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito sobre a produção enzimática de *Penicillium echinulatum* de metabólitos e açúcares durante o cultivo submerso. As estratégias utilizadas para a remoção de substâncias do meio de cultivo incluíram filtração e uso de *pellets* com adsorventes e uso de filmes adsorventes. O preparo de membranas de suporte cerâmico e polimérico, impregnadas com os polímeros poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) e poliamida (PA), foi realizado por inversão de fases, sendo que a membrana cerâmica impregnada com solução 10% (m/v) de PVDF (C1) reteve 88% da proteínas totais da solução enzimática. A remoção de 10 ou 20% do permeado durante a filtração com membranas planas, em períodos de tempo entre 8h e 24h, resultou em aumento da atividade de β -glicosidase e endoglicanase em frascos Erlenmeyer. Com relação à atividade de xilanases, os títulos observados no 4º dia foram entre 40% e 30% superiores quando houve a filtração em 42 e 44 h, respectivamente. Quando adsorventes foram utilizados em biorreator, a atividade de endoglicanase, CBH e xilanase apresentaram um aumento de 50%, 43% e 12%, respectivamente, em meio concentrado utilizando carvão ativado quando comparado ao padrão. Os ensaios com membranas de nanofiltração permitiram retenção de 95% das enzimas do complexo e, quando utilizadas na remoção de 10% e 20% da fase líquida em frascos, resultaram em aumento na atividade enzimática. Os ensaios 18/20, 24/10, 24/20, 44/10 e 44/20 (tempo de processo, em horas, em que foi feita a filtração / volume percentual de permeado removido) apresentaram, em média, em 72 h, um incremento de 33% na atividade de endoglicanase, enquanto o ensaio 44/20, em 96h, apresentou atividade superior a 40% do padrão. Para os cultivos com *Trichoderma reesei* Rut C30, os ensaios com filtração de 10 % do volume dos frascos, em 12 h e 20 h apresentaram aumento da atividade de FPA, em 60 h de cultivo, de 15% e 11%, respectivamente. Nos mesmos ensaios, a atividade de endoglicanase apresentou incremento de 40,7% e 52,2%, respectivamente, demonstrando o efeito positivo da remoção de 10% de permeado sobre a produção enzimática. Já para FPA, o aumento representou 15% e 11 % para as mesmas condições.

ABSTRACT

Cellulases and xylanases enzymes complex production stands out in the world because these enzymes are important for the generation of biofuels, resins, alcohols, xylitol, sorbitol, and for the detergents industry, animal feed, pulp bleaching, and in the extraction of oils, pigments and essences from lignocellulose biomass. Secretion and production of cellulases and xylanases are affected under catabolic repression conditions due to glucose release. The purpose of the present study was to verify the effect on enzymatic production of *Penicillium echinulatum* compared to metabolites and sugars during submerged cultivation. The strategies used for the substances removal from the medium included filtration application, the use of *pellets* with adsorbents, and the use of adsorbents films. Membranes preparation from both ceramic and polymeric supports impregnated with polymers PVDF and PA were performed by phase inversion method, and eventually the ceramic membrane impregnated with solution 10% (w/v) of PVDF (C1) held 88% of the total proteins from the enzymatic solution. The removal consisting in 10% or 20% from the permeate during filtration with flat membranes, in periods between 8h and 24h resulted in a rise in the activity regarding β -glucosidase and endoglucanase in Erlenmeyer flasks. In relation to xylanases activity, the titles observed on the fourth day were between 40% and 30% superiors when filtration was made in 42 and 44h, respectively. Subsequently, when adsorbents were used in the bioreactor, activity involving endoglucanase, CBH and xylonase increased 50%, 43% and 12% respectively, in concentration applying activated charcoal comparable to standard source. Moreover, tests performed with nanofiltration membranes allowed 95% retention of the enzymes from the complex, and when they were used in the removal consisted of 10% and 20% in liquid phase in flasks, results showed a rise on the enzymatic activity. The tests 18/20, 24/10, 24/20, 44/10 and 44/20 (in relation to filtration day and volume permeated) presented, on average, in 72 hours, a 33% increment in the endoglucanase activity and, in 96 hours, the test 44/20 presented activity superior to 40% from standard value. Therefore, for tests with *Trichoderma reesei* Rut C30, filtration experiments with 10% of the volume of the flasks in 12h and 20 h presented an increase in FPA activity, and in 60 h, the amount found was 15% and 11%, respectively. Subsequently, for endoglucanase enzyme, the activity presented increment levels evaluated in 40,7% and 52, 2% respectively for the mentioned tests, demonstrating the positive factor of the permeate 10% removal from the enzymatic production. Lastly, for FPA the rise represented 15% and 11% in the same test conditions.

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é considerada uma fonte inesgotável de matéria-prima de baixo custo para a produção de açúcares. Entretanto, a disponibilidade de enzimas eficientes e econômicas é um dos gargalos em processos industriais que utilizam os xaropes de glicose, para operações e conversões como a fermentação, a oxidação, a desidratação e a polimerização.

Celulases e xilanases são enzimas que apresentam aplicações em diversos segmentos industriais dentre eles o processamento de bebidas, biopolimento (desfibrilação de tecidos de algodão), produção de antioxidantes, bioestonagem (amaciamiento de tecidos), na indústria de polpa de papel e celulose, produção de biocombustíveis, como o etanol. Além do etanol, o produto da hidrólise de material lignocelulósico pode ser utilizado como fonte de carbono para a obtenção de outros produtos como 2,3-butanodiol, xilitol, ácido maleico, ácido acrílico, poliésteres, resinas e antioxidantes.

Na indústria de polpa de papel, a enzima xilanase remove a xilana proveniente do complexo carboidrato-lignina, reduzindo o consumo de produtos à base de cloro, que causam impacto ambiental. As formulações com xilanases para rações animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes das fibras de hemicelulose que não foram degradadas ou liberar nutrientes que permaneceram bloqueados por estas fibras. Isto resulta na diminuição da viscosidade, possibilitando uma utilização mais eficiente do alimento.

Entre os microrganismos produtores de enzimas (celulases e xilanases), encontram-se linhagens de fungos selecionadas dos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Thermonospora* e *Aspergillus* e de bactérias: *Bacillus*, *Clostridium*, que produzem composições enzimáticas com grande potencial para a degradação de lignocelulósicos em monômeros fermentescíveis. Entretanto, a produtividade das enzimas ainda pode ser melhorada ao nível do processo ou da genética da linhagem, no sentido de reduzir a repressão catabólica, que é um mecanismo natural do microrganismo, durante o crescimento, que impede que altas atividades enzimáticas sejam atingidas, em função da liberação de açúcares de rápido metabolismo, como a glicose.

Além da repressão catabólica há o efeito inibitório produzido pela glicose e celobiose. A inibição da celobiose pode ser minimizada com a adição de β -glicosidase, ao convertê-la em glicose, durante a hidrólise. Entretanto, sabe-se que a adição dessa enzima

acarreta aumento no custo do processo e que a mesma também é inibida na presença de glicose e celobiose.

Uma alternativa que pode ser viável para reduzir a repressão catabólica e a inibição enzimática é o uso de membranas em processo de filtração como nanofiltração e ultrafiltração durante o cultivo submerso para remoção de inibidores enzimáticos e repressores catabólicos. Essa alternativa possibilitaria a operação em regime contínuo, que em tese reduziria a repressão catabólica e, conseqüentemente, o aumento na produtividade volumétrica, com reflexos positivos na redução no custo de produção de enzimas.

O uso de adsorventes para a remoção de açúcares pode ser outra estratégia a ser considerada, visto que a energia envolvida no processo de adsorção é mínima e o processo posterior de dessorção física possível. A adsorção física reversível desses açúcares inibidores pode contribuir para a redução da concentração de glicose e celobiose livres no meio, reduzindo o efeito da repressão catabólica e, ao ser removido e realizado o processo de dessorção, os açúcares podem ser utilizados na produção de bioprodutos diversos.

A partir do exposto, a presente tese teve como objetivo geral analisar o efeito da remoção de metabólitos e açúcares, que possam agir como repressores catabólicos, durante a produção de enzimas hemicelulolíticas por *Penicillium echinulatum*.

Os objetivos específicos da tese foram:

- produzir enzimas lignocelulolíticas em cultivo submerso, utilizando biorreator com agitação mecânica empregando celulose cristalina como substrato indutor;
- produzir membranas tubulares e caracterizá-las em relação ao fluxo, retenção e seletividade;
- impregnar suportes cerâmicos tubulares a fim de produzir membranas para remoção de metabólitos repressores;
- comparar cinética de produção enzimática em biorreatores com os ensaios utilizando sistema de membranas tubulares na remoção de inibidores;
- verificar a influência de mecanismos de adsorção de inibidores em ensaio de banho finito com adsorventes em *pellets* e *in natura*, durante cultivo submerso em frascos sob agitação e em biorreator de mistura completa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassas lignocelulósicas

As biomassas lignocelulósicas constituem fontes de carboidratos mais abundantes na natureza. O termo estrutura lignocelulósica está relacionado à parte do vegetal que forma a parede celular. Os lignocelulósicos podem estar disponíveis sob a forma de resíduos agrícolas, agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras. A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem, da espécie da planta, da região de cultivo, da idade, do período da colheita do material, entre outros fatores (Santos *et al.*, 2009).

Essas biomassas possuem um alto conteúdo de carboidratos constituindo-se em uma fonte abundante e renovável de matéria-prima que pode ser utilizada em bioprocessos. Como representado na Figura 1, os lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas basicamente de celulose e hemicelulose, entremeadas por macromolécula composta por fenol, a lignina, que se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio. Em menores proporções podem ser encontradas também resinas, taninos, ácidos graxos, fenóis, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, de potássio e de magnésio. (Lee, 1998).

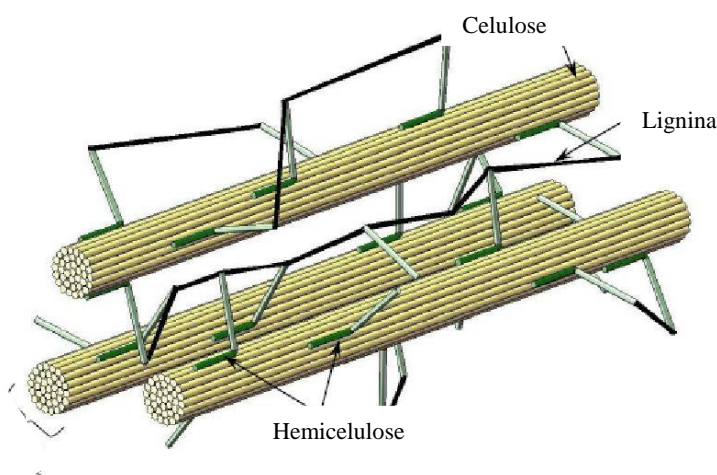


Figura 1. Representação da estrutura de material lignocelulósico (www.intechopen.com)

A celulose, maior constituinte da parede celular das plantas, é um homopolissacarídeo linear composta por unidades de β -D-glicose (Zhang *et al.*, 2012).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo constituído por unidades de pentoses e hexoses, que também apresentam um grande potencial biotecnológico. Sua estrutura é constituída por principalmente xilose e diferentes moléculas de sacarídeos como manose, glicose, arabinose, galactose e alguns ácidos orgânicos. Destes açúcares, os que merecem destaque são a glicose e a xilose que vem recebendo notória atenção em processos de produção de etanol e adoçantes (Bhat, 2000).

Entre as unidades de pentoses e hexoses que formam a estrutura da hemicelulose destacam-se a β -D-manose, β -D-glicose, α -L-arabinose, α -D-galactose e principalmente, β -D-xilose, em proporções que dependem da origem do material lignocelulósico. Adicionalmente, podem ser encontrados ácidos como β -D-glucurônico, β -D-galactourônico e α -D-4-O-metilglucurônico, e alguns grupos acetil (Caramenz, 1999).

A lignina, composto responsável pela rigidez e resistência da parede celular dos vegetais, é uma macromolécula formada pela polimerização de três álcoois isoaromáticos: trans-coniferílico, trans-p-cumárico e trans-sinapílico. É convencionalmente definida como uma rede hidrofóbica complexa de unidades fenilpropanoídicas derivadas da polimerização oxidativa destes três álcoois precursores (originados por metoxilação do ácido p-hidroxicinamílico), que dão origem as subunidades p-hidroxifenil, guaiacil e siringil. Esses precursores podem se ligar a diversos sítios, formando um complexo polimérico com grande variedade de ligações intermoleculares. (Han & He, 2010; Lemos, 2001).

Na Tabela 1, (Castro & Pereira Jr., 2009) são apresentadas as composições de celulose, hemicelulose e lignina de vários lignocelulósicos, indicando que estes componentes podem variar as suas proporções conforme a origem.

Tabela 1. Composição percentual de material lignocelulósico.

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana	36	28	26
Palha de cana	36	21	36
Palha de milho	36	28	26
Palha de trigo	39	36	10
Farelo de cevada	23	33	21
Casca de arroz	36	20	19
Capim elefante	32	30	9

Fonte: Castro & Pereira Jr. (2009).

2.2 Celulases e xilanases

Celulases são complexos enzimáticos secretados por microrganismos como fungos e bactérias, podendo também estar presentes no sistema digestório de gastrópodes. Este complexo pode liberar glicose do polissacarídeo celulose que é composto de unidades de β -D-glicose, presente principalmente nas células vegetais, como constituinte da parede celular. (Mansfield *et al.*, 1999).

Três são os componentes majoritários do sistema enzimático das celulases: endo- β -1,4-glicanase (EG I, EG II, EG III e EG V; EC 3.2.1.4), que hidrolisa ao acaso ligações glicosídicas em fibras de celulose; exo- β -1,4glicanase (celobioidrolases: CBH I e CBH II; EC 3.2.1.91), que age sobre extremidades reductoras e não reductoras de polímeros liberando principalmente celobiose, e β -1,4 glicosidase (BG I e BG II; EC 3.2.1.21), que hidrolisa oligossacarídeos e converte celobiose a glicose (Figura 2). Existe uma ação sinérgica, na qual a ação de duas ou mais enzimas combinadas é maior que a soma das atividades individuais. Este sinergismo depende da natureza do substrato, afinidade do componente celulase com o substrato, concentração da enzima e proporção entre os componentes enzimáticos (Narra *et al.*,2012; Valencia & Chambergo, 2013

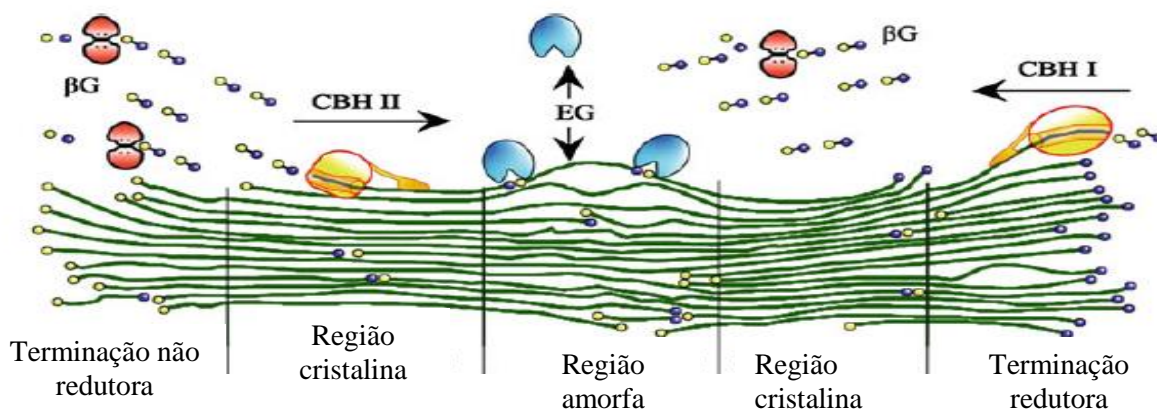


Figura 2. Representação do sinergismo de ação de celulases nas estruturas amorfas e cristalinas da celulose. CBHI e CBHII- celobioidrolases; EG- Endoglicanases; β G- β -glicosidases (Wang *et al.*, 2012).

As xilanases atuam no componente hemicelulose da parede celular dos vegetais; conhecidas como 1,4- β -D-xilana-xilano-hidrolases (EC 3.2.1.8) constituem um grupo de enzimas produzidas por fungos, leveduras e bactérias e são aplicadas na indústria de alimentos para animais, no processamento de alimentos e na indústria de polpa de papel

(Xiong *et al.*, 2005). Na indústria de polpa de papel, a xilanase remove a xilana proveniente do complexo carboidrato-lignina, reduzindo o consumo de produtos à base de cloro, que causam grande poluição ambiental (Bhat, 2000; Mello-de-Souza, 2011).

Este sistema enzimático é composto particularmente pelas enzimas: β -1,4-Endoxilanases (1,4- β -D-xilana xilohidrolases; EC 3.2.1.8) que clivam as ligações internas glicosídicas da cadeia principal da heteroxilana, diminuindo o grau de polimerização do substrato. A clivagem do substrato não é ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato (comprimento e/ou grau de ramificação) e também da presença de substituintes (Lin *et al.*, 2000). Assim, as endoxilanases podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o produto final da reação: as que catalisam a hidrólise nos pontos de ramificação 1,3- α -1-arabinofuranosil de arabinoxilanas em adição à hidrólise das ligações da cadeia principal, e aquelas que não hidrolisam estes pontos de ramificação (Matsuo *et al.*, 1998; Rizzatti, 2004; Czjzek *et al.*, 2005).

As β -D-xilosidases (β -D-xilosídeo xilohidrolases; EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos e xilobiose, a partir da extremidade não redutora, liberando xilose (Kumar & Ramom, 1996; Matsuo *et al.*, 1998; Lenartovicz, 2003; Rizzatti, 2004; Czjzek *et al.*, 2005). Estas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais como p-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (Andrade, 2002; Rizzatti, 2004). As β -D-xilosidases apresentam uma massa molecular de 60 a 360 kDa sendo geralmente glicoproteínas. Elas possuem pH ótimo entre 4,0 e 5,0, e as temperaturas ótimas podem variar entre 40°C a 80°C, dependendo do microrganismo estudado (Polizeli *et al.*, 2005).

2.2.1 Microrganismos produtores de celulases e xilanases

As bactérias *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* (Singh *et al.*, 1992) e as espécies fúngicas *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Schizophyllum* (Prasad *et al.*, 2007) podem produzir celulases. Algumas espécies microbianas, tais como *Neurospora*, *Monilia*, *Paecilomyces* e *Fusarium* foram relatadas para manter a capacidade de fermentar a celulose diretamente para o etanol, por sacarificação simultânea e fermentação. (Lynd *et al.*, 2005).

Mutantes de *P. echinulatum* são capazes de secretar enzimas com atividade sobre papel de filtro de 2 IU.mL⁻¹ em meio contendo 1% de celulose como fonte de carbono (Camassola & Dillon, 2007b; Camassola & Dillon, 2010). Esta linhagem apresenta

termoestabilidade de FPA e β -glicosidase a 50°C e 55°C, respectivamente, o que torna o seu uso atrativo para a indústria (Camassola *et al.*, 2004).

Também foi caracterizado um grande grupo de procariotos termófilos, incluindo duas espécies aeróbias de *Rhodothermusmarinus* e de *Acidothermus cellulolyticus* capazes de produzir celulasas e um numeroso grupo de anaeróbios dos gêneros *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Spirochaeta* e *Fervidobacterium*. Também membros do grupo *Caldicellulosiruptor*, isolados na Nova Zelândia e Califórnia, extremamente termófilos, celulolíticos e não esporulados fermentaram diferentes tipos de carboidratos (Miroshnichenko *et al.*, 2008). Celulasas termoestáveis com grande potencial hidrolítico foram produzidas por *Geobacillus* sp.R7. Este microrganismo produziu etanol a partir de fermentação de lignocelulósicos em uma única etapa (Grogan, 1991; Zambare *et al.*, 2011).

2.2.2 Processos de produção de celulasas e xilanases

A produção de celulasas por microrganismos pode ocorrer em cultivo no estado sólido (CES) ou cultivo submerso (CS), cuja diferenciação refere-se ao teor de água presente no meio reacional. Na FES há ausência ou quase ausência de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se complexada com a matriz sólida de substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas. Em geral, nesses processos, o teor de umidade varia entre 30-85%, mimetizando condições encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é pouco provável (Castro & Pereira Jr., 2010). A Tabela 2 apresenta as características do cultivo em estado sólido e do cultivo submerso.

Para a produção de uma determinada enzima microbiana, é de grande importância a formulação de um meio efetivo, de baixo custo e que permita a manutenção e o crescimento do microrganismo. Neste meio devem estar presentes os elementos básicos e indispensáveis para metabolismo microbiano. Deste modo, elementos como carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e cálcio, além de ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês e molibdênio, são todos requeridos pelos microrganismos e devem estar presentes no meio. (Smits *et al.*, 1996).

Tabela 2. Comparação das características do cultivo no estado sólido (CES) e do cultivo submerso (CS).

CES	CS
- Maior gama de produtos obtidos e de microrganismos aptos a crescer nessas condições	- Maior demanda energética associada à esterilização do meio e à remoção de produtos do meio fermentado
- Menor possibilidade de contaminação	- O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle de temperatura
- O extrato obtido é em geral três a quatro vezes menos diluído que no CS; produtividade e concentração final de produtos são maiores na CES	- Altas concentrações de substrato produzem problemas de reologia.
- Maior dificuldade no controle do processo e na adição de soluções desejadas	- Processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema
- Menor volume de resíduos líquidos produzidos	- Tecnologias de monitoramento de variáveis online mais amplamente disponíveis.

Fonte: Adaptado de Castro & Pereira Jr. (2010).

Reatores com agitação mecânica são os mais amplamente empregados em cultivos microbianos, constituindo cerca de 90% do total de reatores utilizados industrialmente (Schmidell & Facciotti, 2001). Embora sejam os mais utilizados, os biorreatores com agitação mecânica não são os mais adequados para cultivos de fungos filamentosos devido à taxa de cisalhamento causada pela agitação das turbinas (Ganesh *et al.*, 2000; Chipeta *et al.*, 2008).

Outro tipo de biorreator utilizado para produção de enzimas e bioprodutos é o *airlift*. Biorreatores *airlift* possuem o volume de líquido dividido em duas zonas distintas, nas quais somente uma recebe a injeção de ar, o *riser* (Chisti, 1989).

Gluzcs & Michalski (1994), em estudo com *A. niger* em biorreator *airlift*, observaram aumento na biomassa fúngica e uma significativa influência nas propriedades reológicas do meio. Também observaram aumento na viscosidade, afetando fortemente a dissolução do oxigênio no meio.

Ahamed & Vermette (2010) verificaram um aumento na atividade de FPA em cultivo submerso com culturas mistas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em meio contendo 5% (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) de extrato de levedura. A atividade máxima sobre papel-filtro, em meio contendo somente *A. niger*, foi de 3,4 U.mL⁻¹, enquanto que o cultivo com ambas as linhagens mostrou 7,1 U.mL⁻¹. Nesta situação, a produtividade volumétrica para o cultivo misto foi de 1,9 vezes superior ao monocultivo com *A. niger*. Para

a atividade de endoglicanase, também se observou aumento na produtividade volumétrica enzimática, 1,5 vezes superior ao monocultivo.

Visando a otimização da aeração e agitação para melhorar a produção de xilanase por *Streptomyces* sp. Ab106, Techapun *et al.* (2003) estudaram a influência do tempo de adição do meio em cultivo submerso com resíduos agrícolas. Verificaram que a adição sucessiva de três ciclos causa lise celular, indicando o uso de reator *airlift*, uma vez que a alta taxa de agitação altera a morfologia do microrganismo e há alta produtividade no segundo ciclo quando comparada com o inicial, sendo a atividade final e a inicial 32 e 15 UI.mL⁻¹, respectivamente. Também, segundo os autores, a aplicação de planejamento experimental proporcionou uma produção máxima de xilanase de 16 IU.mL⁻¹ a 150 rpm e fluxo de ar de 1vvm (volume de ar por volume de meio por unidade de tempo).

2.2.3 Fatores que influenciam na produção de celulases e xilanases

Os componentes e a concentração do meio de cultivo são fatores determinantes na produção enzimática. Na formulação de um meio de cultivo para a produção de celulases, deve-se evitar a repressão catabólica – que resulta na inibição da síntese de enzimas – o que pode ser realizado pela substituição de fontes facilmente metabolizáveis por carboidratos complexos, como a celulose. (Chahal, 1985; Delabona *et al.*, 2012).

a) Influência das fontes de carbono

A síntese de celulases pode ser induzida por diversos oligo e dissacarídeos (Hrmova *et al.*, 1996). Celulose e componentes celulósicos presentes nos resíduos lignocelulósicos são essenciais para a formação de RNAm de enzimas do complexo celulolítico. A glicose, por outro lado, reprime a síntese de celulases pelo mecanismo de repressão catabólica, cujo controle ocorre ao nível de transcrição (Beguin, 1990).

Verifica-se a partir da Tabela 3 que as fontes insolúveis de celulose, como *Solka floc* (polpa de celulose), algodão e papel de filtro, são indutores de celulases. A sofrorose (2-0-β-D-glicopiranosil-D-glicose) é um indutor que proporciona elevada atividade celulolítica, enquanto o amido, a glicose e o glicerol não atuam como indutores destas enzimas (Mandels & Weber, 1969).

Tabela 3. Indução de celulases em *Trichodema viride*.

Substrato Indutor	Enzimas induzidas		
	(C1)**	(CX)*	C1/CX
Tira de algodão	8,8	4,3	2,0
Tecido de algodão	10,0	8,3	1,2
Solka floc (celulose microcristalina)	8,8	10,3	0,9
Papel de filtro	7,0	8,5	0,8
Celobiose	2,5	3,8	0,7
Soforose	12,00	28,00	0,4
Lactose	1,0	4,8	0,2
Glicose	0,0	0,0	0,0
Amido	0,0	0,0	0,0
Glicerol	0,0	0,0	0,0

*Endoglicanase (CX): mg de glicose liberadas de 0,5% (m/v) de carboximetilcelulose, durante 30 minutos a 50°C pelo filtrado enzimático.

**Exoglicanase, Endoglicanase e β -glicosidase (C1): mg de açúcares redutores liberados de 2,5% (m/v) de algodão, após 24 h a 50°C.

Fonte: Mandels & Weber (1969).

Klepacova *et al.* (2003) pesquisaram a utilização de glicerol como substrato para produção de enzimas celulolíticas para a indústria de alimentos, bebidas e cosméticos. Ilmen *et al.* (1997) identificaram que a fonte de carbono glicerol é considerada neutra, não apresentando comportamento indutor ou repressor, mas que, quando utilizada em presença de celobiose, soforose ou celulose, induz a síntese de celulases. Zampieri *et al.* (2013) verificaram que a utilização de glicerol como fonte de carbono possibilitou a produção de endoglicanases por *P. echinulatum*.

Os dados apresentados na Tabela 4 indicam que diferentes fontes de celulose resultam em variação na secreção de CMCase e FPU para *Penicillium funiculosum*. Ainda, pode-se verificar que o algodão e o bagaço de cevada, quando tratados com álcalis, aumenta sua capacidade de indução de celulases; porém, o mesmo não foi verificado para o papel *Whatman* n°1.

Algumas fontes de carbono como vimos agem como indutoras de celulases, enquanto que outras agem como inibidoras. Em meio formulado com 0,5% (m/v) de sacarose e celulose, como fontes de carbono, verificou-se que a produção de celulases por *P. echinulatum* não é inibida (Dillon *et al.*, 2011).

Tabela 4. Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a atividade enzimática.

Fonte de carbono	Atividades enzimáticas			
	8° dia		12° dia	
	CMCase (U.mL ⁻¹)	FPU (U.mL ⁻¹)	CMCase (U.mL ⁻¹)	FPU (U.mL ⁻¹)
Substrato celulósico				
*CP-100	10,0	1,3	13,3	1,4
*CP-123	10,0	0,9	8,7	1,1
<i>Solka floc</i> -SW40	5,0	0,7	0,5	1,2
<i>Solka floc</i> -BW200	4,5	0,5	8,7	1,2
<i>Avicel</i> PH105	7,3	1,0	8,0	0,8
Algodão	1,5	0,1	1,5	0,1
Sal sódico de CMC	2,3	0,2	2,3	0,2
Papel <i>Whatman</i> n°1	0,7	0,1	0,8	0,1
Bagaço de cevada	0,8	0,1	0,7	0,1
Substratos tratados com álcalis				
Algodão	2,7	0,4	4,0	0,5
Bagaço de cevada	3,6	0,3	3,7	0,3
Papel <i>Whatman</i> n°1	0,7	-	2,8	0,3

O meio utilizado correspondeu aos sais de Mandels & Reese (1957) acrescidos de 0,05% (m/v) de extrato de levedura, 0,125% (m/v) de peptona, 1% (m/v) de farelo de arroz e 2,5% (m/v) de substrato celulósico. O microrganismo empregado foi o mutante de *Penicillium funiculosum* UV-49.

*CP-100 e CP-123 são celuloses de diferentes granulometrias.

Na Tabela 5, estão apresentados os resultados obtidos em diversos estudos para a produção de xilanases em cultivos no estado sólido. De acordo com os títulos enzimáticos apresentados, constata-se que a palha de trigo foi o substrato que possibilitou os melhores resultados para *Thermoascus aurantiacus*, enquanto para *Myceliophthora* sp., o farelo de arroz possibilitou os maiores títulos enzimáticos.

Ao mesmo tempo em que a celulose e os resíduos lignocelulósicos são favoráveis para a produção de celulasas e xilanases, estas substâncias tornam o meio de cultivo muito viscoso, situação que dificulta a transferência de oxigênio, acarretando em diminuição no crescimento. Diante deste problema, o emprego de fontes solúveis, que não dificulte a transferência de oxigênio em cultivos submersos, torna-se mais atrativo. No entanto, fontes solúveis como mono e dissacarídeos, muitas vezes, desencadeiam repressão catabólica (Andric *et al.*, 2010).

Andreotti *et al.* (1980) observaram que soro de leite, quando utilizado em culturas contínuas do *T. reesei* MCG80, induz altos títulos de FPU (1,29 U.mL⁻¹). Porém, Sehnem *et al.* (2006) verificaram baixos títulos de FPA (0,1 U.mL⁻¹) em meios contendo somente lactose, utilizando *P. echinulatum*. No entanto, meios formulados com celulose e lactose e

somente com celulose apresentaram FPA similar (1,5 U.mL⁻¹), sugerindo a possibilidade de reduções de até 75% da concentração de celulose no meio de cultivo.

Tabela 5. Produção de xilanases por diversos microrganismos em diferentes substratos em cultivos no estado sólido.

Microrganismo	Substrato	Xilanase (U.g ⁻¹)	Referência
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Palha de trigo	6.193	Kalogeris <i>et al.</i> (1998)
<i>T. aurantiacus</i>	Palha de trigo	4.490	Kalogeris <i>et al.</i> (2003)
<i>T. aurantiacus</i>	Bagaço de cana de açúcar (BCA)	2.700	Souza <i>et al.</i> (1999)
<i>T. aurantiacus</i>	BCA	1.597	Milagres <i>et al.</i> (2004)
<i>Myceliophthora</i> sp.	Farelo de arroz	900,2	Badhan <i>et al.</i> (2007)
<i>Myceliophthora</i> sp.	Palha de trigo	656,6	Badhan <i>et al.</i> (2007)
<i>Myceliophthora</i> sp.	BCA	620,1	Badhan <i>et al.</i> (2007)
<i>Myceliophthora</i> sp.	Sabugo de milho	411,6	Badhan <i>et al.</i> (2007)
<i>Trichoderma viride</i> TS	Polpa de beterraba	200	Grajek & Gervais (1987)
<i>Myceliophthora</i> sp.	Farelo de trigo	128,9	Badhan <i>et al.</i> (2007)
<i>Aspergillus awamori</i>	Engaço de videira	38	Botella <i>et al.</i> (2007)

Jørgensen *et al.* (2003), analisando o crescimento e a produção de enzimas em meios com monossacarídeos - glicose, frutose, manose, galactose, xilose e arabinose - em três espécies de *Penicillium* (*P. pinophilum* IBT 4186, *P. persicinum* IBT 13226 e *P. brasilianum* IBT 20888), verificaram que todas foram capazes de utilizar os monossacarídeos, embora a metabolização da arabinose tenha sido lenta. A glicose reprimiu a produção de endoglicanases, endoxilanases e β -xilosidases. Após o consumo da glicose, os fungos começaram a produzir β -glicosidase e endoglicanases. A xilose não causou repressão na produção de enzimas e induziu a produção de endoxilanases e β -xilosidases.

Ritter *et al.* (2013a) estudaram o comportamento do crescimento da biomassa e a produção de celulasas e xilanases em biorreatores *airlift* de circulação interna e em de mistura completa, utilizando *P. echinulatum* 9A02S1 em meio contendo sorbitol como fonte de carbono solúvel, além de celulose. Em seus ensaios, constataram que a produção de celulasas foi maior em biorreator *airlift* em processo de batelada alimentada. Em trabalho complementar, Ritter *et al.* (2013b) aperfeiçoaram essa produção ajustando as fontes de carbono ao tempo de adição de celulose.

Takao *et al.* (1985) observaram que a combinação de celobiose-octaacetato - 0,6% (m/v) - e Avicel - 0,4% (m/v) - apresentou efeito sinérgico na indução de celulasas em *Penicillium purpurogenum*. Ainda, oligossacarídeos derivados direta ou indiretamente da

celulose, tal como celobiose (Fritscher *et al.*, 1990; Ilmén *et al.* 1997), provocam a expressão dos genes das celulases em *T. reesei*. Além disso, *T. reesei* cresce na presença de alguns dissacarídeos, tais como δ -celobiono-1,5-lactona, gentilbiose, lactose e xilobiose, que também induzem a expressão de genes de celulases (Vaheri *et al.*, 1975; Durand *et al.*, 1988; Margolles-Clark *et al.*, 1997). O monossacarídeo L-sorbose também já foi relatado como indutor da expressão de celulases em *T. reesei* (Nogawa *et al.*, 2001).

Estudos indicam que pequenos oligossacarídeos são liberados da celulose e estas moléculas ou seus derivados ingressam na célula e atuam como indutores da transcrição de celulases. A β -glicosidase pode clivar a celobiose, produto final da ação da celobiohidrolase, produzindo glicose, que causa repressão catabólica ou pode realizar a transglicosilação à soforose (Aro *et al.*, 2001). Soforose é considerado o mais potente indutor de celulases em *T. reesei* e também o mais específico para *Trichoderma*, desde que soforose não induziu a expressão das celulases em *T. viride*, *Penicillium jantinelum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *A. niger*, mas induziu a expressão de celulases em *Aspergillus terreus* (Mandels *et al.*, 1957; Hrmova *et al.*, 1991; Gielkens *et al.*, 1999). Por outro lado, a D-xilose, que induz a expressão em *A. niger*, não induz os genes de celulases de *T. reesei* (Margolles-Clark *et al.*, 1997; Gielkens *et al.*, 1999).

Outro fator importante para a produção de celulases e xilanases é a concentração de celulose ou da fonte de carbono no meio de cultivo. De acordo com Sternberg & Dorval (1979) para o fungo *T. reesei*, os cultivos podem alcançar títulos maiores em função do aumento na concentração de celulose até o nível de 6% (m/v), quando o pH do processo é controlado. Posteriormente, Hendy *et al.* (1984) verificaram, também, que aumentando a concentração de *Solka floc* em até 50 g.L⁻¹, foi possível a obtenção de aumentos proporcionais nos títulos enzimáticos. Brown *et al.* (1987) utilizaram misturas de 50% (m/v) de *Avicel* e 50% (m/v) de BMBS (palha de cevada tratada em moinho de bolas) como substrato nas concentrações de 1,5; 3,0 e 6% (m/v) para produção celulases pelo mutante de *P. pinophilum* NTG III/6. Segundo estes autores, quando a concentração de 6% (m/v) foi utilizada, obteve-se FPA máxima de 9,6 U.mL⁻¹ com produtividades comparadas às obtidas em culturas do *T. reesei* Rut C-30.

b) Influência das fontes de Nitrogênio

A fonte de nitrogênio é um dos fatores determinantes para a produção enzimática. Na produção de xilanases por *T. harzianum* 1073 D3, Seyis & Aksoz (2005) verificaram que

o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi a mais apropriada fonte de nitrogênio inorgânico, mas na presença de ureia como fonte adicional a um aumento na atividade de xilanases. Ainda, esses autores determinaram que a quantidade ótima de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a produção de xilanases foi de 0,14% (m/v). Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados com *T. viride* por Gomes *et al.* (1992), que constataram que as concentrações ideais para a produção de xilanases estão na faixa de 0,12 a 0,15% (m/v).

As fontes de nitrogênio apresentam efeitos drásticos na produção de enzimas xilanolíticas por fungos, sendo que fontes orgânicas têm apresentado melhores resultados que as inorgânicas para *A. awamori* (Smith & Wood, 1991).

Katapodis *et al.* (2007) verificaram que o nitrato de sódio, uma fonte de nitrogênio de baixo custo, apresentou bons resultados para a produção de xilanases por *C. thermophilum*, como pode ser verificado na Tabela 6.

Tabela 6. Diferentes fontes de nitrogênio empregadas na produção de xilanases por *Chaetomium thermophilum* em meio contendo 1% (m/v) de palha de trigo como fonte de carbono.

Fonte de Nitrogênio*	Xilanase (U.mL ⁻¹)
Extrato de levedura	37,2 ± 1,3
Milhocina	33,2 ± 1,5
Peptona de carne	32,6 ± 1,4
Ureia	19,6 ± 0,5
Fosfato de amônio	14,4 ± 0,3
Sulfato de amônio	13,8 ± 1,1
Nitrato de sódio	39,1 ± 1,2
Nitrato de amônio	21,3 ± 0,7

*Empregou-se a quantidade de 0,5% (m/v) de cada fonte de nitrogênio.

Fonte: Katapodis *et al.* (2007).

O farelo de trigo, quando adicionado ao meio de produção, produz efeito com alta eficiência na produção de enzimas, pois se trata de um substrato que contém rico em nutrientes. Ainda, a composição bioquímica do farelo de trigo indica que este material, quando hidrolisado, libera quantidades de monossacarídeos, tais com glicose (42,5%), xilose (15,4%), arabinose (3,1%) e galactose (2,7%) que são requeridos para multiplicação dos microrganismos.

c) Efeito de surfactantes

O uso de surfactantes demonstrou-se necessário para aumentar a atividade de celulases e xilanases por *T. reesei* e *Trichoderma viride* (Callow & Ju, 2012).

A presença do antiespumante polipropilenoglicol no meio de cultivo exerce influência na atividade enzimática, diminuindo a atividade de FPA, endoglicanases e β -glicosidases. Tratamentos com apenas Tween 80® mostraram-se benéficos para FPA, com maiores atividades nos tratamentos com 0,15% (v/v) do surfactante (Romio e Dillon, 2006).

O uso de *Tween 80* permitiu maior rendimento de endoglicanase, exoglicanase e celobiase por *Nectria catalinensis* no vigésimo dia de crescimento, presumivelmente pelo aumento da permeabilidade da membrana celular e/ou pela promoção da liberação de enzimas contidas nas células (Pardo, 1996). Resultados variáveis sobre o efeito de *Tween 80* na secreção de celulases foram verificados por Takao *et al.* (1985) em diferentes linhagens, por Brown *et al.* (1987) para *Penicillium pinophilum* e por Wase *et al.* (1985) para *Aspergillus fumigatus*.

d) Efeito do pH

O pH é outro importante parâmetro que influencia a produção de celulases e xilanases (Sternberg, 1976; Sternberg & Dorval, 1979). Xiong *et al.* (2004), analisando a influência do pH na produção de celulases e xilanases por *T. reesei* Rut C-30 em meio contendo lactose como fonte indutora, verificaram maiores títulos enzimáticos de xilanases em pH 5,5 e 6, enquanto maiores atividades de celulases obtidas na faixa de pH entre 4 e 5. As atividades de xilanases e celulases, bem como as concentrações de proteínas solúveis diminuiriam significativamente em pH 3,5 e 7,5.

Para *P. echinulatum* o cultivo submerso em pH 6 mostrou-se o mais adequado para obter maiores valores de FPAses. As maiores atividades de xilanases (18,5 IU.mL⁻¹), endoglicanases (8,2 UI.mL⁻¹) e FPA (0,9 UI.mL⁻¹) foram obtidas em pH inicial entre 6,0 e 7,0, em frascos sob agitação. Em biorreator, as maiores atividades para essas enzimas foram obtidas em pH entre 5,5 e 6,5 (Reis *et al.*, 2013).

e) Efeito da temperatura

Outro parâmetro de importância para o cultivo fúngico visando à produção de celulases e xilanases é a temperatura (Juház *et al.*, 2005; Sohail *et al.*, 2009).

Em *A. niger*, máxima produção de celobiohidrolase foi observada a 30°C (Hanif *et al.* 2004). Latifian *et al.* (2007) verificaram que a temperatura ideal de produção de celulases em estado sólido para as linhagens de *T. reesei* QM9414 e *T. reesei* MCG77 foram na faixa de 25 a 30°C, com teor de umidade entre 55 e 70%.

f) Efeito de indutores e inibidores

Finalmente, a produção e secreção enzimática em fungos estão sujeitas a controles de indução e de inibição. As fontes insolúveis de celulose, como *Solka floc* (polpa de celulose), algodão e papel de filtro são indutoras de celulases. A sofrorose (2-0- β -D-glicopiranosil-D-glicose) é um indutor que proporciona elevada atividade celulolítica, enquanto o amido, a glicose e o glicerol não atuam como indutores destas enzimas.

O modelo de indução de celulases in *Penicillium purpurogenum* (Figura 3) definido por Suto & Tomita (2001) incluem os seguintes passos:

- celulases constitutivas degradam a celulose em celooligossacarídeos e glicose;
- estes sacarídeos entram na célula e glicose é assimilada como fonte de carbono. β -glicosidase converte os celooligossacarídeos a gentiobiase, outros dissacarídeos e glicose;
- gentiobiase induz a produção de celulases, que são secretadas para fora da célula;
- celulase secretada degrada a celulose, produzindo celooligossacarídeos e glicose;
- retorno ao passo dois.

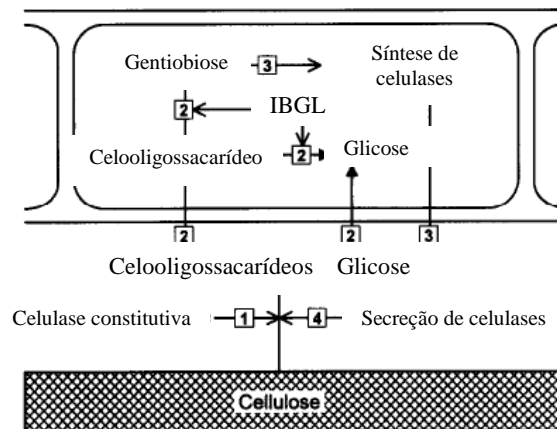


Figura 3. Modelo de indução de celulases em *Penicillium purpurogenum* (Os números 1 a 5 correspondem aos passos descritos no texto) (Suto & Tomita, 2001).

Celobiose e glicose diminuem significativamente a hidrólise de celulose e são consideradas inibidores de enzimas celulolíticas. Celobiose é o produto da ação de celobiohidrolase e parcialmente da ação de endoglicanase (EG) e inibe ambas as enzimas. Já a glicose inibe diretamente β -glicosidase. Na prática, a principal inibição por glicose na atividade enzimática é uma inibição indireta devido ao acúmulo de celobiose. Algumas β -glicosidases (β -G), incluindo as de *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* e *Thermonospora*

fusca, podem catalisar reações reversíveis em que moléculas de glicose por transglicosilação são convertidas a celobiose e produzem diferentes di, tri e oligossacarídeos (Andric *et al.*, 2010b).

Du *et al.* (2010) utilizaram um método fazendo uso do calcofluor branco para demonstrar inibição por produto de CBH1, CBH2 e EG1. Constataram que, quando a celobiose é adicionada à reação, uma mínima inibição foi observada em CBH2 e em EG1, enquanto que em CBH1 foi fortemente influenciada.

2.3 Processo de separação de mistura utilizando membranas e adsorventes

2.3.1 Uso de membranas para filtração

Filtração pode ser definida como a separação de dois ou mais componentes de um fluido baseando-se principalmente no tamanho das partículas (Cheryan, 1998).

Uma das técnicas de filtração consiste no uso de membranas, que é uma barreira seletiva semipermeável que separa duas fases e restringe total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas ou substâncias presentes nas fases, de uma maneira específica. As membranas podem ser classificadas de diferentes formas, entre elas, quanto ao material de origem, quanto a sua estrutura, quanto ao fluxo de permeação ou quanto a sua capacidade seletiva (Habert *et al.*, 2006).

Um aspecto a ser considerado quando componentes da mistura necessitam ser separados é o uso de membranas específicas para cada tipo de processo. Souza *et al.* (2008) verificaram a porosidade e a seletividade de membranas poliméricas de polissulfonas produzidas por inversão de fase. As membranas apresentaram características de permeseletividade e capacidade de troca iônica inferiores a membranas comerciais de eletrodialise *Selemion®*, sendo hidrofóbicas e apresentando alta resistência à passagem de corrente. O diâmetro médio de poros foi menor que 100 nm, tamanho de poros usual para membranas mesoporosas de ultrafiltração. A maioria das membranas poliméricas disponíveis comercialmente é fabricada pela técnica da inversão de fases, que consiste de três etapas principais: preparo de uma solução polimérica homogênea, espalhamento da solução sobre uma superfície formando um filme e a formação da estrutura polimérica da membrana pela separação de fases do sistema (Habert *et al.*, 1997; Mulder, 2003).

A técnica de precipitação em banho de não solvente para o polímero é muito utilizada no preparo de membranas poliméricas assimétricas. O filme polimérico é imerso em um banho composto de um não solvente para o polímero ou de uma mistura de solvente e não

solvente, que devem ser completamente miscíveis entre si. Esse banho também é conhecido como banho de coagulação. Ocorre a difusão do solvente do filme polimérico para o banho de coagulação, e do não solvente do banho para o filme polimérico até a precipitação do polímero e a formação da estrutura da membrana. A possibilidade de se utilizar diferentes polímeros e de se controlar os parâmetros do processo, como o tempo de evaporação do solvente, faz com que inúmeras membranas com diferentes estruturas possam ser preparadas. (Habert *et al.*, 1997; Mulder, 2003).

As membranas obtidas pelo método de inversão de fases são assimétricas. A camada superior, densa e muito fina (espessura $< 0,5 \mu\text{m}$), é a responsável pelo mecanismo de transferência de massa, enquanto a subcamada, porosa e mais grossa (espessura de 50-200 μm), age apenas como um suporte (Mulder, 2003).

Também para nanofiltração de soluções aquosas de glicose, sacarose e sulfato de sódio, Rodrigues *et al.* (2010) utilizaram membranas de poliamida com diferentes massas moleculares. Assim, os processos de filtração com o uso de membranas podem ser caracterizados segundo os métodos apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Caracterização dos processos com membranas

Processo	Força motriz para transporte de massa	Retido	Permeado
Osmose	Potencial químico	Soluto	Água
Diálise	Diferença de concentração	Grandes moléculas	Água, pequenas moléculas
Microfiltração	Pressão (20-200 KPa)	Partículas suspensas (ex.: bactérias, células sanguíneas)	água, sólidos dissolvidos
Ultrafiltração	Pressão (50-100 KPa)	Grandes moléculas (ex.: albumina, vitamina B12)	Pequenas moléculas
Nanofiltração	Pressão	Pequenas moléculas (ex.: glicose) e ácidos dissociáveis	Íons monovalentes, água
Osmose reversa	Pressão ($600-10^4$ KPa)	Sais solúveis	água
Eletrodiálise	Intensidade de corrente	Solutos não iônicos	Solutos iônicos, água
Pervaporação	Pressão	Moléculas não voláteis	Moléculas pequenas voláteis.

Fontes: Cheryan (1998) e Stephenson *et al.* (2000)

Os processos de recuperação e purificação são importantes para a caracterização do produto e podem ser realizados utilizando-se sistemas de membranas de microfiltração,

ultrafiltração, entre outros processos. Lipnizki (2010) cita biorreatores com sistemas de membranas (MBR) submersas de pervaporação na extração de etanol em fluxo contínuo. Acentua como desvantagens do processo, a limitação da área de membrana em relação ao volume do reator, o meio muito viscoso e o rendimento em declínio em função do *fouling*. Entretanto, salientam-se as vantagens: simples condições de operação no interior do biorreator e aumento na produtividade.

Os materiais comumente utilizados para a síntese de membranas são os polímeros e os cerâmicos (alumina, zircônia, sílica e hematita). As membranas de MF (microfiltração) e UF (ultrafiltração) podem ser utilizadas como suporte na fabricação de membranas compostas de osmose inversa (OI) e nanofiltração (NF).

A nanofiltração é um processo de separação por membranas, intermediário entre a osmose inversa e a ultrafiltração, cuja principal força motriz responsável pela separação é a diferença de pressão (Mulder, 1996). O processo de nanofiltração apresenta vantagens tais como: facilidade de operação, confiabilidade, não requer o uso de aditivos e construção modular o que torna fácil a construção em grande escala. A nanofiltração tem sido utilizada para o tratamento de água potável ou para processos que utilizam água em escala industrial (Buonomenna, 2007).

A Tabela 8 apresenta os polímeros mais utilizados na fabricação de membranas (Costa, 2009).

A eficiência de uma membrana está associada à polarização por concentrações, operação do sistema de filtração, bem como a porosidade, espessura, diâmetro e permeabilidade da membrana, tamanho e distribuição dos poros. Além disso, a rejeição de solutos por membranas é influenciada por vários fatores: dimensões do soluto, carga elétrica da membrana e dos solutos, rugosidade, propriedades químicas das soluções a serem filtradas, as quais são fatores hidrodinâmicos que determinam a tensão de arraste, as forças de cisalhamento na superfície da membrana e o grau de compactação da torta de filtro (Schneider & Tsutiya, 2001).

Poletto *et al.* (2010) constataram que, com o aumento da concentração de poliamida na membrana, ocorre um decréscimo no fluxo de permeado de água. A redução no fluxo permeado com o aumento na concentração de poliamida pode ser devido à formação de uma camada mais densa e espessa, a qual aumenta drasticamente a resistência à permeação de água.

Em processos que utilizam a microfiltração, as membranas são utilizadas para filtrar suspensão coloidal com finas partículas com dimensões lineares de 0,02 a 10 μm . Os materiais usados para a produção destas membranas podem ser os mesmos utilizados para a produção de membranas de ultrafiltração, além de nitrato de celulose, Nylon, policarbonato, poliéster, polipropileno, policloreto de vinila e celulose regenerada (Cheryan, 1998).

A separação que utiliza membranas pode ocorrer por diferença na interação dos permeantes com o material que forma a membrana (mecanismo de sorção-difusão) ou por exclusão devido à diferença de tamanho entre as partículas ou moléculas. Na primeira situação, as membranas são consideradas densas, ou seja, o transporte dos permeantes ocorre por processos difusivos através dos espaços intersticiais (volume livre) do material que forma a membrana. Na segunda situação, as membranas são consideradas porosas e o transporte ocorre preferencialmente através dos poros, predominando o mecanismo de transporte convectivo. Desta forma, a aplicação de determinada membrana depende basicamente de sua morfologia e do material que a constitui (Costa, 2009).

Tabela 8. Polímeros usados na produção de membranas, sua morfologia e aplicação.

<i>Polímero</i>	<i>Morfologia</i>		<i>Processo</i>
	Tipo	Espessura da pele (μm)	
Acetato de celulose	Densa	0,1	OI
	Porosa	0,1	UF
	Porosa	50-300	MF
Poliacrilonitrila	Porosa	0,1	UF
Poli (éter imida)	Porosa	0,1	UF
Poli (éter sulfona)	Porosa	0,1	UF
	Porosa	50-300	MF
Poli (tereftalato de etileno)	Porosa	6-35	MF
Poliéter	Densa	0,05	OI, NF
Polietileno	Porosa	50-500	MF
Poliimida	Densa	0,1	Separação de gases, NF
Poliamida aromática	Porosa	0,1	UF
	Densa	0,05	OI, NF
PVDF	Porosa	0,1	UF
	Porosa	50-300	

Fonte: Costa (2009).

As membranas utilizadas para ultrafiltração (UF) geralmente são de origem

polimérica (poliamidas, poliacrilonitrila, álcool polivinílico, polissulfonas, polietersulfonas, acetato de celulose, PVDF (poli (fluoreto de vinilideno))). Elas apresentam estruturas assimétricas na pele e mais poros. Também apresentam tamanho de poro entre 10 a 200 Å e são capazes de reter espécies com massa molecular na razão de 300 a 500000 Da. Elas podem operar em amplas condições de pH, pressão e temperatura (Mulder, 2003). A Tabela 9 apresenta algumas variáveis de operação para membranas poliméricas em UF.

Os módulos de membranas estão disponíveis em dois tipos de sistema para uso em reatores e são comercialmente disponíveis para o tratamento de efluentes domésticos ou industriais, ilustrados na Figura. Estes reatores podem ter os módulos de membrana em configuração tipo casco-tubo ou placa e quadro. No reator com módulo externo, os módulos de membrana são instalados fora do tanque aerado. O conteúdo do reator é bombeado para os módulos, normalmente tubulares, gerando altas tensões de cisalhamento necessárias para a obtenção de alto fluxo permeado (Mulder, 1987).

Tabela 9. Parâmetros de operação para membranas poliméricas usadas em ultrafiltração.

Polímero	pH de operação	Pressão máxima (atm)	Temperatura máxima (°C)
Polietersulfona	2-12	30	70
Polissulfonas	2-12	15	70
Poliacrilonitrila	2-10	10	60
PVDF	2-12	10	70
Acetato de celulose	3-6	25	30

Fonte: Ho & Sirkar (1992).

Já no tipo submerso, o módulo ou feixe de membrana é imerso no tanque aerado e o filtrado normalmente é permeado através das paredes da membrana. Em geral, os sistemas com membranas submersas utilizam membranas tipo fibra oca ou placa plana. Enquanto as membranas planas são instaladas verticalmente, as fibras ocas podem ser instaladas vertical ou horizontalmente, de modo que o fluxo de bolhas ascendentes move-se axial ou transversalmente às fibras. Usualmente, o conteúdo do biorreator está em contato com a superfície externa das membranas.

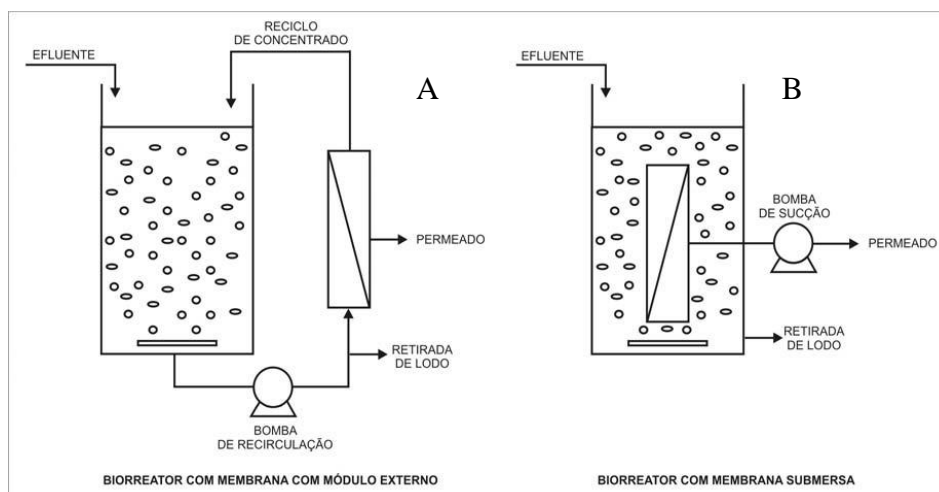


Figura 4. Modelos de biorreatores com módulo externo (A) e interno (B) de membranas para tratamento de efluentes (Fonte: Costa, 2009).

Estes reatores utilizados para tratamento de água residual apresentam, segundo Stephenson *et al.* (2000), as vantagens de remoção completa dos sólidos, desinfecção do efluente, início do processo rápido e operação simples para remoção de sólidos, nutrientes e oxigênio dissolvido. Entre as desvantagens, são elencadas: limitação da aeração, entupimento e incrustações na membrana e o custo das mesmas.

As maiores vantagens do uso de reatores de membranas para a remoção de produtos durante a hidrólise enzimática de material lignocelulósico incluem-se, segundo Andric *et al.* (2010a):

- o uso de enzimas por um longo período de tempo, via retenção no sistema;
- a obtenção de altos graus de conversão pela redução do produto inibidor;
- obtenção de produtos de hidrólise puros, por exemplo, enzimas isentas de contaminantes;
- manutenção de produtos com concentração constante.

Entretanto, os autores salientam que o desempenho dos biorreatores para conversão lignocelulósica depende de alguns fatores como a taxa de formação dos produtos e de remoção destes produtos, taxa de inibição, vazão de alimentação, desativação de celulasas, polarização de concentração e entupimento das membranas. Andric *et al.* (2010 a) verificaram os efeitos positivos da remoção do produto na hidrólise de lignocelulósicos. Constataram que, em geral, a conversão de celulose neste tipo de biorreator de membrana foi 40% superior quando comparado ao processo em batelada. Em muitos casos, a conversão foi entre 70 e 90%.

Em se tratando de reatores com membranas, um aspecto que causa grande redução da eficiência é o *fouling* (adsorção de partículas na superfície da membrana). Silva (2009), em estudo com reatores em lodo, utilizou membranas de poli(éter)imida para estudo do *fouling* e constatou que vários fatores interferem, dentre eles: geometria, porosidade, rugosidade, empacotamento e material da membrana, tamanho, concentração e estruturas dos flocos de biomassa e, em relação às condições de operação, aeração, velocidade tangencial e limpeza.

Os possíveis efeitos negativos da polarização por concentração são: decréscimo do fluxo de permeado devido ao aumento da pressão osmótica na superfície da membrana; aumento da passagem de soluto através da membrana; precipitação de soluto, se a concentração exceder o limite de solubilidade do sal e o favorecimento de incrustações por deposição. Para reduzir esses efeitos e o *fouling*, Mulder (1987) sugere o uso de sistema de membranas operando em *cross-flow*.

Para a retirada de açúcares redutores totais do caldo fermentativo, Silva (2008) utilizou membranas de diálise, enquanto Bélafi-Bakó (2006) estudou este comportamento em biorreatores de membrana, sendo que este último removeu a glicose, açúcar inibidor no processo de hidrólise da celulose, obtendo maiores resultados na produtividade enzimática. Em relação às condições do biorreator, salientou a necessidade do controle do nível de líquido em ambos os lados da membrana como um fator crucial, pois, em condições de grande turbulência, há a necessidade de controle preciso.

Mores *et al.* (2001) estudaram a ação de membranas de polissulfonas e Nylon[®] em sistemas de separação em meio que contém resíduo lignocelulósico (40% de lignina e 60% de celulose) e celulases. Neste estudo, verificaram o uso de membranas de ultrafiltração para a separação da glicose no meio. A utilização de membranas de acetato de celulose não obteve resultados promissores por serem decompostas pelas enzimas e constataram o grande efeito da fonte de carbono no *fouling*.

Knetsen & Davis (2004) estudaram a retenção de celulases e a remoção de glicose durante a hidrólise de lignocelulósicos provenientes da palha de milho utilizando membranas de ultrafiltração. Constataram que a remoção de glicose, como produto inibitório pode ser realizada, mas a utilização deste método para separar a enzima não é recomendada devido à adsorção no substrato. A eficiência de remoção do carbono orgânico assimilável por bactérias através de membranas de nanofiltração compostas de poliamida e de polietersulfona sulfonada comerciais depende da força iônica e da dureza da água (Schneider & Tsutiya, 2001).

Também nos estudos em biorreatores com membranas e utilizando a palha de milho, Zhang *et al.* (2010) estudaram a remoção de glicose no meio, utilizando uma membrana de polissulfona em placas (10 KDa) e com área efetiva de 0,00317 m², o que permite a retenção das enzimas. Concluíram, portanto, em seus estudos, que o uso de biorreatores com membranas é vantajoso para a remoção de açúcares inibidores e que a conversão de celulose em glicose teve um aumento de 5% quando comparada a um reator sob agitação. Este incremento é maior ainda quando o processo ocorre em batelada alimentada, podendo ocorrer a reutilização da enzima.

A seleção das membranas para uso em biorreatores deve ter critérios específicos em relação às condições de operação do mesmo. Assim, Liu *et al.* (2010) analisaram as condições de operação de biorreatores a membranas de polietersulfonas e constataram que, para a hidrólise de carboximetilcelulose, as melhores foram à temperatura de 55°C, pH 7.0 e a velocidade de agitação de 1200 rpm.

Sawai *et al.* (2010) utilizaram membranas de PVDF em bioprocesso de operação contínua para a produção de ácido pirúvico. Constataram que o sistema de membrana é eficaz em tempos superiores a 300 h, e, que as membranas utilizadas em tratamento de água residual também podem ser aplicadas neste processo não requerendo equipamentos especiais.

2.3.2 Uso de adsorventes para remoção de componentes de uma mistura

A absorção é um processo onde a substância absorvida se infiltra na substância que a absorve, sendo a adsorção um processo físico ou químico onde moléculas de uma substância, o adsorvato, fixam-se à superfície de outra substância, o material adsorvedor. O processo de adsorção é definido por Ruthven (1984) como sendo a transferência de um ou mais constituintes (adsorvato) de uma fase fluida para a superfície de uma fase sólida (adsorvente). Nesse processo, as moléculas presentes na fase fluida são atraídas para a zona interfacial devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente.

Gregg & Sing (1982) conceituam os materiais adsorvedores ou simplesmente adsorventes como substâncias naturais ou sintéticas, cuja superfície interna dos poros é acessível a uma combinação seletiva com o adsorvato.

Adsorventes são substâncias com grande área superficial por unidade de massa, capazes de reter química ou fisicamente outra substância. A adsorção é um processo espontâneo que ocorre sempre que uma superfície de um sólido (adsorvente) é exposta a um

gás ou a um líquido (adsorbato), ou seja, adsorção é o enriquecimento de um dado fluido, ou o aumento da densidade desse fluido na vizinhança da interface (Ruthven, 1984).

O processo de adsorção é um processo cinético que envolve mecanismos de transferência de massa. Inicialmente ocorre o transporte das moléculas do adsorbato da fase líquida para a camada limite que circunda o adsorvente. Este mecanismo de transporte ocorre por processos de difusão ou por agitação da solução. Posteriormente, ocorre o transporte por processo de difusão molecular, do adsorbato da camada limite até a superfície externa do adsorvente, evidenciando um mecanismo de transferência externa de massa (Ruthven, 1984).

Uma vez que o adsorbato tenha ultrapassado a camada limite que circunda o adsorvente, o seu transporte passa a ocorrer em seu interior. Este transporte intrapartícula pode se dar através de difusão molecular, ao longo dos vazios internos da partícula, como também por difusão por meio da superfície interna do adsorvente (mecanismos de transferência interna de massa, ou por difusão superficial ou difusão porosa). Após o encontro de um sítio de adsorção vazio, é efetuada a ligação entre o adsorvente e o adsorbato (Ruthven, 1984).

As forças atrativas existentes entre o material adsorvedor e o adsorbato podem apresentar interações de caráter físico (adsorção física) ou químico (adsorção química). A predominância de cada uma delas é função tanto das particularidades do adsorbato quanto das características da superfície do adsorvente. Se entre o adsorbato e a superfície do material adsorvente agir apenas forças de interação molecular que envolva dipolos permanentes ou dipolos induzidos, a adsorção é denominada física ou de van der Waals (Guerasimov *et al.*, 1977).

Em se tratando de adsorção, são muitos os adsorventes relatados na literatura (Tabela 10), dentre eles, carvão ativado, quitina, quitosana, vermiculita, bentonita, turfa, resíduos como a palha e casca de arroz, bagaços, caroços, sendo o carvão ativado, o mais amplamente usado industrialmente. A remoção por adsorção de 99% de furfural e hidroxifurfural foi realizada por Klasson (2011) com o uso de resíduos da pirólise de material lignocelulósico.

O mecanismo de adsorção pelo carvão ativado com microporos com raio de 2 nm, por exemplo, consiste na retenção por forças físicas do tipo Wan der Walls, devido a sua grande área superficial (Bansal & Goyal, 2005). O carvão ativado foi usado na remoção de cobre na cachaça. (Lima *et al.*, 2009).

Tabela 10. Materiais adsorventes e suas aplicações.

Material adsorvente	Aplicação
Sílica gel	Secagem de gases, refrigerantes, solventes orgânicos, dessecantes de embalagens.
Alumina ativada	Secagem de gases, remoção de boro-fluoreto e fluoreto em processos de alquilação.
Zeólitas	Separação de oxigênio do ar, secagem de gases, purificação de hidrogênio, separação de olefinas e aromáticos.
Carvão ativado	Recuperação de vapores de solventes orgânicos, remoção de odor de gases, remoção de CO ₂ , SO _x e NO _x , purificação de água com destaque para remoção de fenol, orgânicos em baixas concentrações, compostos halogenados, metais pesados e cloro livre.

Fonte: Adaptado de Coulson *et al.* (2002).

Hegazi (2013) verificou que adsorventes de baixo custo (casca de arroz) podem ser proveitosamente utilizados para a remoção de metais (Fe, Pb e Ni) de águas residuárias e que o período de contato necessário para adsorção foi de duas horas.

Quitina e quitosana são dois outros exemplos de adsorventes que apresentam estabilidade física e química, biocompatibilidade, biodegradabilidade, elástica e não são tóxicas (Mir *et al.*, 2008). A quitina é um polímero natural e é encontrada em muitas espécies de animais marinhos e plantas inferiores; pode ser encontrada em toda a parede celular das leveduras e no exoesqueleto de invertebrados, como no camarão, no siri, nos caranguejos e nos insetos (Kumar, 2006; Guibal, 2004).

A quitosana é obtida em escala industrial pela desacetilação alcalina da quitina, (Juang *et al.*, 2001). Nanofibras de quitina foram utilizadas para a remoção de compostos corantes provenientes da reação de Maillard (Dolphen & Thiravetyan, 2011). Os autores removeram 73% dos compostos corantes utilizando 10% de nanofibras adicionadas ao meio. Já Zheng (2013) utilizou microesferas magnéticas de quitosana para a imobilização de β -glicosidase através da adsorção na hidrólise de celulose. Também utilizando quitosana em esferas magnéticas, Man (2012) removeram 99,5% dos íons Pb⁺² da água.

Argilas, silicatos hidratados de alumínio, como a vermiculita, um aluminossilicato de ferro e magnésio, apresentam poder adsorvente e podem ser empregadas como peneiras moleculares, como agentes descorantes e clarificantes de óleos vegetais e minerais, como suportes catalíticos, como agente de filtração e como adsorventes de óleos em água. Entretanto, seu uso na adsorção depende de diversos fatores, tais como pH, tipo e

concentração do metal adsorvido, tempo de adsorção, além das características da argila a ser usada (Santos *et al.*, 2002). Como aplicação, o uso de vermiculita modificada com óxido de manganês II foi eficaz na adsorção de íons de prata (Sari & Tuzen, 2013) e mercúrio (Zhang, 2011).

Para avaliar o mecanismo de adsorção usam-se as isotermas de adsorção são curvas que indicam como o adsorvente efetivamente adsorverá o soluto, fornece uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente é capaz de remover da solução (Coulson *et al.*, 2002).

Segundo Giles *et al.* (1960) as isotermas são divididas em quatro classes (S, L, H, e C) e quatro subgrupos (1, 2, 3 e 4) (Figura 5). As isotermas do tipo S (sigmoidal) possuem as interações adsorvente - adsorbato mais fracas que as interações adsorbato - adsorbato e solvente - adsorvente. As isotermas do tipo L (de Langmuir) possuem curvatura inicial voltada para baixo devido à diminuição da disponibilidade dos sítios ativos. As isotermas do tipo H (“high affinity”) aparecem quando o adsorbato tem grande afinidade pelo adsorvente, a quantidade adsorvida inicial é alta e logo após o equilíbrio é alcançado. As isotermas do tipo C (“constant partition”) possuem um início linear indicando que o número de sítios ativos é constante.

Em relação aos subgrupos pode-se afirmar que o Subgrupo 2 - Indica a saturação da superfície em que o adsorbato tem mais afinidade pelo solvente do que pelas moléculas já adsorvidas. O Subgrupo 3 caracteriza-se por apresentar um aumento após um ponto de inflexão. Já o Subgrupo 4 indica a formação de camadas múltiplas de adsorbato adsorvido. O Subgrupo mx, a isoterma apresenta um máximo a altas concentrações e é considerado um caso raro, indicando que em altas concentrações do adsorbato as interações adsorbato-adsorbato aumentam muito mais rapidamente do que as atrações adsorbato-adsorvente.

Quando a superfície de um sólido é exposta a um gás ou líquido, as moléculas fluidas colidem com o sólido e podem ser adsorvidas. Nos instantes iniciais, quando a superfície do sólido encontra-se praticamente com todos os sítios de adsorção vazios, a taxa de moléculas adsorvidas é alta. Porém, com passar do tempo, o grau de cobertura da superfície aumenta e a adsorção decresce continuamente, ao passo que a dessorção começa a crescer até que seja alcançado o equilíbrio. No instante em que a taxa de adsorção é a igual a de dessorção, o equilíbrio é alcançado e diz-se que o sólido está em equilíbrio com a fase fluida (Bansal *et al.*, 2005).

Segundo Coulson *et al.* (2002) a capacidade de um sólido adsorver uma determinada substância em fase líquida, envolve as três principais propriedades: concentração de adsorvato na fase fluida (C), a concentração do adsorvato na fase sólida (CS) e a temperatura do sistema (T). Se uma dessas propriedades for mantida constante, as duas outras podem ser correlacionadas. Em fase líquida, a adsorção pode ser definida pela Equação 1:

$$Q = \frac{b \cdot C_e \cdot q_m}{1 + b \cdot C_e} \quad (1)$$

Onde: Q = concentração na fase adsorvida, C_e é a concentração de equilíbrio, q_m é a concentração da fase adsorvida e $b = B_0/(RT)$.

De acordo com El-Naas *et al.* (2010) diversos modelos teóricos e empíricos têm sido desenvolvidos para representar isotermas de adsorção. As isotermas de Freundlich e Langmuir são exemplos de modelos frequentemente utilizados na descrição de dados de equilíbrio em sistemas líquidos que envolvem o tratamento de água e efluentes industriais.

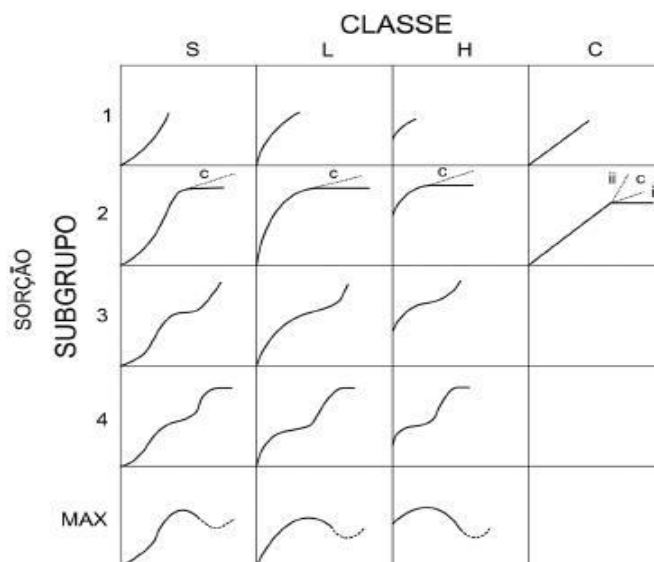


Figura 5. Classes e subgrupos de classificação das isotermas (Giles *et al.*, 1960).

O Modelo de Langmuir foi proposto no ano de 1918, sendo o primeiro a ser desenvolvido teoricamente e pode ser considerada como base da maioria dos tratamentos teóricos da adsorção. O modelo de Langmuir foi desenvolvido para adsorção de gases

supondo um sistema de adsorção altamente idealizado, tendo como base as seguintes hipóteses (Salim *et al.*, 2005; Coulson *et al.*, 2002):

- moléculas em fase gasosa são adsorvidas em sítios discretos cada um podendo acomodar apenas uma molécula;
- cada sítio de adsorção possui a mesma energia, independente das espécies e quantidade adsorvida;
- uma vez adsorvida, a molécula não migra para outro sítio da superfície do sólido;
- a quantidade máxima adsorvida corresponde à formação da monocamada;
- não existem interações entre as moléculas adsorvidas e;
- a velocidade de dessorção depende apenas da quantidade de material adsorvido (Figura 6).

Para a quimissorção a segunda hipótese é a mais idealizada uma vez que considera a superfície energeticamente uniforme desconsiderando as interações entre as moléculas que compõem o filme adsorvido.

Segundo Coulson *et al.* (2002) em altas concentrações de fase gasosa a taxa de moléculas adsorvidas aumenta até o ponto no qual a adsorção é retardada pela redução do número de sítios disponíveis na superfície do sólido. Neste instante a taxa de adsorção é diretamente proporcional à quantidade de sítios não ocupados e à concentração da referida espécie. Ao passo que moléculas são adsorvidas outras são dessorvidas, caso possuam energia de ativação. Em uma temperatura fixa, a taxa de dessorção é proporcional à área ocupada por moléculas do adsorvato e quando as taxas de adsorção e dessorção são iguais, o equilíbrio dinâmico é estabelecido.

Paralelamente, Bansal *et al.* (2005) definem a isoterma de Freundlich é uma forma limitada da isoterma de Langmuir e somente pode ser aplicada em faixas de pressão moderadas. De acordo com Coulson *et al.* (2002), apesar de sistemas líquidos serem menos entendidos que os gasosos, as equações de isotermas idealizadas para gases são aplicáveis a sistemas líquidos. Segundo Foo *et al.* (2010) a isoterma de Freundlich é amplamente utilizada em sistemas heterogêneos, especialmente na adsorção de compostos orgânicos e espécies altamente interativas com carvão ativado (Figura 6).

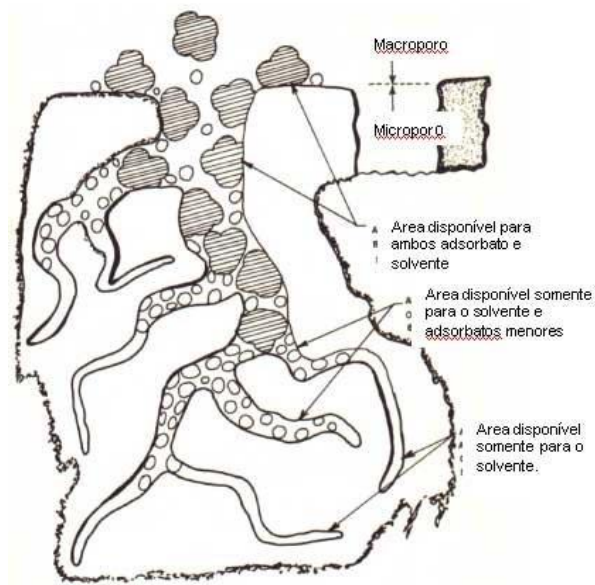


Figura 6. Processo de saturação dos poros durante a adsorção em carvão ativado (Coulson, 2002)

A partir do que foi exposto até o momento, nesse trabalho foram desenvolvidos métodos e processos visando a remoção de substâncias inibidoras enzimáticas e repressoras catabólicas, utilizando membranas tubulares semi permeáveis (microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração) e adsorventes e avaliado o efeito da remoção sobre a atividade de celulasas e xilanases.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Para a obtenção de celulases e xilanases, foi utilizada a linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* tendo como parental a linhagem 2HH, obtida por processo de mutagênese e seleção (Dillon *et al.*, 2011) no Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Para produção de enzimas em frascos Erlenmeyer e em biorreator também foi utilizado o fungo filamentosso *Trichoderma reesei* RUT C30 ATCC, pertencente a coleção do Laboratório de Enzimas e Biomassas da UCS.

3.2 Condições de cultivo

3.2.1 Meio sólido para crescimento e manutenção da linhagem

O meio sólido foi composto pela suspensão de 2,5% (m/v) de celulose microcristalina intumescida (500 mL.L^{-1}), solução de sais (0,1%(v/v), água destilada (400 mL) e ágar (20 g.L^{-1}).

3.2.2 Meio para produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas em frascos agitados e biorreatores

Para a produção de celulases e xilanases, por *P. echinulatum* e *T. reesei*, em frascos agitados e biorreator, para cada cultivo, foi usado um meio de cultivo padrão com as seguintes proporções fixas:

- 1% (m/v) de celulose cristalina;
- 0,2% (m/v) de farelo de trigo;
- 0,1% (m/v) farelo de soja;
- 1 g.L^{-1} (v/v) de *Tween* 80[®];
- 5% (v/v) de solução de sais 20 x concentrada;
- 0,01% (v/v) de solução de sulfato de gentamicina 44 g.L^{-1} (utilizado somente no pré-inóculo).

Foi utilizada nos meios de cultivo a solução de micronutrientes formulada por Mandels & Reese (1957): KH_2PO_4 (2 g.L^{-1}); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($1,3 \text{ g.L}^{-1}$); $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$); CaCl_2 ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$); $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg.L^{-1}); $\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$ ($1,56 \text{ mg.L}^{-1}$); $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$

(1,4 mg.L⁻¹). Para uso foi preparada uma solução 20 x concentrada pela adição de KH₂PO₄ (40 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄(28 g.L⁻¹), CO(NH₂)₂(6 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (6 g.L⁻¹), CaCl₂ (6 g.L⁻¹), os outros nutrientes foram adicionados separadamente preparados em uma solução de 1 litro de água destilada.

Utilizou-se nos cultivos, o antiespumante *Fluent Cane 114*[®] à base de propilenoglicol, produzido pela Dow Brasil SA (São Paulo/SP).

3.2.3 Cultivos para pesquisa de repressão catabólica

Para a produção de enzimas, frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio foram inoculados com suspensão de 1.10⁷ conídios, mantidos a 28°C e agitados a 180 rpm por 5 dias. Foram colhidas amostras para dosagem enzimática no 3º, 4º e 5º dias de cultivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os ensaios de estudos de modulação da repressão catabólica foram realizados inicialmente em frascos Duran[®] de 100 mL contendo 20 mL meio padrão (0,2 g de celulose, 0,02 g de Prodex, 0,04 g de peptona e 1 mL de solução de sais 20x concentrada). Os frascos Duran foram inoculados com uma suspensão contendo 1x10⁵ conídios.mL⁻¹ e mantidos em agitação recíproca de 180 rpm a 28° C. Após períodos sucessivos de 12, 18, 24, 36, 42 e 44 h, os meios foram filtrados e a fração sólida retida foi transferida para frascos Erlenmeyer de 500 mL. Esses frascos Erlenmeyer de 500 mL foram constituídos de 100 mL de meio (0,16 g de peptona, 0,08 g Prodex[®]), 0,8 g de celulose cristalina, 4% (v/v) de solução mineral (SM) 20 x concentrada, 0,1% (v/v) de Tween 80[®], adicionados 0,1% (v/v) de solução de gentamicina a 4,4%. O padrão considerado foi realizado com inóculo em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio (1 g de celulose, 0,1 g de Prodex[®] e 0,2 g de peptona).

Para a segunda etapa dos estudos de modulação de repressão catabólica, os meios em frascos Duran[®], foram constituídos de 0,5 g de fonte de carbono (glicose, sacarose, frutose, celobiose ou lactose), 0,02 g de Prodex[®] e 0,04 g de peptona e inoculados conforme etapa 1. Após 24 h e 44 h foram filtrados e a parte sólida foi lavada com água destilada e transferido para frascos Erlenmeyer, contendo 100 mL de meio com 1g de celulose, 0,16 g de peptona, 0,08 g de Prodex[®] e 4 mL de meio de sais. No permeado coletado foram determinadas a atividade enzimática e a concentração de açúcares redutores. As membranas utilizadas para a filtração da fase sólida (micélio e celulose não consumida) foram de éster de celulose 0,2 µm (Millipore[®]).

A terceira etapa do trabalho iniciou-se com o inóculo do meio em frascos Duran contendo 20 mL de meio, com 0,5 g de fonte de carbono (glicose, sacarose, frutose, celobiose ou lactose), 0,2 g de celulose, 0,02 g de Prodex[®] e 0,04g de peptona. Após 24 h e 44h, o conteúdo foi filtrado e a parte sólida retida foi transferida para Erlenmeyer contendo 100 mL de meio (0,8 g de celulose, 0,16 g de peptona, 0,08 g de Prodex[®] e 4 mL de meio de sais). A fim de comparações nos ensaios de repressão catabólica, o padrão considerado foi o meio inoculado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, sendo 1% de celulose cristalina, 0,2% de Peptona, 0,1% de Prodex[®], 5 mL de sais 20x concentrados e 95 mL de água destilada.

3.2.4 Cultivos em biorreator com agitação mecânica

O biorreator fabricado pela New Brunswick, BioFlo115 de 10 litros operou com um volume de trabalho correspondente a 7 litros, sendo 700 mL de pré-inóculo, obtidos de cultivos de 48 h provenientes de 7 frascos contendo 100 mL de meio. A agitação foi realizada com duas turbinas de fluxo radial *Rushton*, seis pás, cujas linhas de fluxo tendem a ser perpendiculares ao eixo do agitador, impulsionando a massa líquida contra as paredes do tanque. O biorreator possui quatro chicanas metálicas, dispostas na parte interna. Apresenta estrutura em vidro e tampa em aço inox. Possui controle da frequência do agitador, vazão de ar e sensores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH.

A calibração dos eletrodos de pH e oxigênio dissolvido foi realizada após 8 h de polarização dos eletrodos.

Os cultivos foram realizados à temperatura de 28°C e sem controle de pH. A agitação e a aeração do sistema foram controladas em cascata pelo equipamento a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido de mínimo de 30%.

Para o sistema de filtração com membranas, as membranas C1 e P1 (seção 4.8) foram introduzidas no reator e conectadas a um sistema de bomba a pressão reduzida. O filtrado foi armazenado em recipiente externo esterilizado e/ou operado em circuito fechado.

No ensaio, cuja filtração foi seguida de adsorção com carvão ativado (FC), filtrou-se 1,5 L de meio em leito de carvão ativado esterilizado contendo 2 g do adsorvente após 24 h de cultivo. Posteriormente, o permeado foi filtrado para a remoção do carvão em leito com fibra de vidro, retornando ao biorreator. A perda de água foi compensada com a adição de água destilada.

Nos ensaios em biorreatores envolvendo filtração externa, utilizou-se tela metálica com poros de 0,1 mm de diâmetro para a retenção do micélio, celulose e farelos. Posteriormente, externamente ao biorreator, realizou-se a adsorção dos açúcares redutores com adsorventes *in natura* (quitosana e carvão ativado sem tratamento ou em *pellets*) e *pellets* de PVDF com e sem o uso de adsorventes. Para a remoção dos *pellets*, foi usada uma peneira de malha fina e para a remoção dos adsorventes *in natura*, o permeado foi centrifugado por 15 min a 4000 rpm. Posteriormente, o permeado foi novamente introduzido ao biorreator.

3.3 Determinação da produtividade volumétrica enzimática

Para a determinação da produtividade volumétrica, calculou-se a diferença entre a máxima atividade enzimática (UI. mL⁻¹) e a inicial e, posteriormente, dividiu-se pelo tempo (horas) (Equação 2) cuja atividade foi máxima, sendo expressa em UI.mL⁻¹.h⁻¹.

$$P_v = \frac{AE_f - AE_i}{t} \quad (2)$$

3.4 Método de preparo de membranas tubulares e planas e de *pellets*

3.4.1 Preparo de membranas tubulares

As membranas tubulares foram preparadas impregnando (formação do filme polimérico) suporte cerâmico e polimérico com polímeros. O polímero utilizado para a preparação de membranas e impregnação de suportes foi o poli (fluoreto de vinilideno), SOLEF 1015/0078 fornecido pela Solvay Solexis[®], Inc, com massa molar de 534.000 g.mol⁻¹ que apresenta o seguinte monômero (n: [-CH₂-CF₂-]_n no qual, segundo o fabricante, existe a presença de um plastificante em sua composição.

O solvente utilizado na preparação da membrana de PVDF foi *N,N'*dimetilformamida (C₃H₇ON) (DMF), fornecido pela Labsynth[®], com pureza de 99,8%. No caso da membrana cerâmica C2, o solvente DMA (*N,N'*dimetilacetamida) também foi utilizado. Adicionalmente foram utilizados para o preparo das membranas cerâmicas C2 (Tabela 11). Os polímeros poliamida 66 (PA66), poliamida 6 (PA6) e Polissulfona (Psf) em diferentes concentrações, cujos solventes foram ácido clorídrico para PA e ácido fórmico para Psf foram utilizados nas membranas de suporte polimérico P3b, P4b e P6a (Tabela 12). Os não solventes utilizados para o preparo das membranas foram água destilada, solução de etanol a 20% (v/v) e solução 1% de dodecil sulfato de sódio (m/v) (Tabelas 11 e 12).

As membranas tubulares de suporte de polipropileno (P) e de suporte cerâmico (alumina) (C) possuíam 0,8 cm de diâmetro interno, 1,3 e 1,1 cm de diâmetro externo, respectivamente. O comprimento das mesmas era 19,8 cm e 21 cm para as membranas poliméricas e cerâmicas respectivamente. Como referência de eficiência utilizou-se as membranas tubulares N5 e N10 da Andritz, que como especificações as membranas de nanofiltração constam o tamanho de poro correspondente a *cut-off* molecular de 5 KDa e 10 KDa, respectivamente. As membranas N5 e N10 apresentavam diâmetro interno de 0,6 cm, diâmetro externo de 0,9 cm e comprimento de 25 cm.

Os suportes cerâmicos e poliméricos foram impregnados com soluções poliméricas a 10 a 20 % (m/v) de PVDF, Psf (polissulfona), PA66 (poliamida 66) e PA6 (poliamida 6). A impregnação ocorreu interna e externamente nos suportes tubulares durante 30 a 60 min em estufa a 40°C. Após ensaios com meio de cultivo, as membranas foram imersas em banho de não solvente a 25°C por 24 h.

A utilização da solução a 1% de agente reticulante (ácido málico) em PEG600 (polietileno glicol) foi realizada paralelamente com emprego de solução a 2,5% de glutaraldeído por 1 h.

Após o uso das membranas em meio de cultivo, as mesmas foram lavadas e foi realizada a retrolavagem com solução de NaOH e posteriormente e mantida até a utilização em solvente DMF ou DMA.

A Tabela 11 apresenta a produção de membranas tubulares de suporte cerâmico. Os ensaios realizados com as mesmas tinham o objetivo de aperfeiçoar a permeabilidade e seletividade em relação a retenção de enzimas do extrato enzimático e os resultados foram apresentados no capítulo 5.1.

Para fins de análise foram considerados somente os resultados com retenção mínima de 30%, sendo os demais desconsiderados.

Tabela 11. Métodos de impregnação de membranas tubulares cerâmicas (alumina).

Identificação e composição da solução polimérica	Tempo (h) e temperatura (°C) de impregnação	Solvente e Temperatura do banho de inversão (°C)	Observações
C0-PVDF 10%	1-40	Solução de SDS	Compactado por 2h a 3atm
C1 – PVDF 10%	1-40	Água/ 25	Compactado por 2h a 3atm
C2- PVDF 10%	2-40	Água /25	Compactado por 2h a 3atm
C3– PVDF 10%	2-40	Água /25	Compactado por 2h a 3atm
C4– PVDF 10%	1-40	Água /5	Re-impregnado com água a 60°C
C5– PVDF 10%	1-40	Água /60	Re-impregnado com água a 5°C*
C6– PVDF 10%	1-40	Etanol/ a 20	*
C7– PVDF 10%	1-40	Água /25	Ácido málico (0,5%) em PVDF*
C8– PVDF 10%	1-40	Água /25	PEG 6000 (0,5%)*
C9– PVDF 10%	1-40	Água/ 25	Ác. málico+PEG6000 +PVDF*
C10– PVDF 10%	1-40	Água /25	3 impreg. sucessivas (10%)*
C11– PVDF 10%	1-40	Água /25	1 impreg.(10%)+ 2 impreg.(20%)*
C12– PVDF 10%	1-40	Água /25	1 impreg.(10%)+1impreg.(30%)*
C13– PVDF 10%	1-70	Água /25	Impreg. interna e externa a 70°C
C14– PVDF 10%	1-70	Água /25	C1 reimpreg. por 30min a 70°C
C15– PVDF 10%	1-70	Água /25	C1 reimpreg. por 10 min a 70°C
C1a– PVDF 10%	1-40	Água /25	Sem compactar; impreg. Externa
C2a– Psf10%	1-40	Água /25	Idem C2a
C3a– Psf 20%	1-40	Água /25	Idem C2a
C4a – Psf 17%	1-40	Água /25	Idem C2a
C5a– PA66 10%	1-40	Água /25	Idem C2a
C6a– PA66 17%	1-40	Água /25	Idem C2a
C7a– PA66 14%	1-40	Água /25	Idem C2a
MOLITA (BEGE)	-	-	Membrana de sílica e alumina, tratamento térmico
MOLITA I (BEGE I)	1-40	Água /25	Impreg. com PVDF a 10%, sem compactação.
N5			Membrana Andritz. 5KDa
N10			Membrana Andritz. MEMBRANA KDa
Cn	Sem impregnação		Membrana cerâmica de alumina sem impregnação
TPVC	-	Extrusão de PVC virgem	Sem impregnação

* impregnação interna; impreg (impregnação)

O suporte cerâmico MOLITA (BEGE), de alumina e zirconia, foi caracterizado por porosimetria, no laboratório de Materiais Cerâmicos da UCS. As amostras foram secas em estufa a 110°C por 24 h e após foram acondicionados em dessecador. O ângulo de contato do mercúrio foi de 140° e os ensaios foram realizados em baixa pressão, até 50 psi. Após, o

penetrômetro foi preenchido com mercúrio novamente e levado à câmara de alta pressão. Nesta, a pressão partiu de 20 psi e atingiu os 60.000 psi. O equipamento utilizado foi o da Quantachrome, modelo PoreMaster 60, conforme norma ASTM D4284-12. O suporte apresentou tamanho de poro de 5 µm.

Tabela 12. Método de impregnação de membranas tubulares poliméricas (suporte de polipropileno).

Identificação da membrana, polímero impregnado e concentração (%).	Tempo (h) e temperatura (°C) de impregnação	Temperatura e componente do banho de inversão (°C)	Observações
P1- PVDF 10%	1-40	Água- 25	
P2- PVDF 10%	2-40	Água -25	
P3- PVDF 10%	1-40	Vapor 10min	Banho de inversão com água 5°C
P4- PVDF 10%	1-40	Vapor 10min	Banho de inversão com água a 60°C
P5- PVDF 10%	1-40	Água -5	Reimpregnado e inversão com água a 60°C
P6- PVDF 10%	1-40	Etanol a 20%	Reimpregnação e inversão com etanol
P7- PVDF 10%	1-40	Água - 25	Ácido málico (0,5%) em PVDF
P8- PVDF 10%	1-40	Água - 25	PEG 6000 (0,5%)
P9- PVDF 10%	1-40	Água - 25	1(10%)+1(20%)
P10- PVDF 10%	1-40	Água - 25	3 impregnações a 10%
P13- PVDF 10%	1-70	Água - 25	Realizada limpeza mecânica e reimpregnada por 30min a 70°C
P14- PVDF 10%	1-70	Água - 25	Reimpregnada a 70°C por 30 min
P1a- PA66 10%	1-40	Água - 25	Sem compactar; impregnação só externa
P2a- PA66 17%	1-40	Água - 25	Sem compactar; impregnação só externa
P3a- PA66 14%	1-40	Água - 25	Sem compactar; impregnação só externa
P3b- PA66 10%	1-40	Água - 25	Sem compactar; impregnação só externa
P4b- PA66-17%	1-40	Água - 25	Sem compactar; impregnação só externa
P6a- PA6-20%	1-40	Água -25	Impregnação interna

*OBS. A identificação sem concentração polimérica refere-se à PVDF 10%

A compactação das membranas após a inversão de fases foi realizada a 3 atm durante 2 h, sendo que a pressão manométrica foi progressivamente elevada de 0,5 a 3 atm (Figura 7).

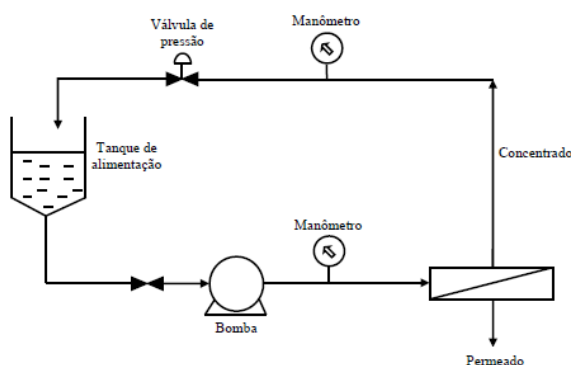


Figura 7. Fluxograma do sistema de compactação de membranas tubulares cerâmicas. (Fluxograma: Mônica Thurmer,2012)

3.4.2 Produção de membranas planas e ensaios a pressão reduzida

O polímero utilizado para a preparação de membranas planas foi o poli (fluoreto de vinilideno) conforme descrição na seção 3.4.1.

Também foram utilizados para o preparo das membranas, os polímeros poliamida 66 (PA66), poliamida 6 (PA6) e polissulfona (Psf) em diferentes concentrações, cujos solventes foram ácido clorídrico (HCl) e ácido fórmico, respectivamente.

Os não solventes utilizados para o preparo das membranas foram: água destilada, solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% (m/v) e solução a 20% (v/v) de álcool etílico.

As membranas planas (Tabela 13) foram preparadas pelo método de inversão de fases que consiste na imersão do filme de solução polimérica homogênea em um banho de coagulação contendo o não solvente, que foi mantido à temperatura constante. A solução polimérica foi então convertida numa estrutura sólida porosa devido à difusão do solvente para o banho de coagulação e do não solvente para a solução.

Foram preparadas membranas planas a partir de soluções com 10 a 20% (m/v) de PVDF em DMF, PA66 em HCl e Psf em ácido fórmico, sob agitação magnética por 24 h e aquecimento de $70 \pm 2^\circ\text{C}$. As soluções foram espalhadas sobre uma placa de vidro, com auxílio de uma faca de espalhamento de aço inox, com 0,2 a 0,5 mm de espessura. O sistema foi então imerso no banho de inversão de fases, com os diferentes não solventes. Após o banho de inversão, as membranas foram secas e armazenadas à temperatura ambiente (Figura 8). Os dados referentes à composição, à identificação, à espessura e ao banho de inversão estão apresentados juntamente com os resultados na Tabela 8. Os ensaios a pressão reduzida com membranas planas foi realizado durante 20 min utilizando água destilada e extrato enzimático.

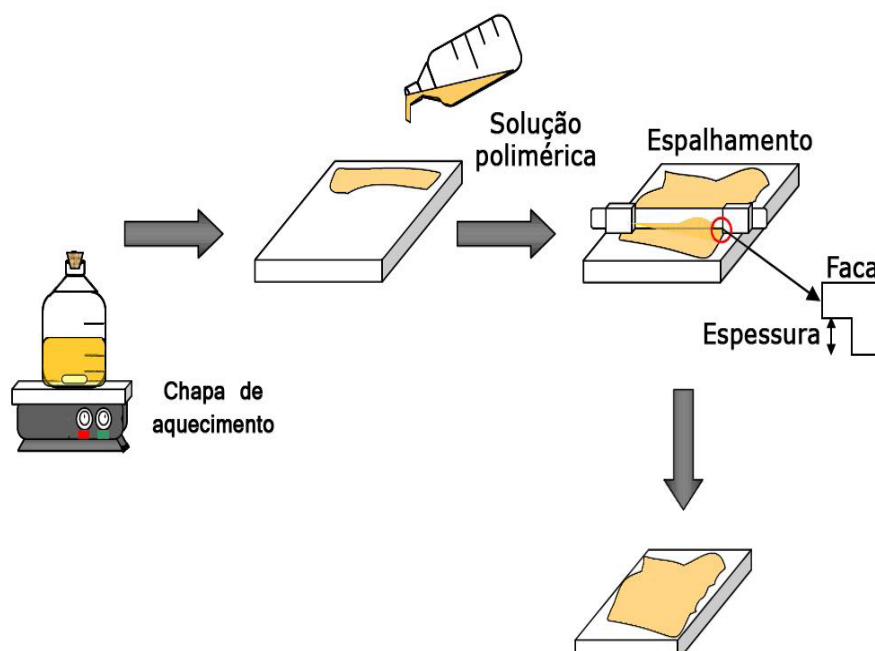


Figura 8. Fluxograma das etapas e condições utilizadas no preparo das membranas de PVDF. As membranas permaneceram no banho de inversão por 24 horas, em temperatura de 23 ± 2 °C. (Fluxograma Mônica Thurmer,2012)

As membranas planas com adsorventes (quitina e quitosana) foram preparadas da forma descrita anteriormente. A massa do adsorvente foi adicionada previamente à inversão de fases. A razão final da massa de adsorvente/polímero foi de 0,075 g/g.

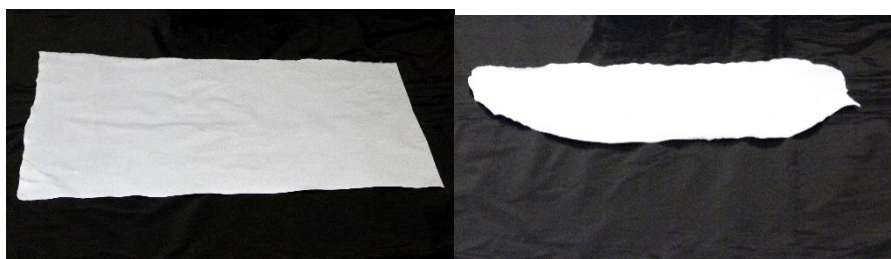


Figura 9. Membranas planas de Psf 17% (1,5 µm); Psf 17% (0,4 µm) produzidas pelo método de inversão de fases onde o não-solvente utilizado foi água.

Tabela 13. Membranas planas e PVDF, PA66 e Psf em ensaio a pressão reduzida com extrato enzimático contendo celulases e xilanases.

Identificação	Concentração polimérica (%)	Solvente	Espessura (μm)	Tempo de inversão de fases
PD5	PA66 (17%)	83% ácido fórmico	0,2 μm	10min
PD2	PA66 17%	em 83% ácido fórmico	0,2 μm	6 min
PC1	20% Psf	80% DMF	0,3 μm	30s evaporação sobre chapa
PC2	20% Psf	80% DMF	0,3 μm	10 s
A1	17% Psf	80% DMF	0,3 μm	3min evaporação sobre chapa
A2	17 Psf	83% DMF	0,02 μm	3 min
A3	17 Psf	83% DMF	0,02 μm	5 min
A4	17 Psf	83% DMF	0,2 μm	3 min
A2	17 Psf	83% DMF	0,2 μm	5 min
M5	20% PVDF	80% DMF	0,3 μm	3 min
M6	10% PVDF	90% DMF	0,05 μm	3 min

3.4.3 Preparo de *pellets* de PVDF contendo quitina e quitosana e ensaios de adsorção em cultivo submerso

Os *pellets* com diâmetro médio de 0,5 cm foram preparados a partir da solução polimérica de PVDF 10% (m/v) com inversão de fases feita por gotejamento em água destilada a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após foram secos em estufa a 50°C por 24 h.

A adição de *pellets* e de membranas planas contendo quitina, quitosana e PVDF ao cultivo em biorreator e em frascos Erlenmeyer foi realizada após 36 e 48 h de cultivo. Em ensaio de adsorção, as membranas planas de PVDF foram adicionadas ao meio a cada 12h iniciando a 0 h até 48 h de cultivo e permanecendo no mesmo por 12 h ou 24 h. Já a adição de *pellets* contendo carvão ativado foi realizada em 36, 48, 60 e 70 h do início dos cultivos. Os tempos de adição foram selecionados em função de estudos prévios onde foi constatado açúcar redutor livre.

Os *pellets* utilizados em biorreatores contendo adsorventes foram tratados com solução do agente reticulante glutaraldeído 2,5% por 24 h sob agitação e posteriormente, lavados e secos em estufas por 24 h. Para a desinfecção, os mesmos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 min e lavados com água destilada esterilizada.

3.5 Ensaios de retenção de proteínas do extrato enzimático e meio de cultivo a pressão reduzida

Para os ensaios de retenção de proteínas do extrato enzimático, um sistema a pressão

reduzida foi montado como está apresentado na Figura 10A. O extrato enzimático diluído foi mantido sob agitação em recipiente (1) à temperatura de 25°C e a membrana tubular, dentro de um tubo de proteção (2) (Figura 10B) foi colocada dentro do recipiente. A bomba a vácuo (3) foi utilizada para realizar a força motriz necessária para a filtração. Um *trap* de segurança (4) e um sistema de coleta (5) foram utilizados para evitar a entrada de líquidos na bomba e para a retirada das amostras.

A filtração por membranas (item 8 da Figura 10 C) em biorreatores (item 6 da Figura 10 C) foi realizada com bomba peristáltica (item 7 da Figura 10C) para circulação do meio e bomba a vácuo para remoção do permeado (Figura 10C). Mangueiras, módulo e dispositivos foram autoclavados por 15 min a 121°C. Como tratamentos para a esterelização as membranas foram tratadas com solução de azida sódica 0,5% (m/v) e após etanol 70% (v/v) e água destilada.

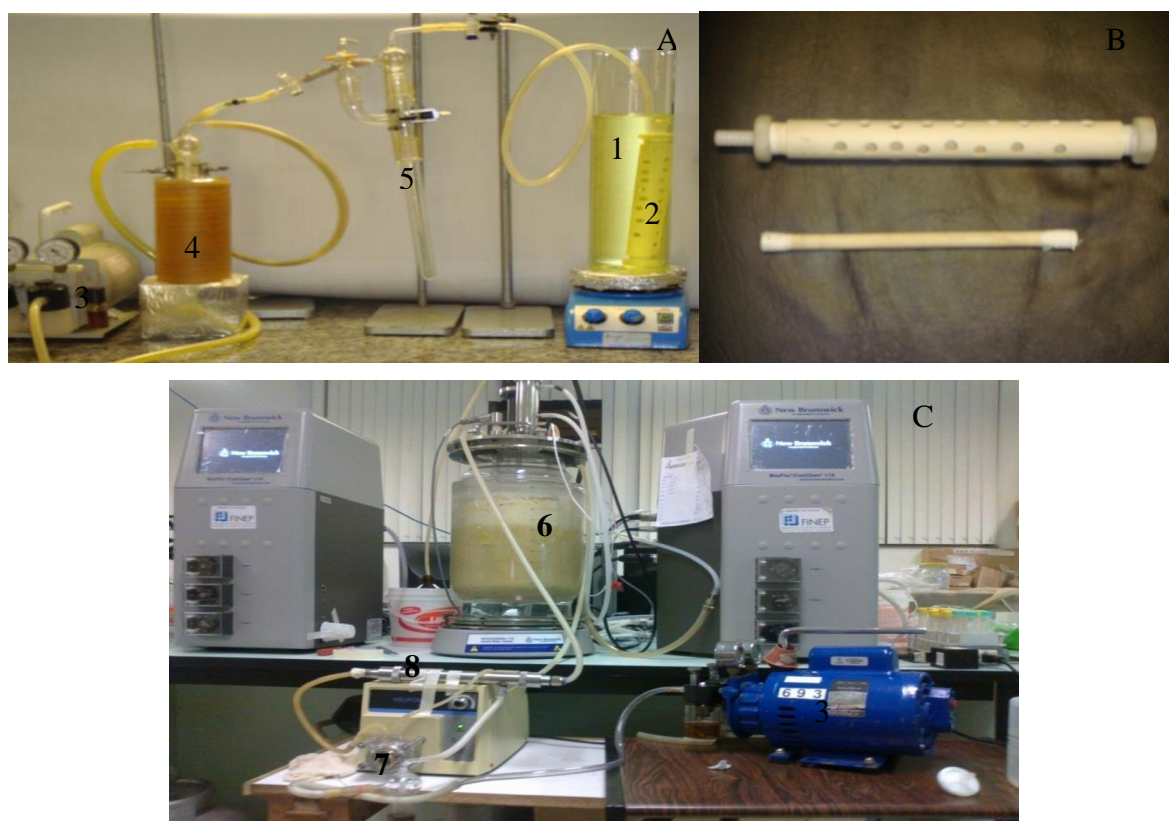


Figura 10. Sistema a vácuo para filtração de extrato enzimático (A) e membrana tubular com protetor (B) (Foto: Paulina Ampessan) e sistema de filtração em sistema *crossflow* utilizando bomba peristáltica para circulação do meio e bomba a vácuo para a remoção do permeado (C).

Sendo: Figura A : os números 1,2,3,4 e 5 representam respectivamente: extrato enzimático em recipiente de vidro, proteção tubular para membrana, bomba à vácuo, *trap* de segurança e *trap* para coleta de amostras.

Figura C: os números 6, 7 e 8 representam respectivamente: biorreator de agitação mecânica, bomba peristáltica e sistema de membranas tubulares.

3.6 Caracterização das membranas tubulares

3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram realizadas análises da superfície e da seção transversal das membranas com objetivo de verificar alterações na sua estrutura, resultantes do processo de preparação das mesmas. Para a observação da seção transversal, as membranas foram cuidadosamente fraturadas em nitrogênio líquido. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro por *sputtering*, com tempo de exposição de 2 min. As análises foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca Shimadzu, modelo SSX-550, com tensão de aceleração de 15 kV.

Para os ensaios de MEV em *pellets*, os mesmos foram previamente imersos em nitrogênio líquido para posteriormente fraturá-los e o preparo das amostras com ouro finamente particularizado.

3.6.2 Fluxo de água pura

O fluxo avalia a quantidade de permeado que atravessa a membrana por unidade de tempo e de área. As membranas planas, com área de $1,59 \times 10^{-3} \text{m}^2$, foram testadas com água em um sistema de permeação, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, nas pressões entre 1 e 20 atm, com prévia compactação das membranas. As medidas foram realizadas com intervalos de 2 atm e aguardou-se 15 min antes de cada coleta em triplicata, para estabilização do sistema. O fluxo de água permeada é dado pela Equação 3:

$$J_w = \frac{V}{A \cdot \Delta t} \quad (3)$$

sendo: J_w é o fluxo de água permeada ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$), V é o volume permeado (L), A é a área da membrana (m^2) e Δt é a variação do tempo (h).

Os ensaios a vácuo com membranas foram realizados durante 20 min e o volume do permeado coletado para análise de proteínas totais e FPA.

3.6.3 Eficiência de retenção

Foram realizados testes de retenção de proteínas totais, albumina (66 KDa) e glicose (0,18 KDa) para as diferentes membranas tubulares. Para alguns ensaios, utilizou-se, também, tripsina (72 KDa). Para ensaios com extrato bruto ou diluído, comparou-se a absorvância de

proteínas no início do processo com o permeado após ensaio. A eficiência das membranas na retenção de proteínas e AR foi determinada utilizando a Equação 4.

$$R(\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right).100 \quad (4)$$

sendo: C_p e C_a são as concentrações de proteínas ou AR no permeado e na alimentação (g.L^{-1}), respectivamente.

Os resultados dos ensaios compõem o capítulo 4.1 e os dados foram expressos em termos de proteínas totais quando foram realizados com extrato enzimático.

3.6.4 Compactação das membranas

As membranas preparadas foram colocadas em uma cela tubular de comprimento igual aos das membranas e inicialmente pressurizadas com água destilada a 0,5 atm até ser atingido fluxo estável. Substituiu-se a água por extrato enzimático de cultivo submerso sólida centrifugado para os ensaios em diferentes pressões. As pressões de trabalho foram 0,5, 1, 1,5 e 2 atm sendo gradualmente aumentada. Após a coleta do volume de permeado, foi realizada a análise de proteínas totais e FPA do permeado, comparando-se com o extrato inicial. Os ensaios foram realizados em um equipamento desenvolvido em escala de bancada.

3.6.5 Percentual de redução de fluxo

O percentual de redução de fluxo foi calculado (Equação 5) comparando o fluxo com água destilada e posteriormente com extrato enzimático e demais proteínas (Manttari, 2006). Determinou-se o fluxo de cada membrana com água destilada em ensaio a pressão reduzida e, posteriormente, aos demais ensaios, também utilizando água destilada.

$$Redução(\%) = \left(1 - \frac{J_w}{J_a}\right).100 \quad (5)$$

Sendo: J_w ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$): o fluxo em ensaio a pressão reduzida utilizando água destilada depois dos ensaios com extrato enzimático e J_a ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$): o fluxo de água antes dos ensaios.

3.7 Zimogramas para proteínas totais

Para a determinação da massa molecular das proteínas das amostras e do permeado, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (8,5 cm x 7,5 cm x 0,1 cm) contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com 1,5 cm de gel de concentração 12% e 6 cm de gel para a separação das proteínas 4% segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi realizada a 200 V por 1 h.

A solução tampão da amostra para proteínas possuía 2,5 mL de glicerol, 2 mL de solução de SDS 10%, 0,2 mL de solução de azul de bromofenol 0,5%, 1,25 mL de tampão Tris-HCl pH 6,8 e 3,55 mL de água destilada.

Em microtubos de 2 mL foi feita a precipitação das amostras com acetona (1:2) a temperatura de -20°C por 15min. Após, as amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi solubilizado em 25 µL de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel.

O marcador de massa molecular utilizado foi o Precision Plus Protein™ Standards All Blue (Bio Rad). A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical Bio Rad Mini-Protean Tetra System®.

A revelação das bandas do gel foi realizada com incubação do gel durante 30 min em solução de 0,2% de *Coomassie Brilliant Blue G 250*, 50% etanol e 10% de ácido acético. Após, o gel foi lavado com água destilada e imerso em solução de 50% etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos. Este processo foi realizado sob agitação em 60 rpm e repetido duas vezes.

Os resultados do zimograma são apresentados no artigo 4.1.

3.8 Estudo da adsorção de glicose e enzimas por banho finito

A adsorção de enzimas e glicose em solução aquosa por carvão ativado, quitina e quitosana foi avaliada pela metodologia do banho finito. Estudo da constante de equilíbrio da adsorção foi realizado pelo modelo de isotermas. A adsorção foi calculada (q_E , mg. g⁻¹) a partir da concentração inicial de açúcar e a concentração final na solução em diferentes tempos a partir de balanço de massa (equação 5), onde V é o volume reacional (L) da solução e C_0 é a concentração inicial adsorvida de açúcar ou proteína (g.L⁻¹), C_E , a concentração final e m é a massa de adsorvente (g). Os ensaios de adsorção foram realizadas a 25°C e a solução foi agitada a 50 rpm por 60 min.

A massa de adsorventes em *pellets* de PVDF foi adicionada em Erlenmeyer fechado contendo 50 mL de solução enzimática diluída proveniente de cultivo em estado sólido de *P.*

echinulatum de concentração protéica e (FPA) conhecidas e em solução 0,01 mol.L⁻¹ de glicose (Banho Finito). As amostras de 1 mL foram coletadas a cada 10 minutos e posteriormente foi determinada a concentração de proteína, açúcar redutor e a atividade enzimática para a determinação da massa adsorvida no pico máximo de adsorção por unidade de massa de adsorvente, q_E , pela Equação 6

$$q_E = \frac{V \cdot (C_o - C_E)}{m_c} \quad (6)$$

A eficiência de remoção foi expressa em percentual de adsorção conforme a Equação 7:

$$Eficiência(\%) = \frac{(C_o - C_E) \cdot 100}{C_o} \quad (7)$$

Sendo: C_o e C_E referem-se à concentração inicial e final de açúcar (mg.L⁻¹), respectivamente.

Os resultados do ensaio foram apresentados no artigo 4.3.

3.9 Métodos analíticos para determinação de enzimas e proteínas totais

3.9.1 Determinação da atividade em papel de filtro (FPA)

Para a dosagem de celulasas, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel-filtro, conforme Ghose (1987), modificado, segundo Camassola e Dillon (2012). Em uma placa de poços, foi adicionado 10 µL da amostra ou de diluições apropriadas e volume de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ a pH 4,8 para completar 100 µL de volume reacional. Adicionou-se em cada poço 0,50 µg de papel-filtro (*Whatman* n°1) em tiras, por 60 min em banho a 50°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 300 µL da solução do reagente DNS e a placa colocada em banho-maria a 100°C por 5 min. Após resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se 200 µL de água destilada e a absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro a 545 nm.

A solução para a dosagem de açúcares redutores, descrita por Miller (1959), foi composta por: ácido 3,5-dinitrosalicílico (2,12 g), hidróxido de sódio (3,92 g), tartarato de sódio e potássio (61,2 g), fenol (1,52 g), metabissulfito de sódio (1,66 g) e água destilada (283,3 mL).

3.9.2 Determinação de endoglicosidases

A determinação da atividade de endoglicosidases foi realizada conforme Ghose (1987), modificado, segundo Camassola e Dillon (2012) empregando-se 40 μL de solução de carboximetilcelulose (CMC) 20 g. L^{-1} em placa de poços, ao qual foi acrescentado (verificar que o volume deve ser constante) volume correspondente à diluição apropriada da solução enzimática. A placa contendo essas soluções foi colocada em banho a 50°C por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μL da solução do reagente DNS e posteriormente com a solução reagente foram fervidos a 100°C por 30 min. Após, as amostras foram diluídas e absorvância foi determinada a 545 nm, utilizando uma curva padrão de glicose.

A solução de CMC foi preparada em tampão citrato 0,05 M pH 4,8, sendo adicionado 0,1 mL da solução de azida sódica 5 g. L^{-1} .

3.9.3 Determinação de β -glicosidases

A determinação da atividade de β -glicosidases será realizada empregando-se a metodologia descrita por Daroit (2008) utilizando p -nitrofenil- β -D-glicosídeo (p NPG) como substrato. Uma mistura reacional contendo 10 μL de solução enzimática e 90 μL de p NPG a 1 mg. mL^{-1} em tampão citrato de sódio 0,05mol. L^{-1} pH4,8 foi incubada a 50°C por 30 min, sendo interrompida com a adição de 200 μL de uma solução Na_2CO_3 10%. As amostras foram estimadas espectrofotometricamente por leitura da absorvância a 405 nm e com quantificação por reta de calibração.

A reta de calibração foi realizada com diferentes concentrações de soluções de p -nitrofenil- β -D-glicosídeo. Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar por hidrólise 1 μmol de p -NPG por minuto nas condições do ensaio.

3.9.4 Determinação de celobioidrolases

Para a determinação da atividade de celobioidrolases (CBH), foi utilizado como substrato o p -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (p NPC), empregando-se a metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984). Uma mistura reacional contendo 10 μL de solução enzimática e 90 μL de p -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (p NPC 1 mg. mL^{-1} em tampão citrato de sódio 0,05 mol. L^{-1} a pH 4,8) foi incubada a 50°C por 30 minutos, sendo interrompida com a adição de 200 μL de uma solução Na_2CO_3 10%. As amostras foram estimadas espectrofotometricamente

por leitura da absorbância de ρ -nitrofenol a 405 nm.

As concentrações de celobioidrolases presentes nas amostras foram determinadas através de reta de calibração construída com soluções de ρ -nitrofenol $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 4,8 com concentrações de 0, 0,04, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2, 1,6 e 2 mmol.L^{-1} . Uma unidade de atividade de celobioidrolase foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ρ -nitrofenol por minuto.

3.9.5 Determinação de xilanases

A determinação da atividade de xilanases seguiu a metodologia de Bailey *et al.* (1992). A determinação da atividade enzimática ocorreu com a adição de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solução enzimática em placa de poços e $900 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de xilana 20 g.L^{-1} preparada em tampão citrato de sódio $0,05 \text{ M}$, pH 4,8, sendo adicionado $0,1 \text{ mL}$ da solução de azida sódica $0,5\%$.

A placa contendo a mistura reacional ficou em banho a 50°C por 30 minutos. Após, adicionaram-se $300 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de DNS, interrompendo a reação. A mistura foi colocada em banho-maria a 100°C por 5 min, resfriada, diluída com água destilada e medida a absorbância a 545 nm, utilizando uma curva padrão de xilana.

3.9.6 Determinação de proteínas totais

Para a determinação quantitativa das proteínas solúveis, foi utilizado o método de Bradford (1976). Foi construída a curva de calibração, utilizando-se soluções padrão albumina bovina com concentrações entre 2 e $30 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a determinação das proteínas das amostras, a reação foi realizada pela mistura de 1 mL da amostra devidamente diluída, quando necessário, e $500 \text{ }\mu\text{L}$ do reagente de Bradford. Depois de transcorridos 10 min, o complexo foi quantificado a 595 nm.

3.10 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram submetidos à análise de variância (*One-Way* ANOVA) e pós-teste de Tukey para um nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$), utilizando-se o programa computacional Prism GraphPad.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tese encontra-se organizada em seis artigos intitulados:

4.1 Retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares impregnadas com solução de PVDF e PA.

4.2 Remoção por filtração de açúcares causadores de repressão catabólica durante produção de celulasas e xilanases.

4.3 Adsorção de repressores catabólicos favorecem a produção de celulasas e xilanases em cultivo submerso por *Penicillium echinulatum*

4.4 Adsorção de repressores catabólicos durante a produção de celulasas e xilanases em biorreatores por *Penicillium echinulatum*.

4.5 Incremento na produção de celulasas e xilanases através da remoção de açúcares por Nanofiltração.

4.6 Nanofiltração na remoção de inibidores de celulasas durante cultivo submerso de *Trichoderma reesei*.

4.1 Retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares impregnadas com solução de PVDF e PA

O primeiro artigo se refere à produção de membranas tubulares com suporte cerâmico e polimérico impregnadas com os polímeros PVDF e PA66. Os resultados relativos à permeabilidade e à seletividade das membranas impregnadas foram comparados aos de membranas de nanofiltração comerciais N5 e N10, produzidas pela empresa Andritz.

Após a produção das membranas, estas foram utilizadas em ensaios em biorreatores e em frascos sob agitação para a remoção de possíveis substâncias causadoras de repressão catabólica.

Também foi testado o processo de adsorção como mecanismo para remoção dessas substâncias. A adsorção foi testada com adsorventes *in natura*, em *pellets* e em discos poliméricos. O processo de adsorção foi realizado em biorreatores durante o cultivo submerso para verificar o efeito da remoção de parte da fase líquida na ação de repressão catabólica ao microrganismo.

O artigo foi publicado na Revista Iberoamericana de Polímeros (Toderó Ritter, et al., 2015).

RETENÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR MEMBRANAS TUBULARES IMPREGNADAS COM SOLUÇÃO DE PVDF E PA

Carla Eliana Todero Ritter^{1,2}, Jéssica Bonatto², Rafaela Zortea², Joicei Duarte², Mára Zeni²,
Aldo José Pinheiro Dillon¹

1. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, UCS– Caixa Postal 1352, 95070–560, Caxias do Sul, RS, Brasil (cetodero@gmail.com)
2. Laboratório de Química de Materiais, Universidade de Caxias do Sul, UCS, 95070–560, Caxias do Sul, RS, Brasil

Resumo: A bioconversão de lignocelulósicos a etanol consiste em operações que compreendem o pré-tratamento, a hidrólise, o cultivo, a separação e purificação de produtos. Uma maneira eficaz para reduzir a repressão catabólica pelos produtos da hidrólise e a inibição enzimática por produto e substrato é o uso de membranas em operação de filtração. A membrana tubular de MOLITA impregnada com poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF – 10%) apresentou resultados similares às membranas comerciais da *Andritz* (N5 e N10). A membrana tubular polimérica P4 impregnada com poliamida 66 (PA66 – 17%) apresentou redução do fluxo permeado e aumento na retenção de proteínas totais em relação à membrana P3 impregnada com PA66 (10%). A impregnação dos suportes tubulares por soluções poliméricas acarretou aumento na retenção de enzimas celulolíticas.

Palavras-chaves: membrana, celulasas, nanofiltração, PVDF, PA66

Abstract: Bioconversion of lignocellulosic ethanol consists of complex operations such as pre-treatment, hydrolysis, fermentation, separation and purification of products. An effective way to reduce hydrolysis by catabolite repression and enzymatic inhibition product and substrate and products is the use of membranes in the filtration process. The molite tubular membrane impregnated with poly (vinylidene fluoride) (PVDF – 10%) gave results similar to commercial membranes *Andritz* (N5 and N10) results. The polymer P4 tubular membrane impregnated with polyamide 66 (PA66 – 17%) showed a decrease of permeate flux and an increase in retention of protein relative to total membrane impregnated with PA66 (10%) P3. The impregnation of tubular supports for polymer solutions resulted increase in the retention

of cellulolytic enzymes.

Keywords: membrane, cellulases, nanofiltration, PVDF, PA66

1. INTRODUÇÃO

A conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustível deverá diminuir a dependência de fontes fósseis, assegurando maior estabilidade energética e mudança às agressões ambientais associadas ao uso do petróleo. A biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida como uma matéria-prima alternativa para a produção de bioetanol. Dada a demanda por energia, a possibilidade de se utilizar etanol em substituição à gasolina é cada vez mais atraente, tendo o benefício adicional à redução nos níveis de emissão de gases de efeito estufa [1].

Celulase é o nome genérico para um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de celulose e celooligossacarídeos relacionadas. A ação sinérgica dos três tipos de enzimas que compõem as celulases, endo-1-4- β -glicanase (EG, EC 3.2.1.4), celobiohidrolase (CBH, EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (BGL, EC 3.2.1.21), é essencial para a hidrólise enzimática completa [2].

Estudos de PCR quantitativo mostraram que a celulose, lactose, celobiose, sorbose e sofrorose apresentam capacidade de indução de exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases [3], enquanto que celobiose e glicose diminuem significativamente a taxa de hidrólise de celulose e são considerados inibidores de enzimas celulolíticas e causadores de repressão catabólica no fungo *Trichoderma reesei*.

A remoção de açúcares de rápido metabolismo durante a obtenção de celulases e xilanases pode aumentar a atividade enzimática no meio e reduzir o efeito da repressão catabólica. O referido processo pode ser realizado com o uso de membranas seletivas para retirada de inibidores, na produção de complexos enzimáticos, visando à tecnologia do bioetanol.

A separação utilizando membranas pode ocorrer por diferença na interação dos permeantes com o material que forma a membrana (mecanismo de sorção-difusão) ou por exclusão devido à diferença de tamanho entre as partículas ou moléculas. Na primeira situação, as membranas são consideradas densas, ou seja, o transporte dos permeantes ocorre por processos difusivos através dos espaços intersticiais (volume livre) do material que forma a membrana. Na segunda situação, as membranas são consideradas porosas e o transporte

ocorre preferencialmente através dos poros, predominando o mecanismo de transporte convectivo. Desta forma, a aplicação de determinada membrana depende basicamente de sua morfologia e do material que a constitui [4].

Este trabalho tem por objetivo produzir e caracterizar membranas de configuração tubular com suporte cerâmico impregnado com polímeros PA66 e PVDF, e compará-las às membranas comerciais, avaliando-as com relação à permeabilidade e à seletividade na retenção de proteínas totais e enzimas celulolíticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Polímeros utilizados no preparo das membranas. Os polímeros utilizados na preparação das membranas foram a poliamida 66 (PA66) comercial da *Alfa Química* e o poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) *SOLEF 1015/0078* fornecido pela *Solvay Solexis*. O solvente para a PA66 foi o ácido clorídrico (HCl) 37% da *Merck do Brasil* e para o PVDF, o *N,N*-dimetilformamida (DMF) 99,8% fornecido pela *Vetec Química*. Os tubos cerâmicos foram fornecidos pela *Tecnicer Tecnologia Cerâmica Ltda*, e os tubos de polipropileno fornecidos pela *Union Ind. de Fibras Plásticas Ltda*.

Preparação das membranas. Os suportes tubulares cerâmicos de α -alumina (C), de sílica e α -alumina (MOLITA) e poliméricos de polipropileno (PP), foram impregnados com soluções de PA66 e PVDF em diferentes concentrações. A porosidade média dos suportes MOLITA é de 5 μm , segundo método definido pela norma ASTM D4284 [5] e realizado no *Instituto de Materiais Cerâmicos (IMC)* da Universidade de Caxias do Sul.

A impregnação do suporte foi realizada durante 40 minutos a 40°C, mas somente externamente. A temperatura do banho de inversão de fase foi mantida 25°C, utilizando-se água destilada como não solvente por 24 h (Tabela 1).

As membranas tubulares com suporte polimérico (PP) e de suporte cerâmico (α -alumina) possuíam 8 mm de diâmetro interno, e 11 e 13 mm de diâmetro externo, respectivamente. O comprimento das mesmas de 198 mm e 210 mm para as membranas poliméricas e cerâmicas respectivamente.

Com objetivo de comparações, as membranas tubulares comerciais *Andritz*, N5 e N10 foram caracterizadas pela empresa com *cut off* molecular de $5 \cdot 10^3$ a $1 \cdot 10^4$ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente. As membranas comerciais possuem 6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento.

Ensaios à pressão reduzida com extrato enzimático. Os ensaios foram realizados,

em sistema à pressão manométrica reduzida (580 mm Hg) e à temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$, com água e extrato enzimático proveniente de cultivo em estado sólido de *Penicillium echinulatum*. O extrato enzimático diluído e centrifugado a 4°C foi produzido com 1 g de celulose, 0,5 g de farelo de trigo e 1 mL de solução de sais [6]. Os ensaios utilizando-se somente os suportes cerâmicos e poliméricos foram realizados anteriormente à impregnação dos mesmos.

Tabela 1. Membranas com seus respectivos solventes e concentrações.

Membrana	Impregnação (solução polimérica)	Solvente
MOLITA	SI	SI
MOLITA I	PVDF (10%)	DMF
PP0	Suporte de polipropileno	SI
PP1	PVDF (10%)	DMF
PP2	PA66(10%)	HCl
PP3	PA66(17%)	HCl
C0	Suporte cerâmico	SI
C1	PVDF (10%)	DMF
C2	PA66(10%)	HCl
C3	PA66(17%)	HCl
N5	SI	SI
N10	SI	SI

SI: sem impregnação

Fluxo de permeado. Os ensaios de fluxo permeado foram realizados utilizando água destilada antes e após os ensaios com extrato enzimático. O fluxo segue expresso conforme a Equação 1:

$$J = \frac{V}{A \cdot \Delta t} \quad (1)$$

Sendo: J fluxo de permeado ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$), V volume (L), A área superficial da membrana (m^2) e Δt tempo de ensaio (h).

Os ensaios para determinação do fluxo de permeado foram realizados em duas etapas: a primeira succionando o extrato enzimático para fluir para dentro da membrana tubular com o auxílio de bomba a vácuo e o outro em modo *crossflow* com o auxílio de bomba *Carretos*, a fluxo constante.

Efeito do Fouling. A fim de analisar o efeito do *fouling* evidenciado pela redução do fluxo após o ensaio com extrato enzimático, os ensaios à pressão reduzida foram realizados

em três etapas: inicialmente com água destilada, posteriormente com extrato enzimático e novamente com água destilada. Entre os ensaios, as membranas submetidas à limpeza química utilizando solução de hidróxido de sódio a 1,0% (m/v). O coeficiente de *fouling* (CF) denota o grau de obstrução dos poros da membrana após o ensaio. O CF foi obtido a partir de medidas do fluxo com água antes e após o teste com extrato enzimático. O índice foi calculado pela Equação 2:

$$C_f = \left(1 - \frac{J_w}{J'_w}\right) \cdot 100 \quad (2)$$

sendo: C_f coeficiente de *fouling* (%), J_w fluxo permeado de água inicial ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$) e J'_w fluxo permeado de água após o ensaio com extrato enzimático ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$).

Resistência total da membrana. A resistência total (R_t) da membrana foi expressa pela Equação 3

$$R_t = \frac{\Delta P}{\mu \cdot J_w} \quad (3)$$

sendo R_t a resistência total ($m^2 \cdot L^{-1}$), ΔP a diferencial de pressão (Pa), μ a viscosidade da solução permeada (Pa·s), e J_w : o fluxo de permeado do ensaio para determinação do efeito da redução do fluxo ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$).

Análise enzimática e de proteínas totais. Para análise de retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares, determinou-se a atividade enzimática sobre papel-filtro (FPA). Para a dosagem de celulasas, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel-filtro [8], a dosagem de açúcares redutores foi realizada utilizando glicose como padrão [9] e, para a determinação de proteínas totais, utilizou-se a metodologia definida por *Bradford* [10].

Aplicação de SDS–PAGE para detecção de proteínas. Para a determinação da massa molecular das proteínas das amostras e do permeado foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (8,5 cm·7,5 cm·0,1 cm), contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE), 1,5 cm de gel de concentração 12% e 6 cm de gel para separação das proteínas 4% [10]. A corrida eletroforética foi realizada a 200 V por 1 h.

O tampão da amostra para proteínas possuía 2,5 mL de glicerol, 2 mL de solução de SDS 10%, 0,2 mL de solução de azul de bromofenol 0,5%, 1,25 mL de tampão Tris–HCl com

pH 6,8 e 3,55 mL de água destilada.

Em microtubos de 2 mL foi feita a precipitação das amostras com acetona (1:2) a –20°C por 15 min. Após, as amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi solubilizado em 0,025 mL de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel.

O marcador de massa molecular utilizado foi o *Precision Plus Protein™ Standards All Blue (BioRad)*. A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical *BioRad Mini-Protean Tetra System®*.

A revelação das bandas do gel foi realizada por incubação do gel durante 30 minutos em solução de 0,2% de *Coomassie Brilliant Blue G 250*, 50% de etanol e 10% de ácido acético. Após, o gel foi lavado com água destilada e imerso em solução de 50% de etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos. Este processo foi realizado sob agitação de 60 rpm e realizado em duplicata.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram realizadas análises da superfície e da seção transversal das membranas com objetivo de verificar alterações na sua estrutura, resultantes do processo de preparação das mesmas. Para a observação da seção transversal, as membranas foram cuidadosamente fraturadas em nitrogênio líquido. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro por *sputtering*, com tempo de exposição de 2 min. As análises foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca *Shimadzu*, modelo SSX–550, com tensão de aceleração de 15 kV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise por MeV. A morfologia da membrana C1 analisada por microscopia eletrônica de varredura (MeV) apresenta-se com uma camada bem definida de polímero sobre a estrutura cerâmica externa (Figura 1). Entretanto, essa camada apresenta algumas irregularidades, o que pode estar relacionado com a inversão de fases (Figura 1A).

A estrutura da superfície das membranas depende fortemente das taxas de saída e entrada de solvente e não solvente na solução polimérica, respectivamente. De acordo com *Chuang et al.*[12], a camada densa é formada quando o solvente presente na solução polimérica migra para o banho de coagulação antes que o não solvente migre para a solução polimérica. A camada densa para de crescer quando o não solvente suficiente difunde nas subcamadas para a formação de poros. Caso contrário, ocorre formação de poros na superfície da membrana (Figura 1C).

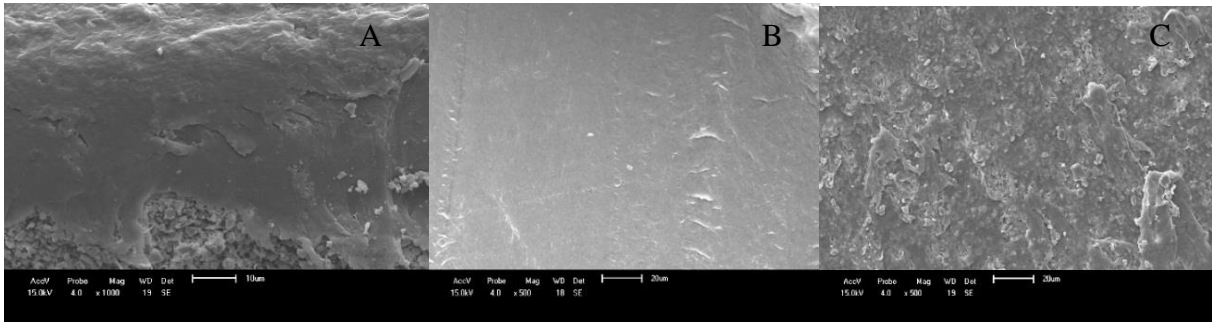


Figura 1. Micrografias de varredura eletrônica (MEV) da membrana cerâmica C1 (A,B,C)

Caracterização das membranas com relação ao fluxo permeado e ao *fouling*. A partir dos ensaios de pressão negativa realizados com membranas tubulares com água e com extrato enzimático, observou-se que o fluxo das membranas N5 e N10 reduziram drasticamente nos ensaios com extrato enzimático. O *fouling* reduziu o fluxo nas membranas N5 e N10 que apresentaram queda de 65% e 68%, respectivamente, quando o ensaio foi realizado com extrato enzimático. Essa redução deve-se à obstrução dos poros da membrana em função do acúmulo de proteínas durante os ensaios com extrato enzimático e demais proteínas (Tabela 2).

Tabela 2. Fluxo máximo de permeado em ensaio a pressão manométrica de 580 mmHg com água destilada inicial e com extrato enzimático para membranas tubulares comerciais N5 e N10, MOLITA, MOLITA I e PP3.

	Fluxo em ensaio com água destilada (L·m ⁻² ·h ⁻¹)	Fluxo em ensaio com extrato enzimático (L·m ⁻² ·h ⁻¹)
N5	80	50
N10	120	70
MOLITA	170	160
MOLITA I	150	130
PP2	957	648
PP3	43	38

A membrana PP2 apresentou fluxo máximo de água destilada de 957 L·m⁻²·h⁻¹ e após o ensaio com extrato, o efeito do *fouling* reduziu o fluxo para 648 L·m⁻²·h⁻¹, apresentando assim maior fluxo e retenção de proteínas responsáveis por FPA em relação à MOLITA. A redução do fluxo foi maior na membrana PP3 (PA66 17%) em relação à membrana PP2 (Figura 2).

A impregnação da membrana MOLITA I favoreceu a retenção de proteínas e de enzimas do complexo celulolítico (Tabela 4), quando comparada à MOLITA sem

impregnação, entretanto, o *fouling* reduziu o fluxo permeado em 89% (Tabela 2). Houve maior redução do fluxo de permeado para as membranas cerâmicas impregnadas com 10% de PA66 (C2) quando comparada à respectiva polimérica (PP2). Essa redução pode estar associada à porosidade do suporte e à formação de filme aderido à mesma. Observou-se que, com o aumento da concentração de poliamida, houve um decréscimo no fluxo de permeado de água (C2 e C3).

Tabela 3. Coeficiente do *fouling* (CF) nas membranas tubulares em ensaios realizados com água e extrato enzimático.

Membrana	Coeficiente do fouling (CF) (%)	Resistência da membrana R_t $m^2 \cdot mL^{-1} \cdot 10^{-9}$	Resistência devido ao fouling R_f $m^2 \cdot mL^{-1} \cdot 10^{-9}$
MOLITA	56	29,3	3,18
MOLITA I	89	13,7	12,5
PP1	48	ND	ND
PP3	26	92,1	30,7
PP4	70	4,93	1,44
C1	43	ND	ND
C4	63	ND	ND
C5	30	ND	ND
N5	16	3,19	1,81
N10	69	3,1	2,95

ND: não determinado

A membrana C1 apresentou CF menor que a PP1 evidenciando que o filme polimérico reteve maior quantidade de partículas obstruindo os poros da mesma. As membranas N5 e N10 apresentaram resistências similares, entretanto, a N10 apresentou maior CF (69%) em relação à membrana N5 (16%). Os ensaios repetitivos com meio completo produziram redução drástica no fluxo de permeado na membrana N5 (Figura 5B). O fluxo de permeado foi máximo ($300 L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$) quando a membrana estava isenta de partículas nos poros e velocidade de circulação de $3 m \cdot s^{-1}$ e em diferentes velocidades de remoção do permeado (Figura 2). Após cinco ensaios de circulação com meio completo, houve redução do fluxo máximo ($153 L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$) nas mesmas condições (Figura 2C).

Retenção de enzimas e proteínas totais. A retenção de enzimas celulolíticas por membranas durante o cultivo submerso pode ser uma alternativa para que a remoção de inibidores produzidos durante a produção enzimática apresente um aumento da produtividade volumétrica do processo. Celobiose e glicose são inibidores que causam repressão catabólica em fungos e inibem a atividade enzimática de enzimas celulolíticas [13]. Sendo assim,

açúcares redutores, quando retirados durante a hidrólise, podem ser novamente adicionados ao sistema para serem fermentados diretamente na produção de bioetanol [14].

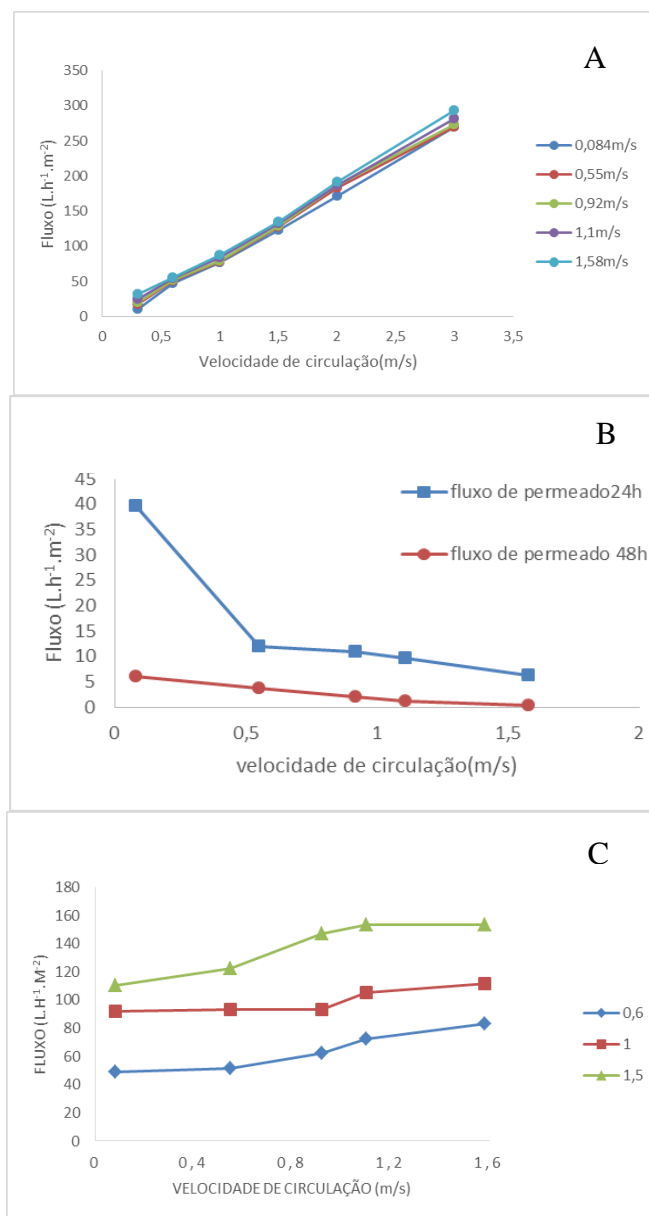


Figura 2. Fluxo de permeado em ensaio com meio de cultivo completo utilizando membrana de nanofiltração (N5). Sendo: A: ensaio com água destilada e membrana limpa; B: ensaio de nanofiltração com meio de cultivo completo de 48h; C: ensaio com água destilada após ensaio com meio de cultivo completo.

O percentual de retenção de proteínas totais e de enzimas celulolíticas foi expresso em função das diferentes concentrações poliméricas utilizadas para a impregnação dos suportes das membranas tubulares (Tabela 4). Os ensaios com água destilada e extrato enzimático realizados nos suportes, previamente à impregnação, demonstraram que os

suportes poliméricos apresentam maior fluxo permeado em relação aos cerâmicos, mas em relação à seletividade, o suporte cerâmico apresentou-se mais seletivo que o polimérico.

Tabela 4. Resultados da retenção de atividade de enzimas celulolíticas (FPA) e proteínas totais por membranas

Membrana	Retenção (%)	
	FPA	Proteínas Totais
MOLITA	7	35
MOLITA I	80	67
PP0	25	18
PP1	67	50
PP2	28	56
PP3	38	12
C0	12	15
C1	88	66
C2	54	16
C3	10	23
N5	81	43
N10	85	36

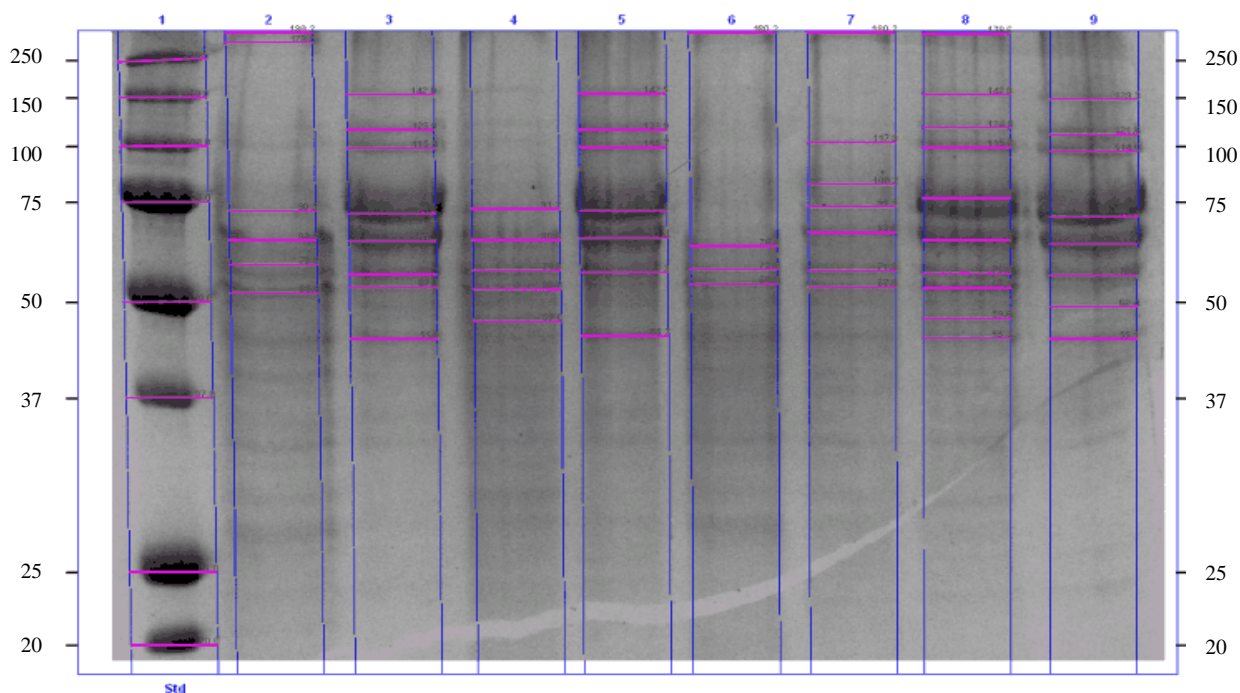


Figura 3. Zimograma de proteínas totais das membranas MOLITA, MOLITA I, C2 e P2. Da esquerda para direita: (1) marcador padrão, (2) MOLITA permeado, (3) MOLITA extrato, (4) MOLITA I permeado, (5) MOLITA I extrato, (6) C2 permeado, (7) C2 extrato, (8) P2 permeado, (9) P2 extrato.

A análise de retenção demonstra que as membranas MOLITA I e C1 apresentaram resultados de retenção de proteínas totais superiores às membranas comerciais N5 e N10 em

ensaio com extrato enzimático. Enzimas de massa molecular superior a $75 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ foram removidas pelas membranas MOLITA e MOLITA I, enquanto que a membrana P3 não reteve nem as enzimas maiores que $150 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Figura 1). Chauves *et al.*[15] citaram que a massa molecular aparente de β -glicosidasas de *T.reesei* (BGL1) é de $117 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, enquanto que a teórica é de $75 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Matos [16] investigou o perfil proteico do sobrenadante de cultivo com bagaço de cana por *P. echinulatum* e verificou que xilanases apresentam bandas intensas entre a massa molecular de $60\text{--}70 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e de intensidades entre $100 \cdot 10^3$ e $55 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. As membranas MOLITA, MOLITA I e C3 retiveram as enzimas xilanases de $10 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, mas não retiveram as de massa molecular maiores que as citadas (Figura 3).

4. CONCLUSÃO

Observou-se que a retenção de proteínas totais permite o uso das membranas de PVDF em ensaios com extrato enzimático na remoção de possíveis repressores catabólicos e inibidores enzimáticos que diminuem a atividade enzimática de celulasas, possibilitando aumentando a sua produtividade.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a CNPq pelo apoio técnico e financeiro na realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Camassola, M.; Dillon, A.J.P. J. Applied. Microbiol., 103, 1204 (2007).
- [2] Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. Bioresour. Technology, 99, 1417 (2008).
- [3] Verbeke, J.; Coutinho, P.; Mathis, H.; Quenot, A. Biotechnol Lett., 31,1399 (2009)
- [4] Costa, A.C.M. Teses doctoral, COPPE-UFRJ (2009).
- [5] ASTM D4284 – 12. Standard Test Method for Determining Pore Volume Distribution of Catalysts and Catalyst Carriers by Mercury Intrusion Porosimetry. Active Standard ASTM D4284.
- [6] Mandels, M.; Reese, E.T. J. Bacteriology, 73, 269 (1957).
- [7] Manttari, M.; Viikko, K.; Nystrom, M. J. Membrane Science, 272, 152 (2006).
- [8] Camassola, M.; Dillon, A.P.D. J. Analytical & Bioanalytical Techniques, 1, 1 (2012).

- [9] Miller, G. *Anal Chem.*, 31, 426 (1959).
- [10] Bradford, M.M. *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976).
- [11] Laemmli, U.K. *Nature*, 227, 680 (2010).
- [12] Chuang, W.Y.; Young, T.H.; Chiu, W.Y.; Lin, C.Y. *Polymer*, 41, 5633 (2000).
- [13] Andrić, P.; Meyer, A.S.; Jensen, P.A.; Johansen, K.D. *Applied.Biochem.Biotechnology*, 160, 280 (2010).
- [14] Chauve, M.; Mathis, H.; Huc, D.; Casanave, D.; Monot, F.; Ferreira, N.L. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 3 (2010).
- [15] Matos, R.W.A. Tese doutoral. Universidade de Brasília , BR, 1(2012)

4.2 Remoção por filtração de açúcares causadores de repressão catabólica durante produção de celulases e xilanases

A partir do exposto no artigo 4.1, verificou-se que a membrana de suporte cerâmico impregnada com PVDF a 10% apresentou resultados satisfatórios em relação a seletividade e fluxo, assim optou-se por utilizá-la nos próximos ensaios (Toderó Ritter, 2015). As membranas poliméricas apesar de apresentarem grande fluxo de permeado, apresentaram elevada permeabilidade para substâncias que deveriam ficar retidas, o que não as tornam membranas aplicáveis ao processo de filtração em cultivos submersos.

Os ensaios deste artigo apresentam dados referentes à atividade enzimática de celulases e xilanases em cultivo submerso após a remoção da fase líquida do cultivo. Nesses ensaios, removeu-se a fase líquida, rica em AR, a fim de verificar o efeito na atividade enzimática possivelmente decorrente de modulação na repressão catabólica.

Nos ensaios em frascos agitados a remoção foi realizada, inicialmente, com membrana plana de PVDF com fluxo perpendicular. Após alguns ensaios, o fluxo ficou reduzido, sendo necessária a utilização da membrana Millipore de éster de celulose.

REMOÇÃO POR FILTRAÇÃO DE AÇÚCARES CAUSADORES DE REPRESSÃO CATABÓLICA DURANTE PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES

Carla Eliana Todero Ritter^{1,2}, Kaliane Regalin Aver¹, Roselei Claudete Fontana¹, Mára Zeni²,
Aldo José Pinheiro Dillon¹

Universidade de Caxias do Sul

¹ Laboratório de Enzimas e Biomassa

² Laboratório de Pesquisa de Química dos Materiais

Resumo: Hidrolisados de biomassa lignocelulósica podem ser utilizados para as mais diferentes aplicações, como na fermentação para produção de etanol, antibióticos, butanol, entre outros. A etapa de produção da enzima e a etapa de hidrólise da celulose sofrem interferência da concentração de açúcares, respectivamente por repressão catabólica e inibição enzimática pelos produtos. Considerando a possibilidade de que a remoção destes açúcares poderia ser realizada por filtração aumentando da produtividade enzimática, neste trabalho foram realizados ensaios em frascos sob agitação em meio contendo celulose como fonte de carbono para a produção de celulases, do qual se removeram os açúcares liberados. Os meios contendo celulose (indutor) e açúcares redutores (inibidores) indicaram que as enzimas apresentaram maior atividade quando a nanofiltração removeu parte do permeado após 18 h de cultivo (xilanase e FPA). O processo de filtração com membranas demonstrou-se satisfatório, pois permitiu a remoção de açúcares que possivelmente tiveram um efeito positivo na atividade enzimática.

Palavras-chaves: repressão catabólica, celulases, açúcares, inibição.

1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas para a produção de xaropes de açúcares de material lignocelulósico é influenciada negativamente pela glicose, pelo mecanismo conhecido como repressão pela glicose (Kubicek *et al.*, 2009), cujo controle principal se dá em nível de transcrição (Foreman *et al.*, 2003). Neste processo, pelo menos para o microrganismo modelo *Trichoderma reesei*, estão envolvidos fatores de transcrição como o CRE1, ACE1 (fatores negativos) que respondem a glicose e XYR1, ACE2, HAP2/3/5 (fatores positivos). Para três espécies de *Penicillium*, a glicose reprime a produção de

endoglicanases, endoxilanases e β -xilosidases. Somente após o consumo da glicose, os fungos começaram a produzir β -glicosidase e endoglicanases (Jørgensen *et al.*, 2003). A repressão catabólica é fortemente mediada pelo gene *Cre1* em *Trichoderma* e seu homólogo *CreA* em *Aspergillus* (De Vries e Visser, 2001). CREA/CRE1 constitui-se de proteínas de interação com o DNA capazes de se ligarem a certas sequências na região do promotor de um gene, evitando a transcrição. Antes da glicose (2 a 4 g.L⁻¹) ser completamente consumida, baixa atividade de β -glicosidase foi detectada nos caldos de cultura dos três espécies de *Penicillium* (Jorgensen *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2003). Em *Aspergillus*, na presença de glicose, a proteína CREA reprime a expressão dos genes que codificam as celulases e xilanases (De Vries e Visser, 2001).

Estratégias para minimizar os efeitos de repressão pela glicose estão na obtenção de mutantes parcialmente desreprimidos à glicose (Seidl, 2008; Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2011) e alterações ao nível do processo fermentativo (Reis *et al.*, 2013). Durante a hidrólise enzimática a presença de celobiose e glicose diminuem significativamente a taxa de hidrólise sendo considerados inibidores enzimáticos. A remoção de substâncias inibidoras pode ser realizada com uso de membranas e processos de adsorção e de separação favorecendo a produtividade enzimática (He *et al.*, 2012; Andric *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve por objetivo analisar a influência da remoção de açúcares utilizando filtração empregando membranas poliméricas na atividade celulolítica e xilanolítica de *Penicillium echinulatum* durante cultivo submerso, como uma possível estratégia de modular a repressão catabólica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A linhagem *P. echinulatum* S1M29, da coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia, obtida por mutagênese (Dillon *et al.*, 2011) foi empregada para a produção de celulases e xilanases. Colônias foram crescidas em meio ágar-C durante até sete dias, a 28°C até formação de conídios e armazenadas a 4°C até a sua utilização.

2.2 Análise enzimática

A atividade enzimática sobre papel-filtro (FPA) foi realizada como descrito por Mandels *et al.* (1976) e modificado por Camassola e Dillon (2012). Endoglicanase foi

determinada de acordo com Ghose (1987) utilizando 2% de carboximetil celulose em tampão de citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹(pH 4,8) e a atividade de β-glicosidase foi determinada utilizando p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo como substrato (Daroit *et al.*, 2008). As atividades de xilanase foram determinadas de acordo com Bailey *et al.* (1992). As concentrações de açúcares redutores foram estimadas usando ácido dinitrosalicílico de acordo com Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida quantidade açúcares redutores em μmol/min liberados por minuto sob as condições de ensaio.

2.3 Meio para o cultivo submerso

O meio de cultivo foi composto de 1% (m/v) de celulose cristalina, 0,2% (m/v) de farelo de soja, 0,5% (m/v) de farelo de trigo, 5% de solução de sais (Mandels & Reese, 1957), 0,02% (v/v) de Tween 80[®], 0,02% (v/v) de antiespumante Fluent Cane[®] e água destilada para completar o volume de 100 mL. A solução de sais era composta por (g.L⁻¹): KH₂PO₄, 20; CO(NH₂)₂, 3; MgSO₄ · 7H₂O, 3; CaCl₂, 3; FeSO₄ · 7H₂O, 0.050; MnSO₄ · H₂O, 0.0156; ZnSO₄·7H₂O, 0.014; and CoCl₂, 0.020.

2.4 Condições do cultivo submerso

Os ensaios foram divididos em três grupos: (1) presença somente da celulose; (2) presença de glicose e posteriormente da celulose e (3) presença da celulose e glicose.

Para a realização do primeiro grupo de ensaios (1) presença somente da celulose, utilizou-se frascos Duran[®] de 50 mL, com 20 mL de meio, contendo apenas 20% dos componentes do meio padrão (0,2 g de celulose, 0,02 g de Prodex[®], 0,04 g de peptona e 1 mL de solução de sais). Os frascos foram inoculados com uma suspensão 1x10⁵ conídios. mL⁻¹ e mantidos em agitação recíproca de 180 rpm a 28° C. Nos tempos de 12, 18, 24, 36, 42 e 44 h os cultivos foram filtrados por nanofiltração e o material retido foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio com 0,8 g de celulose cristalina, 0,16 g de peptona, 0,08 g Prodex[®], 4mL de solução de sais e 0,1 mL de Tween 80[®]. Posteriormente foram adicionados de 0,1 mL de solução de gentamicina a 4,4%.

O meio padrão (controle) utilizado consistiu no meio inoculado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de constituição 1% (m/v) de celulose cristalina, 0,2% (m/v) de peptona, 0,1% (m/v) de Prodex[®], 5 mL de solução de sais 20x concentrado em água destilada.

Para o segundo grupo de ensaios (2) presença de açúcares solúveis (inibidores, repressores e/ou indutores) e posteriormente do indutor em frascos Duran[®] contendo 50 ml de meio foram compostos de 0,5 g de açúcar solúvel (glicose, sacarose, frutose, celobiose e lactose), 0,02 g de Prodex[®] e 0,04g de peptona e inoculados conforme etapa 1. Após 24 e 44 h, o micélio foi filtrado, lavado com água destilada e posteriormente colocado em frascos Erlenmeyer contendo 1g de celulose, 0,16 g de peptona, 0,08 g de Prodex[®] e 4 mL de meio de sais. O permeado coletado serviu para determinação da atividade enzimática, respectiva perda de enzimas e concentração de açúcares redutores. Os frascos ficaram sob agitação contínua e a 28°C.

Para o terceiro grupo de ensaios (3) presença de indutor e inibidor de celulases iniciou-se com o inóculo do meio em frascos Duran[®] contendo 50 mL de meio contendo 0,5 g de açúcar solúvel (glicose, sacarose, frutose, celobiose e lactose), 0,2g de celulose, 0,02g de Prodex[®] e 0,04g de peptona. Após 24 h e 48 h, o meio foi filtrado e o retido foi transferido para Erlenmeyer contendo 100 mL de meio (0,8 g de celulose, 0,16 g de peptona, 0,08 g de Prodex[®] e 4 mL de meio de sais).

Foram retiradas amostras (10 mL cada) para dosagem enzimática no 3º, 4º e 5º dias de cultivo, com complementação do volume de água evaporado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As amostras para análise da atividade enzimática foram centrifugadas a 400 rpm por 15 min.

2.5 Membranas utilizadas para a filtração

Foram utilizadas para filtração membranas poliméricas planas de PVDF (polifluoreto de vinilideno), em sistema de filtração perpendicular com pressão reduzida. As membranas foram construídas a partir de solução de PVDF a 10% (m/v) pelo método de inversão de fases, tendo com solvente orgânico dimetilformamida e como não solvente, água a 20°C. As membranas foram esterilizadas com solução de hidróxido de sódio a 1% (m/v) por 30 s, lavadas com água destilada e deixadas expostas em câmara de luz ultravioleta, por 5 min.

Entretanto após os ensaios iniciais, as membranas tiveram os poros obstruídos e redução do fluxo de permeado sendo necessário utilizar as de éster de celulose 0,2 µm (Millipore[®]) para evitar contaminação dos ensaios. O volume filtrado na membrana de PVDF foi de 70% do volume total e o restante com as membranas de éster de celulose. O volume foi completado utilizando água destilada e solução de sais correspondente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos foram conduzidos tendo como objetivo verificar o efeito na atividade enzimática do cultivo pela remoção, em diferentes tempos, de metabólitos solúveis, utilizando filtração, sendo que três operações distintas foram realizadas.

3.1 Remoção do permeado em meios contendo celulose

A Figura 1 apresenta as atividades enzimáticas referentes aos experimentos em que a fração líquida foi removida da fração sólida por filtração em diferentes tempos, sendo o material retido transferido para frascos com apenas 80% dos constituintes do meio. Desta maneira o micélio já em desenvolvimento passou a crescer sem a presença de produtos de hidrólise. Os dados de atividade de β -glicosidase (Figura 1A) evidenciam que esta atividade enzimática é maior no 5º dia do cultivo, ou seja, é mais tardia. A atividade de β -glicosidase no 5º dia apresentou um aumento de 33% em relação ao controle, quando a filtração ocorreu às 18 h de cultivo, embora a média para esta atividade enzimática tenha sido umas das menores no 3º dia. Os ensaios onde a filtração ocorreu após as 36 h de cultivo mostram redução na atividade de β -glicosidase do 3º, 4º e 5º dias, se comparados com o padrão. Pelos dados do ensaio, onde a filtração ocorreu às 12 h, não houve efeito negativo na produção enzimática, comparativamente ao controle.

Para a atividade de endoglicanase (Figura 1B), o ensaio em que ocorreu a retirada do permeado às 18 h, no 3º dia, ocorreu um valor de atividade superior ao controle, com uma produtividade volumétrica de $0,083 \text{ UI.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto o controle apresentou produtividade de $0,066 \text{ UI.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

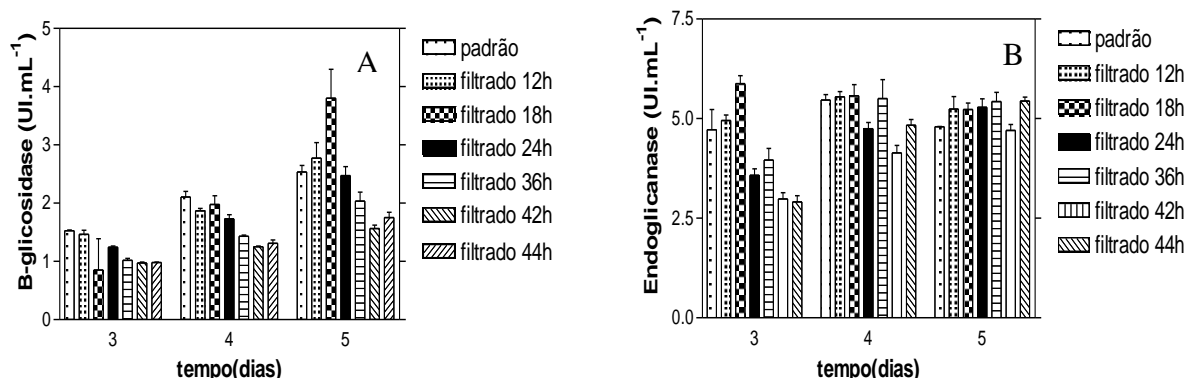


Figura 1. Atividade enzimática de β -glicosidase (A) e endoglicanase (B) durante cultivo submerso depois da filtração utilizando membrana plana em 12, 18, 24, 36, 42 e 44 h. As amostras indicam os valores da média de três repetições, com o respectivo desvio padrão.

Na Figura 2A, verifica-se que o processo de filtração ocorrido em 24 h, 36 h, 42 h e 44 h não trouxe efeito positivo na produção e enzimas no 3º e 4º dias de cultivo. Quanto maior o tempo que antecedeu a filtração menor a atividade no 3º dia de cultivo. Entretanto, a atividade de FPA aumentou e foram máximas no 5º dia do cultivo. Os valores de FPA quando a filtração ocorreu às 18 h do cultivo foram maiores do que o controle no 3º dia de cultivo, o que pode ser relevante do ponto de vista tecnológico. O tempo máximo utilizado neste experimento não permite fazer afirmações definitivas para a FPA, visto que no quinto dia, último dia do experimento, alguns ensaios estavam ainda com elevação da atividade sobre papel-filtro.

Em relação à atividade de xilanases (Figura 2B), os títulos observados no 4º dia foram entre 40% e 30% maiores quando houve filtração em 42 h e 44 h, respectivamente.

A análise dos dados das Figuras 1 e 2 sugere que a remoção da fase líquida do cultivo de *P. echinulatum* altere a secreção de celulasas e xilanases pelo micélio, sugerindo que este procedimento possa ser favorável para aumentar os títulos enzimáticos, como visto para β -glicosidase, endoglicanase, FPA e xilanases.

A atividade de endoglicanase, no filtrado foi de 0,24, 0,42 e 1,2 UI.mL⁻¹ em 12, 36 e 44 h de cultivo, respectivamente. Possivelmente a remoção de substâncias solúveis, durante o cultivo submerso, levando a um aumento da atividade enzimática, seja consequência de modulação negativa da intensidade da repressão catabólica.

Finalmente, os dados obtidos com este experimento, permitem sugerir que a presença de açúcares no meio ou o próprio estado fisiológico das células devem interferir na produção de enzimas. A remoção do permeado em diferentes períodos pode provocar alterações positivas ou negativas em diferentes atividades enzimáticas.

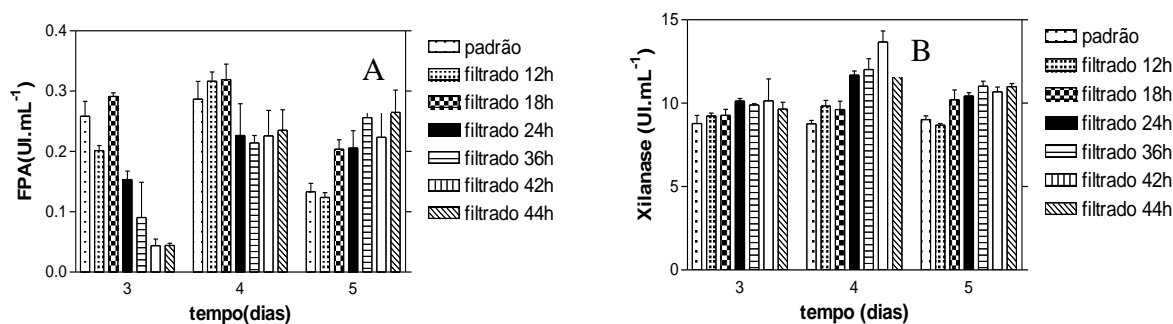


Figura 2. Atividade enzimática de xilanases e FPA durante cultivo submerso depois da retirada de fase líquida utilizando membranas planas para filtração. As amostras indicam os valores da média de três repetições.

Com maiores concentrações de celulose, a geração de glicose pode ser mais rápida do que seu consumo, interrompendo a síntese de celulasas por repressão catabólica por glicose (Sukumaran et al., 2005). Assim, pôde-se verificar que o tempo de retirada dos metabolitos do cultivo interfere na produção de celulasas podendo reduzir, atrasar ou mesmo aumentar a secreção de algumas enzimas. Estes dados sugerem que é possível uma intervenção por meio de filtração que seja favorável a produção das enzimas estudadas.

3.2 Remoção do permeado de cultivos iniciados com açúcares solúveis

Em um segundo grupo de experimentos verificou-se o efeito sobre a atividade enzimática do *P.echinulatum* de cultivos iniciados com 0,5% (m/v) de diferentes açúcares solúveis (glicose, celobiose, frutose, sacarose ou lactose) e filtrados após 24 ou 48 h, para remover o filtrado (permeado) e o material retido foi transferido para novo meio.

A análise da Figura 3 permite sugerir que a presença de açúcares no início do cultivo e a remoção do filtrado após 24 h ou 48 h é mais prejudicial em se tratando de atividade de FPA (Figura 3C), do que nas demais atividades enzimáticas estudadas (Figura 3A, B e D), visto que a não reverteu o efeito negativo na atividade enzimática.

Em relação às demais atividades estudadas, como para β -glicosidade (Figura 3A), verifica-se que no cultivo com crescimento iniciado com sacarose, glicose e celobiose, com filtração em 24 h, ocorreu aumento significativo na atividade de β -glicosidase no 5º dia. Já em relação às atividades de endoglicanases (Figura 3B), quando a remoção dos açúcares ocorreu em 24 h, não houve diferença em relação ao controle. Entretanto, quando a filtração ocorreu em 48 h, os valores de atividade foram menores que o controle.

O cultivo iniciado com celobiose e filtrado em 24 h apresentou incremento de cerca 30% de na atividade de xilanase no 5º dia, em relação ao controle, sugerindo um efeito indutor deste açúcar para xilanases (Figura 3D).

Os dados da Figura 3 F, permitem verificar que o cultivo com o meio contendo sacarose, e filtrado às 24 h ou 48 h do inóculo, apresentou concentração micelial superior aos demais meios, com 1,2 g.L⁻¹ (24 h) e 3,4 g.L⁻¹ (48 h). Os cultivos com lactose e a celobiose apresentaram os menores valores de biomassa quando filtrados em 48 h, apresentando 1,2g.L⁻¹ e 1,1g.L⁻¹, respectivamente.

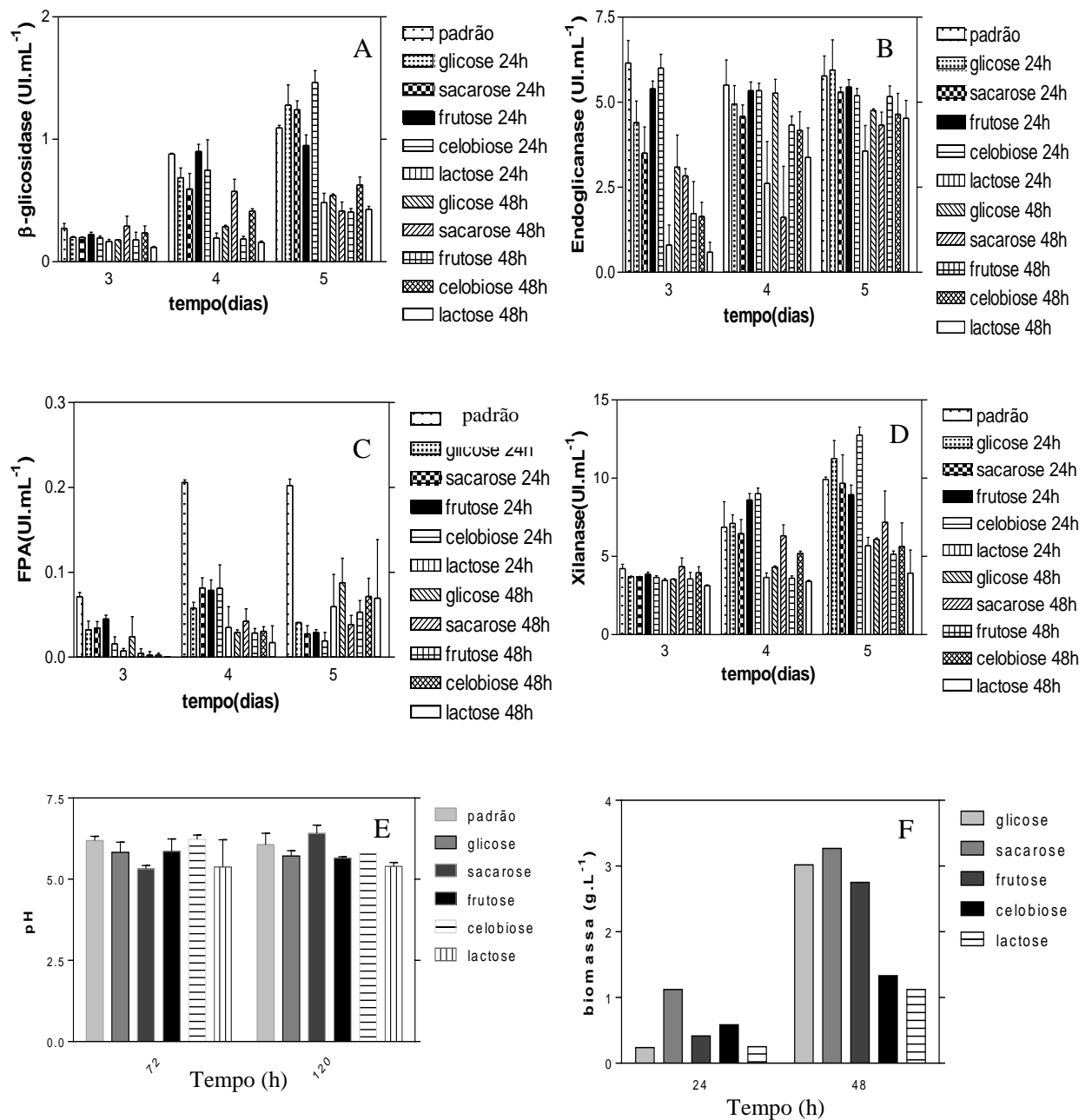


Figura 3. Atividade enzimática β -glicosidase (A), endoglicanase (B), FPA (C), xilanases (D), biomassa (E) e pH (F) em cultivos iniciados com açúcares solúveis (glicose, sacarose, frutose, celobiose e lactose) e filtrados em 24 h e 48 h com membranas planas.

Na segunda série de experimentos, verifica-se que a presença de açúcares no início de crescimento, mesmo se removidos, interfere negativamente na secreção das enzimas estudadas, principalmente nas FPA. Este comportamento sugere que o efeito negativo seria exercido mais sobre as exo-glicanases, visto que as FPA tratam-se do resultado da atividade conjunta de exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases, sendo que as medidas de

endoglicanases pouco se alteraram, tal como aconteceu para β -glicosidases, quando os metabólitos foram removidos às 48 h.

Há genes, cujo comportamento regulatório é consistente com o seu papel na formação do indutor primário para a expressão das celulases. Entre eles, o *cel5b* foi moderadamente expresso durante o crescimento em glicerol, glicose, sorbose e lactose, e que apenas um pouco acima desse nível foi induzido por celulose. Verificou-se também, em estudos, que o glicerol e o sorbitol não promovem a expressão, mas, ao contrário da glicose, não inibem (Foreman et al., 2003).

3.3 Remoção do permeado no cultivo contendo açúcares solúveis e a celulose

Uma vez que o crescimento inicial em açúcares solúveis foi desfavorável para a produção de FPA em *P. echinulatum*, optou-se em verificar o efeito da associação dos açúcares com a celulose na produção das enzimas e posteriormente remover parcialmente os metabólitos solúveis.

Para a atividade de β -glicosidase (Figura 4 A), o crescimento inicial em presença de celulose e açúcar solúvel mostrou-se positivo, quando o cultivo foi filtrado nas 24 h, se estes continham glicose, sacarose (4º e 5º dias de cultivo), ou lactose (no 5º dia de cultivo). Quando a filtração ocorreu nas 48 h, apenas o cultivo com sacarose mostrou no 5º dia maior atividade em relação ao controle.

Para a atividade de endoglicanase (Figura 4 B), aparentemente não houve influencia significativa, se a glicose, sacarose ou frutose estiveram presentes no meio e os cultivos foram filtrados em 24 e 48 h, como visto nas atividades do 3º, 4º e 5º dias de cultivo. Nos ensaios com celobiose e lactose os valores de atividade foram menores, quando a filtração ocorreu em 24 e 48 h, como visto nos períodos de tempo correspondente aos 3º, 4º e 5º dias de cultivo.

Em relação à atividade sobre papel-filtro (Figura 4 C), como visto no terceiro dia de cultivo, a presença dos açúcares no início do cultivo aparentemente aumentou o tempo para a secreção, tanto se a filtração ocorreu em 24 h ou 48 h. Porém os cultivos com glicose, sacarose, frutose mostraram maiores atividades em relação ao controle, no 4º dia de cultivo, quando a filtração ocorreu às 24 h. Quando a filtração ocorreu em 48 h, os cultivos com sacarose e frutose apresentaram as maiores atividades para FPA, como verificado no 4º e 5º dias de cultivo, com o cultivo com a frutose apresentando a maior atividade no 5º de cultivo.

Em relação aos dados sobre o efeito nas xilanases (Figura 4 D) no terceiro dia, com exceção do cultivo com lactose, todos tiveram atividade enzimática reduzida em relação ao

controle, quando a filtração ocorreu nas 24 h e quando a filtração ocorreu nas 48 h o cultivo com frutose não diferiu do padrão.

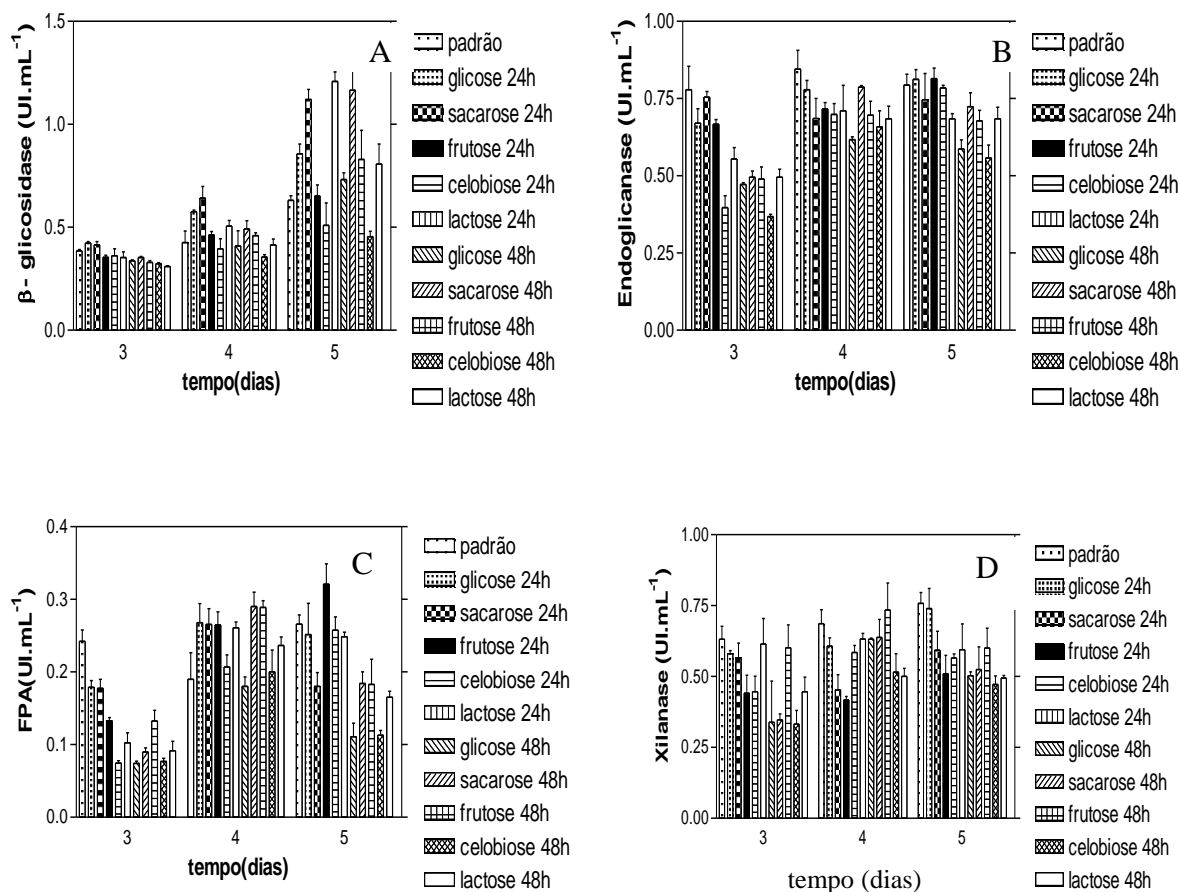


Figura 4. Atividade enzimática de meios contendo fontes de carbono solúveis e celulose durante cultivo submerso após filtração de fase líquida em 24 e 48 h com membranas planas.

4. CONCLUSÃO

Os dados apresentados permitiram avaliar o efeito da remoção de açúcares durante o cultivo sobre a secreção de enzimas, além de avaliar que a produção de enzimas da linhagem S1M 29 de *P. echinulatum* pode ser aumentada com a aplicação de processos de filtração.

A remoção do permeado em 18h influencia positivamente na produtividade de β-glicosidase com aumento de 60%. Já para xilanase o aumento foi de 40 a 60% quando a filtração foi após 24 h de cultivo para meios contendo somente celulose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrić, P.; Meyer, A.S.; Jensen, P.A.; Johansen, K.D. (2010) Effect and Modeling of Glucose Inhibition and In Situ Glucose Removal During Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochem Biotechnology* 160:280–297 DOI 10.1007/s12010-008-8512-9
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnology* 23, 257-270.
- Daroit, D.J., Simonetti, A., Hertz, P.F., Brandelli, A., (2008). Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. *Journal Microbiol. Biotechnology* 18, 933-941.
- Dillon, A. J. P.; Pozza, F.; Andrighetti, T.; Bettio, M.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *Journal Applied. Microbiol.*, v. 111(1), p. 48-53.
- Foreman, P.K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N.S., Goedegebuur, F., Houfek, T.D., England, G.J., Kelley, A.S., Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares H.A, Teunissen, P.J, Yao, J., Ward, M. (2003). Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal Biol Chem*, 278:31988-31997.
- Ghose, T.K., (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Applied. Chem.* 59, 257-268.
- He, Y., Bagley, D.M., Leung, K.T., Liss, S.N., Liao, B.Q. Recent advances in membrane technologies is biorefining and bioenergy production. *Biotechnology Adv.* 30, 817-858., 2012.
- Jørgensen, H.; Morkeberg, A.; Krogh, K. B. R.; Olsson, L. (2005). Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*, v.36, p. 42-48, 2005.
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. and Olsson, L. (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme Microbial. Technology* 32: 851-861.
- Kubicek, C. P., Mikus, M., Schuster, A., Seiboth B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulose production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels* 2:19 doi:10.1186/1754-6834-2-19.

- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology Bioengineering. Symp.* 6, 21-33.
- Mandels, M., Reese, E.T., (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *Journal Bacteriology* 73, 269-278.
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428
- de Vries, R.P., Visser, J., de Graaff, L.H., (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* 150, 281–285.
- Sukumaran, R. K.; Singhania, R. R.; Patel, A. K. (2005). Microbial cellulases – Production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.* 64: 832-844

4.3 Adsorção de repressores catabólicos favorecem a produção de celulasas e xilanasas em cultivo submerso por *Penicillium echinulatum*

Uma vez que, após filtração, a remoção do permeado do cultivo proporcionou aumento na atividade de celulasas e xilanasas, optou-se em tentar remover somente os inibidores deixando água, enzimas e sais minerais no meio. Assim, a remoção dos inibidores foi realizada por adsorção utilizando-se discos e *pellets* de PVDF e de adsorventes como quitina, quitosana e carvão ativado.

Catabolite repression adsorption improves the production of cellulases and xylanases in submerged culture of *Penicillium echinulatum*

Carla Eliana Todero Ritter, Roselei Claudete Fontana, Kaliane Regalin Aver, Mara Zeni,
Aldo José Pinheiro Dillon

Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul; Mailbox 1352, 95001-970 Caxias do Sul - RS, Brazil. Phone/Fax: +55 54 32182149, email cetodero@gmail.com

Abstract

Increased activities of microbial cellulase and xylanase has been observed to be closely linked to the removal of inhibitory substances and catabolite repression. The aim of this paper was to study the influence of adsorption of catabolic repressor in enzyme productivity, adding discs (flat membrane) and *pellets* PVDF-P (polyvinylidene fluoride) or PVDF immobilized with adsorbents chitin (QIP), chitosan (QOP) and activated carbon (ACP) adsorbents, during cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum*. It was observed that during 120 h cultivation, the addition of QIP after 36 h and 48 h increased enzyme activity 2.6- and 2.4-fold, respectively. The presence of PVDF-D increased xylanase activity by 50% when the adsorbent was added after 36 h of incubation and by 95% when the adsorbent was added after 48 h. It was also observed that PVDF-P can adsorb up to 60% of the glucose in the medium as well as process enzymes in a simple and fast manner without the need for additional equipment.

Keywords: cellulases, adsorption, glucose, pellets, catabolite repression.

1. INTRODUCTION

Biotechnological processes are responsible for a significant portion of ethanol production, and approximately 95% of this production derives from agricultural sources (Mussatto et al., 2010). There is a great interest in ethanol production from agricultural lignocellulosic waste (Blatt, 2011). These biotechnological processes generally involve the conversion of lignocellulosic biomass into fermentable sugars for ethanol production. However, enormous quantities of cellulases and xylanases produced by microorganisms will be needed to convert the lignocellulosic biomass (Fujii et al., 2009).

Expression of cellulases is induced in most fungi only when cellulose or another inducer is present. In *Hypocrea jecorina* and *Penicillium purpurogenum*, these inducers are

sophorose and gentiobiose, respectively (Suto & Tomita, 2001). Conversely, expression of cellulases is repressed when high quantities of glucose are present. In *Trichoderma reesei*, glucose repression is mediated by CRE 1 and ACE 1 (Kubicek et al., 2009; Nakari-Setälä et al., 2009; Suto & Tomita, 2001; Ilmen et al., 1997).

Inhibitory compounds can be removed using extraction, adsorption and/or separation membranes. These membranes have been shown to improve process performance and increase hydrolysis rates (He et al., 2012). Preparing membranes using polymers with PVDF (polyvinylidene difluoride) involves relatively mild conditions (maximum temperature of 70°C and pH between 2 and 12) and different morphologies (Ho & Sirkar, 1992). Removal of inhibitory compounds can also be achieved with adsorbents. Adsorption relies on differences in solid-fluid mass transfer rates between solution components, which lead to concentration of specific substances onto solid surfaces and separation of these substances from other solution components (Gomide, 1980). Activated microporous charcoals, zeolites, mesoporous silica gels and porous polymers can be used as adsorbents (Gun'Ko, 2007). Chitin and chitosan have gained wide attention as effective biosorbents due to low cost and high contents of amino and hydroxyl functional groups, which show significant adsorption potential for the removal of various aquatic pollutants, ions, glucose and azo dyes (Bhatnagar & Sillanpää, 2009).

Multicomponent competitive adsorption from liquid media is of great importance, as elimination of inhibitors, extraction, separation, and concentration of compounds is accomplished precisely via competitive adsorption. The competitive adsorption of high molecular weight compounds with different molecular weights and equal affinities toward the adsorbent may be hindered by porous adsorbents. As a result, much longer times are required to establish equilibrium compared to adsorption of individual components, especially if preadsorption of one component occurs. Longer times are required even if the preadsorbed component has a lower molecular weight (Gun'Ko, 2007).

Mutants of *Penicillium echinulatum* are able to produce cellulases (Dillon et al., 2008; Dillon et al., 2011) as well as stable FPA (filter paper activity) and β -glucosidase (Camassola et al., 2004), resulting in a good relation between β -glucosidase and FPA activities (Martins et al., 2008). Additionally, these mutants are capable of producing high levels of cellulases by submerged fermentation (Dillon et al., 2006; Ritter et al., 2013b; Reis et al., 2013) and solid fermentation (Camassola & Dillon, 2010).

Attempts have been made to reduce catabolite repression during growth of *P. echinulatum*, including using sorbitol as the soluble carbon source in bioreactors (Ritter et al.,

2013a) or altering pH, as it has been shown that high pH values (5.5-7.0) favor FPA, endoglucanases and xylanase activity, while lower pH values (4.0-6.0) favor β -glucosidase activity (Reis et al., 2013). Removal of glucose released from cellulose during growth may also alleviate catabolite repression. The aim of this study the influence of adsorption of catabolic repressor in enzyme productivity, examining the effect of *pellets* and flat/sheet PVDF discs immobilized with adsorbents (chitin, chitosan and activated carbon) on cellulase and xylanase production by *P. echinulatum* in submerged cultures.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism

The mutant strain *P. echinulatum* S1M29 was obtained from the mutant strain 9A02S1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - DSM 18942) after several steps of mutagenesis and used in this study to produce cellulases and xylanases (Dillon et al., 2011). This strain is stored in the Enzyme and Biomass Laboratory culture collection of the Institute of Biotechnology at the University of Caxias do Sul/Brazil. Cultures were grown on C-agar slants for up to seven days at 28°C until conidia were formed, then stored at 4°C until use.

2.2 Enzyme production

A standard amount of 100 mL of medium was used in 500 mL Erlenmeyer flasks. The medium had the following composition: cellulose (Celuflok E[®]), 10 g.L⁻¹; soy bran, 2 g.L⁻¹; wheat bran, 5 g.L⁻¹; Tween 80[®], 1 g.L⁻¹; mineral solution, 100 mL.L⁻¹ (based on the Mandels & Reese (1957) formulation, consisting of (g.L⁻¹): KH₂PO₄, 5; (NH₄)₂SO₄, 14; MgSO₄.7H₂O, 6; CO(NH₂)₂, 6; CaCl₂, 6; FeSO₄.7H₂O, 0.1; MnSO₄.H₂O, 0.0312; ZnSO₄.7H₂O, 0.028 and CoCl₂.6H₂O, 0.04. After autoclaving, the flasks were inoculated with a conidial suspension (1×10^7 conidia.mL⁻¹) and maintained at 28°C with reciprocal shaking at 180 rpm for 5 days.

2.3 Preparation of flat discs and pellets

PVDF (polyvinylidene difluoride) round discs were prepared using a PVDF polymer solution (100 g.L⁻¹) dissolved in *N,N* dimethylformamide (DMF). The polymer solution (10%) was shaken for 24 h at 70°C then spread onto glass plates with a uniform width of 30 μ m. After spreading, the glass plate was immersed in a coagulation bath containing non-

solvent water for 24 h at 25°C. After precipitation, the discs were washed to remove residual solvent. The discs consisted of PVDF (PVDF-D) or PVDF with different adsorbents (chitin-QID and chitosan-QOD). The adsorbents were immobilized in PVDF using 0.075 g.g⁻¹ of chitin and chitosan in solution polymer and then dried in an oven for 6 h.

Pellets approximately 0.25 cm in diameter, measured with a pachymeter, were made by dripping PVDF polymer solution (100 g.L⁻¹) containing adsorbents into distilled water. Pellets of PVDF (PVDF-P) and PVDF with different adsorbents (chitin-QIP and chitosan-QOP) were made. Adsorbents were immobilized in PVDF using 0.075 g.g⁻¹ of adsorbent in polymer and then dried in an oven for 24 h.

2.4 Adsorption studies

Adsorbent-immobilized pellets were added to sealed Erlenmeyer flasks containing 50 mL of dilute enzyme solution, which consisted of enzymes from *P. echinulatum* and/or glucose (1.8 g.L⁻¹). Pellets of PVDF (PVDF-P) and PVDF with different adsorbents (chitin-QIP, chitosan-QOP and activated carbon-ACP) were used. 0.3 g of pellets were used for 50 mL of enzymatic extract. The adsorption was evaluated at 25°C, and the solution was stirred in a rotary shaker at 165 rpm for 60 min. Samples (1 mL) were collected every 10 min, and protein and reducing sugar concentrations as well as enzyme activity were measured to determine the mass of glucose adsorbed per mass of adsorbent, q_E , according to equation 1.

Adsorption with PVDF, activated carbon, chitin and chitosan was performed using a batch equilibrium technique (Gomide, 1980). Equilibrium adsorption studies were performed to develop an isotherm model to describe the media performance and aqueous solution. The extent of adsorption at equilibrium (q_E , g.g⁻¹) was calculated from the initial and equilibrium glucose concentration in solution based on a mass balance, where V is the volume (L) of solution, C_o is the amount (g) of adsorbent initial and (C_E), in equilibrium (Equation 1).

$$q_E = \frac{V.(C_o - C_E)}{m_c} \quad (1)$$

Removal efficiency, expressed as the percent of glucose adsorbed, was determined using Equation 2:

$$Percent(\%) = \frac{(C_o - C_E).100}{C_o} \quad (2)$$

where C_0 and C_E are the initial and final concentrations of glucose (mg. L^{-1}), respectively.

Pellets and discs were added to cultures with microorganisms after 36 and 48 h of cultivation, 0.3 g of pellets (chitin-QIP, chitosan-QOP and PVDF-P) was added to each flask containing 100 mL of culture medium. Disk 4.6 cm in diameter (chitin-chitosan-QOD QID, and PVDF-D) were also added to the submerged cultivation in 36 h e 48 h. Tests were performed in triplicate.

2.5 Enzymatic activity

The filter paper activity (FPase) was measured by using Whatman N°. 1 filter paper as substrate, according to Camassola & Dillon (2012). Endoglucanase activity was determined according to the method described by Ghose (1987), using 2% carboxymethylcellulose in 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.8). The β -glucosidase activity was measured using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Daroit et al., 2008) and xylanase activity by the method described by Bailey et al. (1992). Reducing sugars were measured in terms of glucose equivalents by the dinitrosalicylic acid (DNS) method, as described by Miller (1959). Reducing sugars were measured with the DNS method using xylose and glucose as standards. One international unit (IU) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of reducing sugar from the appropriate substrates in one minute under assay conditions. Total protein was determined by the Bradford method (1976).

2.6 Statistical analysis

Results were subjected to analysis of variance using Tukey's post-hoc test, and significance was defined as $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism program (Graph Pad, San Diego, CA).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Adsorption in enzyme extract and glucose solution

Different adsorption behaviors were observed for different adsorbent material pellets in enzymatic extracts with and without glucose (Figure 1). The highest protein adsorption value for enzymatic extracts alone (12 %) was obtained with chitin as the adsorbent after 50

min of incubation, using only enzymatic extract, for enzymatic extracts with glucose, the highest adsorption with chitin was obtained after 10 min of incubation. ACP, in contrast, resulted in 22% protein adsorption from enzymatic extracts with glucose (Figures 1A and 1B). The reversible physical adsorption that takes place in the liquid involves low chemical energy and results in fast equilibrium between adsorbate molecules and the fluid phase, as has been suggested previously (Gomide, 1980).

Figures 1C and 1D present adsorption results for sugars in enzymatic extracts in the absence and presence of glucose (1.8 g.L^{-1}). Maximum adsorption was similar regardless of the presence of glucose, with adsorption values of approximately 60%. The amount of sugars adsorbed increased until 20 min, after which virtually constant values were observed for QIP, QOP and ACP adsorbents (Figure 1C and 1D). Therefore, it is possible to use pellets to adsorb sugars that inhibit enzyme production in submerged cultures.

Adsorption with pellets, the process used in this work, is very simple and does not require many materials. Another study using activated carbon showed fast absorption during the first 20 min on incubation followed by a much slower process, indicating that cellobiose molecules first saturate binding sites close to the surface, then diffuse into the inner micropores (Lammirato *et al.*, 2011). In enzyme solutions with glucose, the adsorption rate of glucose was higher than the adsorption rate of enzyme, indicating that glucose diffuses more rapidly than enzymes.

As for the effect of adsorption on enzyme activity, the most significant reductions in FPA were observed for enzyme extracts with PVDF pellets after 40 min (52%) and with chitosan pellets after 30 min (50%) (Figure 1E). FPA reductions of 25% and 35% were observed with PVDF and chitin in the presence of glucose, respectively. A reduction in FPA was not observed when QOP was used, likely indicating that the enzymes do not undergo any conformational changes or suffer efficiency losses (Figure 1F).

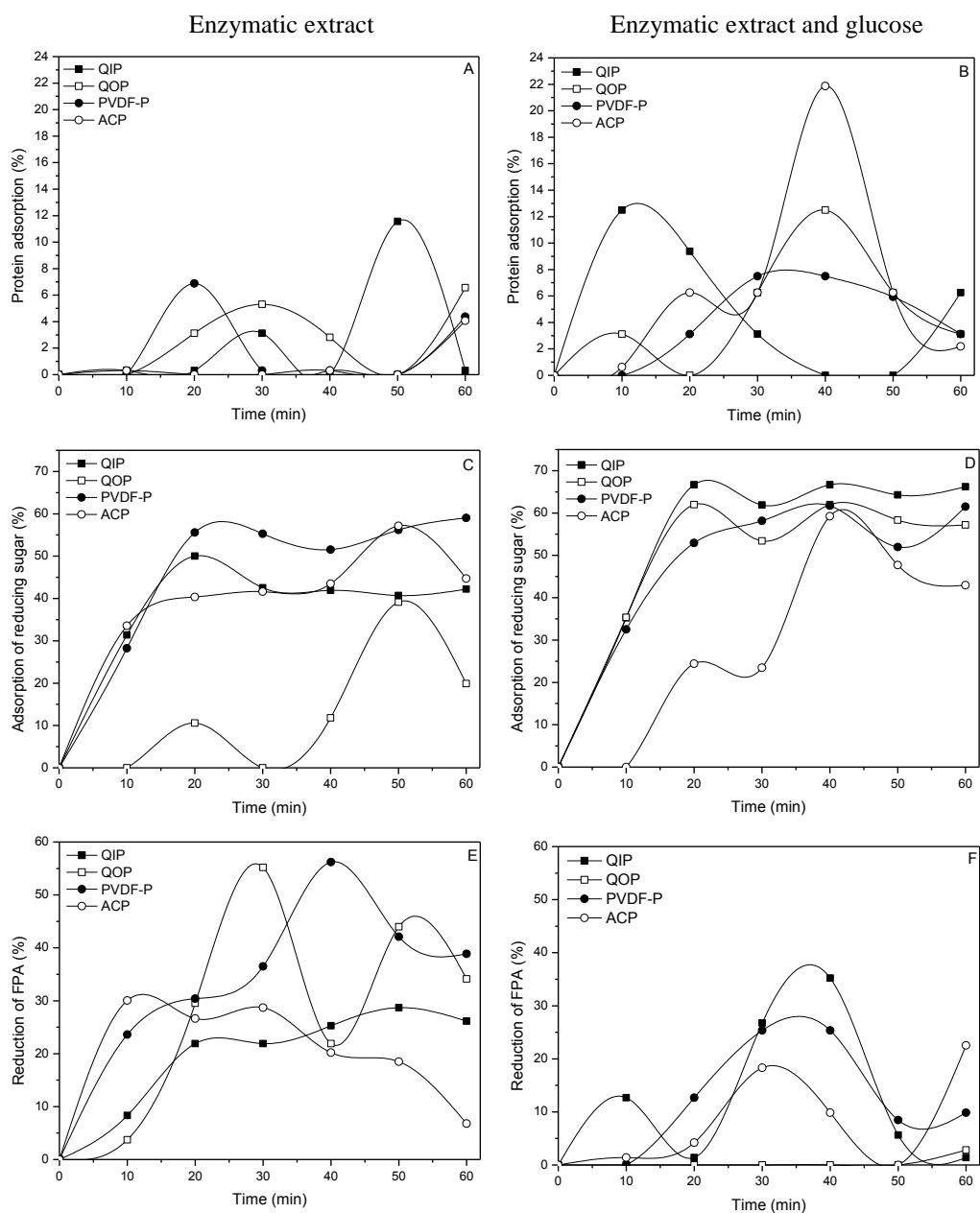


Figure 1. Protein and sugar adsorption with chitin (QIP), chitosan (QOP) and activated carbon (ACP) as well as PVDF pellets (PVDF-P) in enzyme extracts in the absence and presence of glucose (1.8 g.L^{-1}). (A) protein adsorption by pellets in enzyme extract; (B) protein adsorption by pellets in enzyme extract with glucose; (C) sugar adsorption by pellets in enzyme extract; (D) sugar adsorption by pellets in enzyme extract with glucose; (E) reduction of FPA by pellets in enzyme extract; (F) reduction of FPA by pellets in enzyme extract with glucose.

The Table 1 summarizes the overall results obtained in this study in terms of the mass of glucose adsorbed at equilibrium. The glucose sorption equilibrium data obtained with adsorbent pellets indicates that chitosan adsorbed glucose during the first 20 min at a rate of 0.41 g/g . This rate was considerably higher than both activated carbon and PVDF. If both

glucose and proteins (enzyme) are present in the medium, the glucose adsorption rate decreases due to competition. Interestingly, this decrease was not observed when activated carbon was used (Table 1).

Table 1. Mass of glucose mass adsorbed at equilibrium by adsorbents immobilized in pellets.

	Pellets	Maximum adsorption time (min)	q_E (g of glucose adsorbed/g of adsorbent)
Enzyme extract	Chitin	20	0.33
	Chitosan	50	0.26
	PVDF	20	0.37
	Activated Carbon	50	0.38
Enzyme extract and glucose (1.8 g.L ⁻¹)	Chitin	20	0.43
	Chitosan	20	0.41
	PVDF	30	0.39
	Activated Carbon	40	0.39

The oscillations in glucose concentration observed suggests that physical interactions between the adsorbent and adsorbate were weak. This behavior is of interest, as it allows glucose to be removed and later returned to the medium. Physical adsorption, or Van der Waals adsorption, is a fast and easily reversible process based on weak attractive intermolecular forces between adsorbent and adsorbed molecules (Gomide, 1980). The tests in this study were performed in finite baths, i.e., the conditions were the same at the beginning and at the end of the process. However, adsorption and desorption occur with different activation energies, especially in different solvents, resulting in changes in pH due to fungal metabolism. Because of these differences, adsorbents were tested in 120 h cultivations.

3.2 Adsorption of catabolic repressor by *pellets*

Once the adsorption tests was reversible at the absence of microorganisms, was used for submerged cultivation trials, the time of maximum adsorption. The Figure 2 shows FPA, β -glucosidase and xylanase activity data from submerged cultivations containing adsorbents (QIP, QOP and PVDF-P). FPA activity was highest (1.0±0.18 IU/mL) with the control condition compared with the conditions that included adsorbents. When adsorbents were present, the highest FPA activity was obtained with QOP added at 48 h (Figure 2A).

Interesting, the addition of QIP, QOP and PVDF-P to the process resulted in a significant increase in β -glucosidase activity (Figure 2B). It was observed that, after 120 h of

cultivation, the addition of QIP at 36 h and 48 h, resulted in an increase in enzyme activity of 2.6- and 2.4-fold, respectively. This effect is probably due to increased porosity, hydrophilicity and surface roughness, where the semi-closed pores of pure PVDF membrane are changed to interconnected pore structure of composite membrane with chitin (Qin et al., 2015).

In the period from 96 h to 120 h, the enzymatic productivity increased from 0.005 U.ml⁻¹h⁻¹ for 0.0125 U.ml⁻¹ h⁻¹ when QIP was added at 36 h. In contrast, when QOP was added at 48 h, no significant increase in enzymatic productivity was observed. Addition of pellets with QOP at 48 h resulted in a 22 % increase in xylanase activity after 120 h of cultivation compared to the standard (Figure 2C).

These results suggest that glucose represses β -glucosidase expression more than FPA and xylanase. Additionally, a high activity of β -glucosidase in the enzymatic mixture is needed for complete hydrolysis of cellulose (Martins et al., 2008).

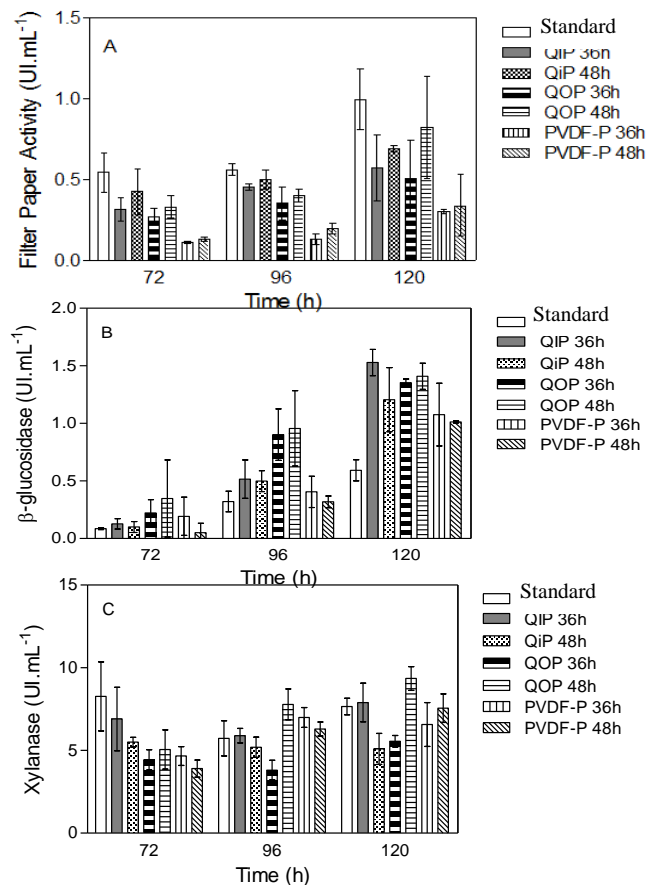


Figure 2. Variations in FPA (filter paper activity), β -glucosidase and xylanase of *P. echinulatum* in submerged cultures with absorbent pellets. FPA (A), β -glucosidase (B) and xylanase (C).

3.3 Adsorption of catabolic repressor by discs

Using discs in submerged cultures may avoid the mycelium buildup that occurs on pellets. Visual observation has shown that the active face of the disc is the only the face able to adsorb compounds and becomes darkened, after assay. Figure 3 presents the activities of FPA, β -glucosidase and xylanase in submerged cultivation containing adsorbent discs (QID, QOD and PVDF-D). Similar to the behavior observed with adsorbents in pellets, the adsorbent discs did not increase the FPA, at least at 72 h and 96 h. However, at 120 h, cultures with either QID-containing discs added at 48 h or QOD-containing discs added at 36 h exhibited increased FPA activity (36%) compared to the standard.

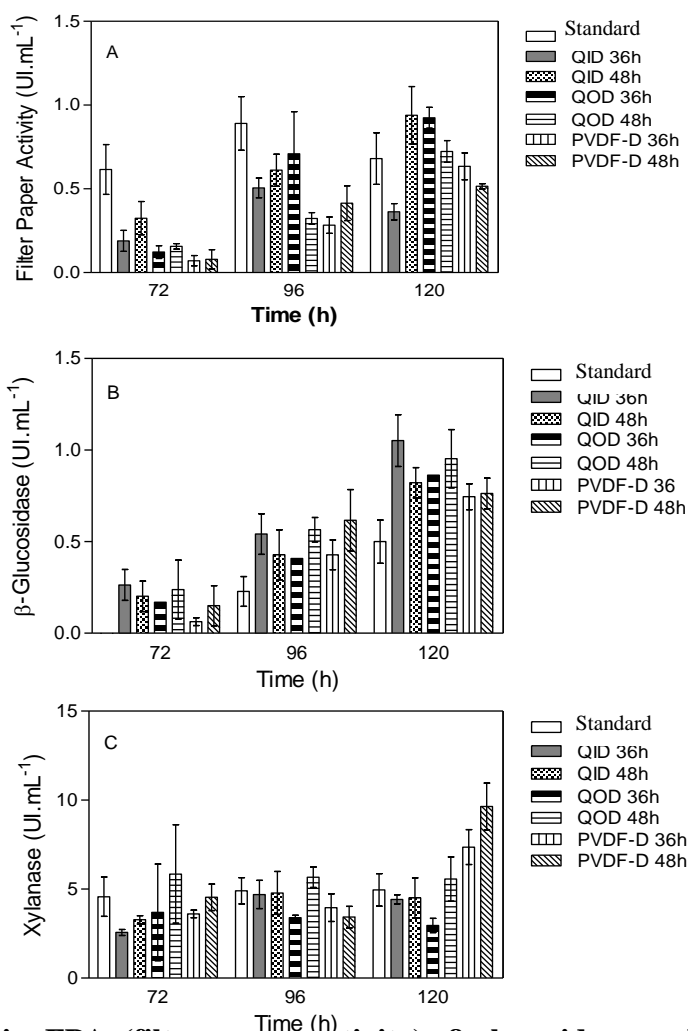


Figure 3. Variations in FPA (filter paper activity), β -glucosidase and xylanase of *P. echinulatum* in submerged cultures with adsorbent discs. FPA (A), β -glucosidase (B) and xylanase (C).

The activity of β -glucosidase (Figure 3B) was favored when adsorbents were added: when discs containing QID were added at 36 h, β -glucosidase activity was doubled compared to the control. Furthermore, β -glucosidase activity was increased for all conditions, which demonstrated the advantage of this process.

Similar to β -glucosidase activity, xylanase activity (Figure 3B) was also increased by the presence of adsorbents. The addition of PVDF-D after 48 h of cultivation resulted in a twofold increase in enzyme activity.

4 CONCLUSION

The goal of this study was to remove glucose, which is responsible for catabolite repression during cellulase production, via adsorption onto pellets. Chitin, chitosan and activated carbon immobilized in PVDF were able to improve cellulase and xylanase production from submerged cultures in a simple and inexpensive process without energy consumption. Tests with adsorbents in discs showed that activity of xylanase, β -glucosidase and FPA activities can be enhanced by adsorbents. An advantage of using pellets is the reduction in time needed for physical adsorption to occur in liquid medium in relation to the mass of adsorbate.

It is highlighted that the fermentative process presented in this work is innovative, in the sense that occurred removal of repressors, that resulted in tripling the β -glucosidase activity, specifically when pellets of chitin were added in 36 h. In addition, this approach could be used for other cellulase-producing microorganisms. The use of discs has advantages in relation to the use of pellets due that are easily added to the system and after removed and in addition can be produced with major facility and speed.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the University of Caxias do Sul (UCS) for the financial support of this work.

6 REFERENCES

1. Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., Interlaboratory testing of methods for assay of increased xylanase production activity. *J. Biotechnol.* 23, 257-270.1992.

2. Bansal, R.C., Goyal, M., Activated carbon adsorption. Taylor and Francis Group, Boca Raton. 2005.
3. Blatt, H., American's environmental report card: are we making the grade?, second ed. United States. 2011.
4. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochem.* 72, 248-254. 1976.
5. Camassola, M., Bittencourt, L.R., Shenem, N.T., Andreus, J., Dillon, A.J.P., Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. *Biocatal. Biotransform.* 22, 391-396. 2004.
6. Camassola, M., Dillon, A.J.P., Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid state fermentation. *Applied. Biochem. Biotechnology* 162, 1889-1900. 2010.
7. Camassola, M., Dillon, A.J.P., Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. *Open Access Scientific Reports*.125. 2012.
8. Daroit, D.J., Simonetti, A., Hertz P.F., Brandelli, A. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. *Microbiol. J Biotechnology* 18, 933-941. 2008.
9. Dillon, A.J.P., Zorgi, C., Camassola, M., Henriques, J.A.P., Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Appl. Microbiol. Biotechnology* 70, 740–746. 2006.
- 10 Dillon, A.J.P., Camassola, M.,Henriques, J.A.P., J., Fungaro, M.H.P., Azevedo, A.C.S.,Velho, T.A.F., Laguna, S.E., Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technology* 43, 403-409. 2008.
- 11 Dillon, A.J.P., Bettio, M., Pozzan, F.G., Andrighetti, T., Camassola, M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J. Applied. Microbiol.* 111, 48-53, 2011.
- 12 Fujii, T., Fang, X., Inoue, H., Murakami, K., Sawayama, S. Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. *Biotechnology Biofuels.* 2, 24, 2009.
- 13 Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257-268.

- 14 He, Y., Bagley, D.M., Leung, K.T., Liss, S.N., Liao, B.Q. Recent advances in membrane technologies is biorefining and bioenergy production. *Biotechnology Adv.* 30, 817-858., 2012.
- 15 Ho, W.S.W., Sirkar, K.K. *Membrane Handbook*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1992.
- 16 Ilmen, M., Saloheimo, A., Onnela, M.L., Penttilä, M.E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied. Environ. Microbiol*, 63, 1298–1306, 1997.
- 17 Kubicek, C.P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., Seiboth, B., 2009. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulose production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology Biofuels*. 2, 19.
- 18 Lammirato, C., Miltner, A., Kaestner, M. Effects of wood char and activated carbon on the hydrolysis of cellobiose by β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1936-1942, 2011.
- 19 Mandels, M., Reese, E.T. Induction of cellulose in *Trichoderma viride* the racketeer influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriology*, 73, 269-278, 1957.
- 20 Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Ramos, L.P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. 1-20; treated cellulosic substrates. *Bioresour. Technology* 99, 1417-1424, 2008.
- 21 Miller, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31, 426-428 , 1959.
- 22 Mussatto, S., Dragone, G., Guimaraes, P.M.R., Silva, J.P., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vincent, A., Domingues, L., Teixeira, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Adv.* 28, 817-830, 2010.
- 23 Nakari-Setälä, T., Paloheimo, M., Kallio, J., Vehmaanperä, J., Penttilä, M., Saloheimo M. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. *Applied. Environ. Microbiol.* 75, 4853-4860, 2009.
- 24 Qin, A.; Zhao, X.; Liu, D.; He, C. Preparation and characterization of nano-chitin whisker reinforced PVDF membrane with excellent antifouling property. *Journal of Membrane Science*, 480, 1–10 (2015).
- 25 Reis, L., Fontana, R.C., Delabona, P.S., Lima, D.J.S., Camassola, M., Pradella, J.G.C., Dillon, A.J.P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium*

- echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. *Bioresour. Technology* 146, 597-603, 2013.
- 26 Ritter, C.E.T., Camassola, M., Zampieri, D., Silveira, M.M., Dillon, A.J.P., Cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged media containing cellulose amended with sorbitol. *Enzym. Res.* 1-9. 2013a.
- 27 Ritter, C.E.T., Fontana, R.C., Camassola, M., Silveira, M.M., Dillon, A.J.P. The influence of sorbitol on the production of cellulases and xylanases in an airlift bioreactor. *Bioresour. Technology* 148, 86-90, 2013b
- 28 Suto, M., Tomita, F. Induction and repression mechanisms of cellulase in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 305-311, 2001.

4.4 Adsorção de repressores catabólicos durante a produção de celulasas e xilanases em biorreatores por *Penicillium echinulatum*

Com base nos experimentos realizados anteriormente, conclui-se que as atividades das enzimas β -glicosidase e xilanase foram as que apresentaram maior aumento na produtividade enzimática após adsorção de substâncias inibidoras por *pellets* ou por discos poliméricos com ou sem adsorventes. Verificou-se que o processo de adsorção envolve menor número de operações que o processo de filtração. Assim, optou-se por ampliar a escala e realizar ensaios em biorreatores. Optou-se, também, em comparar os resultados da remoção de substâncias inibidoras por filtração e por adsorção.

O tipo de biorreator escolhido foi o de mistura completa e utilizaram-se *pellets* de PVDF e *pellets* com adsorventes (quitina, quitosana e carvão ativado).

O artigo a seguir apresenta três etapas distintas de adsorção e filtração: (1) filtração de 10 a 20 % do volume do biorreator com posterior reposição de água e sais, (2) uso de adsorventes dentro do biorreator e (3) remoção da fase líquida, adsorção dos inibidores e, posterior devolução do meio líquido ao biorreator.

ADSORÇÃO DE REPRESSORES CATABÓLICOS DURANTE A PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES EM BIORRETORES POR *PENICILLIUM* *ECHINULATUM*

Carla Eliana Todero Ritter, Roselei Claudete Fontana, Kaliane Regalin Aver, Mára Zeni,
Aldo José Pinheiro Dillon

Resumo: Produtos e subprodutos da hidrólise de materiais lignocelulósicos podem provocar efeitos negativos na produção de enzimas como, por exemplo, a redução da produtividade volumétrica. A atividade celulolítica pode ser incrementada com a remoção de substâncias inibidoras enzimáticas e causadoras de repressão catabólica. A remoção com o uso de membranas de nanofiltração e com o uso de *pellets* aumentou representativamente a atividade de enzimas do complexo celulases. Esse efeito pode ser evidenciado em biorreatores em cultivo submerso com *Penicillium echinulatum*.

Palavras-chaves: celulases, adsorção, nanofiltração, repressão catabólica.

1. INTRODUÇÃO

A conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e produtos químicos de alto valor agregado diminui a dependência de fontes fósseis como o petróleo. A biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida como uma matéria-prima de elevado potencial para a produção de bioetanol. Dada a insistente procura de energia renovável, a possibilidade de utilizar etanol nos motores de combustão de gasolina é cada vez mais atraente, trazendo benefício adicional na redução dos níveis de emissão de gases de efeito estufa (Camassola & Dillon, 2007).

Para essa conversão de lignocelulósicos em biocombustíveis, enzimas celulolíticas, hidrolases O-glicósido (GH, EC 3.2.1.) são utilizadas. Essas se constituem de um vasto grupo de enzimas que hidrolisam as ligações β -1,4 e são classificadas em: endoglicanases, enzimas que hidrolisam ligações β -1,4-glicosídicas intramoleculares aleatoriamente para produzir novas extremidades da cadeia; exoglucanases clivam cadeias de celulose nas extremidades redutoras e não redutoras para libertar celobiose ou glicose; e β -glicosidases que hidrolisam celobiose à glicose (Quiroz-Catañeda & Folch-Mallol, 2012).

Em *Trichoderma reesei*, um fungo filamentoso amplamente utilizado para o estudo

das celulases e xilanases, a expressão de genes responde a fatores de transcrição positivos como HAP, XYR1, ACE2 e negativos CRE1, ACEI (Kubicek *et al.*, 2009). Estudos de PCR quantitativo têm mostrado que, além da celulose (solka flock), também a lactose, L-sorbose, soforose apresentam capacidade de indução de exoglicanases, endoglicanases e β -glicosidases (Verbeke *et al.*, 2009), enquanto que celobiose e glicose diminuem significativamente a taxa de hidrólise de celulose e são consideradas inibidores de enzimas celulolíticas.

A remoção de substâncias inibidoras pode ser realizada com o uso de membranas e processos de adsorção e de separação aumentando a taxa de hidrólise (He *et al.*, 2012). O uso de polímeros com o PVDF (polifluoreto de vinilideno) para a preparação de membranas pode ser realizado tendo em vista as amplas condições de trabalho (temperatura máxima de 70°C e pH entre 2 e 12) e diferentes morfologias (Ho & Sirkar, 1992).

Outra maneira para a remoção de inibidores enzimáticos é o uso de adsorventes. Na adsorção, ocorre a transferência de massa do tipo sólido-fluido, em que certos sólidos concentram na sua superfície determinadas substâncias separando-as dos demais componentes. Carvão ativado, cinzas, quitosana, zeolita e óxidos metálicos podem ser utilizados como adsorventes (Suzuki, 1990).

Duff *et al.* (1985) observaram aumento da atividade enzimática de celulases quando material poroso foi adicionado ao meio de cultivo. Observaram também aumento de até 23% na atividade de FPA quando 0,5 g.L⁻¹ de FeCl₃ foram adicionados ao meio de produção de celulases com *T. reesei* quando comparado ao padrão e quando a adição foi uma cerâmica porosa (alumina) a atividade de FPA passou de 2,5 para 4,5 UI. mL⁻¹.

Linhagens de *Penicillium echinulatum* apresentam estabilidade de FPA e β -glicanases (Camassola *et al.*, 2004), boa relação entre atividades de β -glicosidase e FPA (Martins *et al.*, 2008). Entretanto, tentativas têm sido realizadas no sentido de aumentar a produção de celulases, seja em nível de modificações na fisiologia da linhagem por obtenção de mutantes desreprimidos (Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 2011), ou através de processo fermentativo, com o emprego de fontes de carbono menos repressoras, como o sorbitol (Ritter *et al.* 2013 a; Ritter *et al.*, 2013b) ou pelo controle do pH (Reis *et al.*, 2013).

O presente trabalho objetiva verificar o efeito da remoção de açúcares na produção de celulases e xilanases em cultivo submerso em biorreator com agitação mecânica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A linhagem *P. echinulatum* S1M29, pertencente ao Instituto de Biotecnologia e obtida por mutagênese (Dillon *et al.*, 2011) foi empregada para a produção de celulasas e xilanasas. O microrganismo cresceu em meio ágar-C durante até sete dias, a 28°C até formação de conídios (Dillon *et al.*, 2006) e armazenadas a 4°C até a sua utilização.

2.2 Meio para o cultivo submerso

O meio de cultivo foi composto de 1% (m/v) de celulose cristalina, 0,2% (m/v) de farelo de soja, 0,5% (m/v) de farelo de trigo, 5% de solução de sais (Mandels & Reese, 1957), 0,02% (v/v) de Tween 80[®], 0,02% (v/v) de antiespumante Fluent[®] e água destilada para completar o volume de 100 mL. A solução de sais era composta por (g.L⁻¹): KH₂PO₄, 20; CO(NH₂)₂, 3; MgSO₄ · 7H₂O, 3; CaCl₂·3; FeSO₄ · 7H₂O, 0.050; MnSO₄ · H₂O, 0.0156; ZnSO₄·7H₂O, 0.014; and CoCl₂, 0.020.

2.3 Produção de membranas tubulares impregnadas com PVDF e de *pellets*

As membranas tubulares com suporte cerâmico (C1) e polimérico (P1) foram impregnadas externamente com PVDF (polifluoreto de vinilideno) através do método de inversão de fases. A solução de PVDF 10% (m/v) foi preparada dissolvendo o polímero em dimetilformanida por 12 h a 70°C. Após, a solução foi colocada em contato externo com o suporte tubular por 2 h a 40°C. A inversão de fases foi feita com água destilada como o não solvente a 25°C durante 24 h. As membranas foram compactadas por 1 h a 2 bar.

A formação dos *pellets* de PVDF foi realizada por gotejamento individual em água. A formação dos *pellets* ocorreu por inversão de fases em água a 25°C e, posteriormente, os *pellets* foram secos em estufa por 12h. Os *pellets* contendo quitosana (QUI), como adsorvente, foram produzidos a partir da adição de 1 g do adsorvente em 20 g de solução polimérica (10% m/v) e posteriormente realizada a inversão de fases em água destilada.

Os *pellets* de PVDF e os com adsorventes foram reticulados com solução de glutaraldeído. Após a inversão de fases por gotejamento em água destilada, foram secos em estufas. Os *pellets* ficaram imersos sob agitação em solução de HCl por 2 h e, em seguida, foram filtrados, lavados e colocados em solução de glutaraldeído a 2,5%(v/v) por 6 h. Após esse período, foram lavados, secos em estufa e armazenados para o uso em biorreator.

A desinfecção dos *pellets* foi realizada deixando-os imersos em solução de hidróxido de sódio a 1% (m/v) por 1 min e posteriormente lavados com água destilada. O processo foi realizado em câmara de fluxo esterilizada com luz ultravioleta.

2.4 Cultivos em biorreator com agitação mecânica

Foi utilizado um biorreator da New Brunswick, modelo BioFlo115, de 10 litros, com volume de trabalho de 7 litros. O inóculo dos biorreatores foi feito com pré-inóculo de 48 h crescido em frascos Erlenmeyer e correspondeu a 10% (v/v) dos biorreatores. Os meios de cultivo para o inóculo realizados em biorreator foram autoclavados por 15 min e o biorreator, durante 1,5 h.

Os cultivos foram realizados a temperatura de 28°C e sem controle do pH. A agitação e a aeração do sistema foram controladas em cascata pelo equipamento a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em mínimo de 30%.

2.5 Remoção de repressores catabólicos

Para a remoção de metabólicos com potencial repressor, o trabalho foi dividido em três etapas: (1) Emprego da filtração, com membrans tubulares, de 10 a 20% do volume dos biorreatores, (2) Emprego da adsorção por *pellets* de substâncias inibidoras durante o cultivo submerso e (3) Emprego da adsorção por *pellets* externamente ao biorreator. Todas as intervenções foram realizadas em 24 h de cultivo.

2.5.1 Filtração com membranas

Para o estabelecimento de um sistema de membranas de filtração, uma membrana de suporte tubular impregnada com PVDF (poliflureto de vinilideno) a 10% (Toderó *et al*, 2015) foi introduzida ao reator conectada a um sistema de bomba a pressão reduzida. Volumes correspondentes a 10% (f10%), 12% (f12%), e 20% (v/v) (f20%) do volume total do reator foram filtrados em 24 h de cultivo e o volume do permeado foi substituído por água destilada e solução de sais correspondente e introduzido no biorreator.

Em outro ensaio, o inóculo com tempo de cultivo submerso de 16 h (M16 h) foi filtrado sendo o permeado removido e o material retido utilizado como inóculo contendo o micélio, a celulose e os farelos. Esse experimento teve o objetivo de verificar a influência da remoção de hidrolisados do pré-inóculo na produção de enzimas celulolíticas. A remoção do permeado do inóculo (500 mL) foi realizada utilizando a membrana cerâmica tubular de

alumina. O volume foi completado com água destilada. A remoção total do volume do permeado (700 mL) não foi realizada a fim de evitar diferenças significativas na pressão osmótica no microrganismo. O tempo de pré-inóculo foi definido conforme dados pré-definidos em frascos Erlenmeyer.

2.5.2 Uso de adsorvente durante o cultivo submerso

O segundo grupo de experimentos avaliou a remoção de substâncias (potenciais inibidores) por adsorção. Foram adicionados ao reator, após 24 h de cultivo, 10,54 g de *pellets* contendo 7,5% de quitosana (massa de adsorvente/ massa de *pellets*). Os *pellets* foram mantidos até o final do cultivo. Para avaliar o efeito do adsorvente, utilizaram-se *pellets* de PVDF isentos de quitosana (10,54 g) nos 7 L de volume reacional do reator.

2.5.3 Adsorção externa ao biorreator

Nos ensaios em biorreatores envolvendo filtração externa, utilizou-se tela metálica com poros de 0,1mm de diâmetro para a retenção grosseira do micélio, celulose e farelos. Externamente ao biorreator, em câmara de fluxo esterilizada, realizou-se a adsorção dos açúcares redutores com adsorventes sem tratamento (quitosana- QUI) e *pellets* de PVDF com e sem o uso do adsorvente. Os *pellets* e os adsorventes ficaram em contato com o permeado por 15 min. Para a remoção dos *pellets* foi usada uma peneira de malha fina e, para a remoção dos adsorventes sem tratamento, o meio de cultivo foi centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, o permeado estando isento de adsorventes foi novamente introduzido ao biorreator. Foram filtrados 2 L e 1,4 L de permeado dos biorreatores com *pellets* de PVDF (PVDF 1,4 L e PVDF 2 L) e com *pellets* com quitosana (QUI 1,4 L e QUI 2 L).

A fim de concentrar os hidrolisados inibidores, o volume de meio dos reatores foi reduzido. Assim, iniciou-se o cultivo submerso com 4,3 L de meio inoculado e, após a remoção dos inibidores, devolvido o permeado. O volume do reator foi completo com água. Além dos *pellets* de PVDF (PVDF conc) e quitosana (QUI conc) utilizaram-se 10,54 g de carvão ativado (carvão conc) como adsorvente comparativo aos demais ensaios. A massa de *pellets* utilizada foi de 10,54 g e o processo de adsorção ocorreu em 24h de cultivo em biorreator.

2.6 Análise enzimática

A atividade enzimática sobre papel-filtro (FPA) foi realizada como descrito por Mandels *et al.* (1976), modificado por Camassola e Dillon (2012). Endoglicanase foi determinada de acordo com Ghose (1987) utilizando 2% de carboximetil celulose em tampão de citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ (pH 4,8) e a atividade de β-glicosidase foi determinada utilizando p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo como substrato (Daroit *et al.* 2008). As atividades de xilanase foram determinadas de acordo com Bailey *et al.* (1992). Para a determinação da atividade de celobiohidrolases (CBH), foi utilizado como substrato o p-nitrofenil-β-D-cellobiosídeo (pNPC), empregando-se a metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984). As concentrações de açúcares redutores foram estimadas usando ácido dinitrossalicílico de acordo com Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como um μmol de açúcares redutores libertados por minuto sob as condições de ensaio.

2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram realizadas análises da superfície e da seção transversal dos *pellets* com objetivo de verificar sua estrutura, resultantes do processo de preparação e uso no biorreator. Para observar a seção transversal dos *pellets*, estes foram cuidadosamente fraturados em nitrogênio líquido. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro por *sputtering*, com tempo de exposição de 2 min. As análises foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca Shimadzu, modelo SSX-550, com tensão de aceleração de 15 kV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da remoção do permeado por nanofiltração

Os dados da Figura 1 A indicam variação nos valores de açúcares redutores e de atividade enzimática após filtração com remoção do permeado, em 24 h do cultivo, correspondendo aos percentuais de 10% (f 10%), 12% (f 12%) e 20% (f 20%) do volume do biorreator.

Conforme a Figura 1 A, os valores de açúcares redutores decrescem durante os cultivos com comportamentos similares. Com relação ao perfil de atividade de β-glicosidases (Figura 1B), verifica-se uniformidade na distribuição dos títulos enzimáticos.

As enzimas que apresentaram aumento na atividade enzimática foram as xilanases (Figura 1 D), quando 20% do meio foram filtrados e CBH (Figura 1 E) quando 12% foram filtrados. Houve um aumento de 33% na produtividade volumétrica de xilanase em 70 h de cultivo quando 20% do meio foram removidos, demonstrando efeito positivo da filtração (Figura 1 D) e de 12% no meio M16h cuja filtração foi feita antes do inóculo (Figura 2) Já para a atividades de CBH, a remoção de 12% trouxe aumento de 25% na atividade enzimática, tendo um pico máximo de 4 UI.mL^{-1} em 120 h de cultivo em processo com filtração (Figura 1 E).

As demais enzimas não apresentaram incremento representativo na atividade, provavelmente pela remoção excessiva de enzimas durante a filtração, uma vez que a membrana apresentou apenas 50% de retenção de proteínas totais. A produção de β -glicosidase e a atividade sobre papel-filtro ficaram muito reduzidas quando 20% do meio foram removidos. Outro fato também observado foi que a concentração de açúcares reduziu-se a $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ após a filtração de 20%.

Matos (2012) investigou o perfil proteico do sobrenadante de cultivo com bagaço de cana por *P. echinulatum* e verificou que xilanases apresentam bandas intensas entre a massa molecular de 60-70 KDa e de intensidades menores entre 100,50 e 55 KDa. O processo utilizado nesse trabalho não reteve enzimas de massa molecular menor que 200 KDa. Chauve *et al.* (2010) apresentam que a massa molecular aparente de β -glicosidase de *T. reesei* BGL1 foi de 117 KDa. Portanto, a seleção da membrana é considerada etapa importante a fim de evitar perdas de enzimas de reduzida massa molecular (Chang *et al.*, 2011).

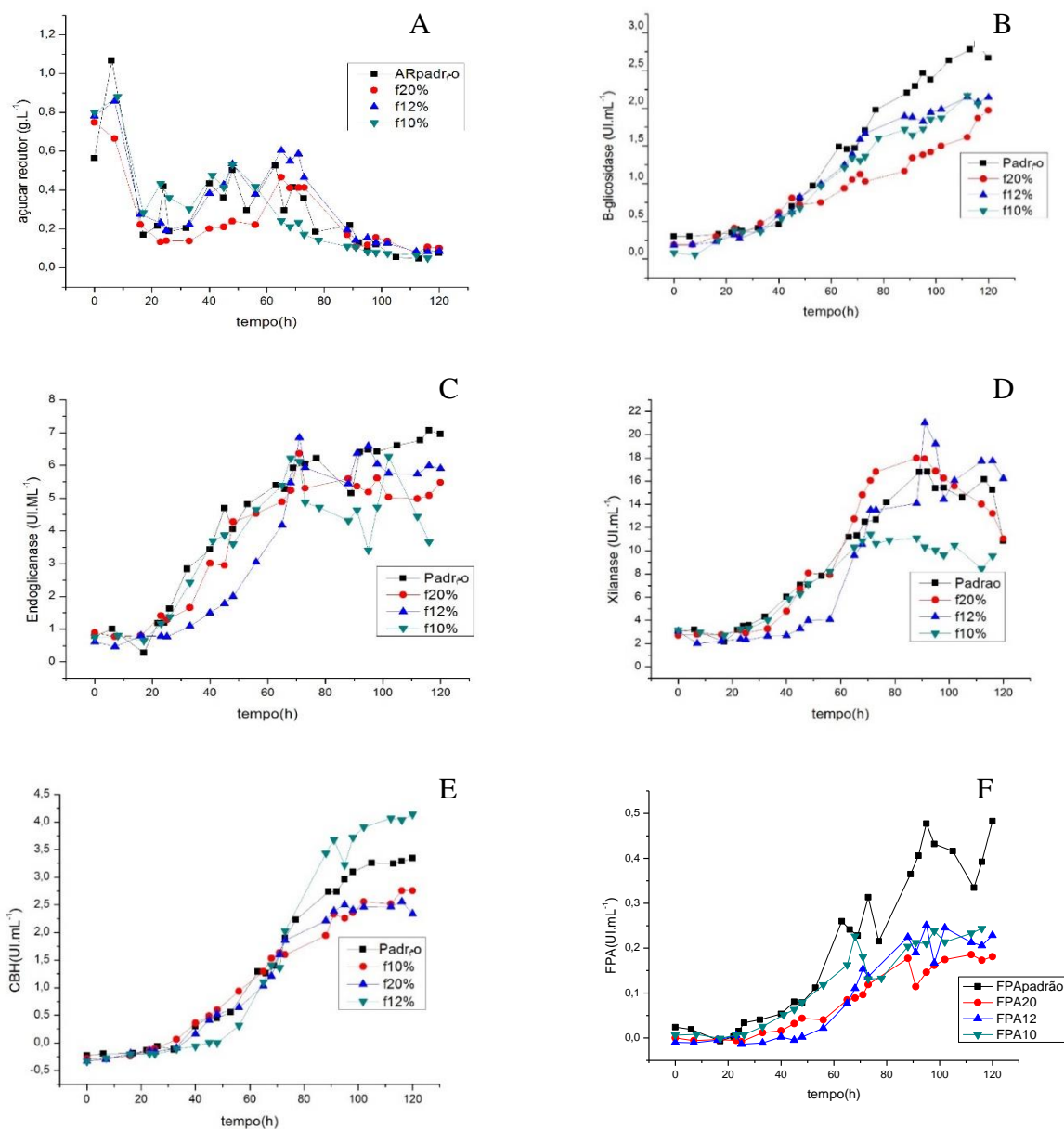


Figura 1. Valores de concentração de açúcares redutores (A), B-glicosidases (B), endoglucanases (C), xilanases (D), exoglucanases (E) e FPA (F) de cultivo submerso em biorreator em que ocorreu filtração após 24 h para remoção de inibidores enzimáticos e repressores catabólicos.

3.2 Uso de adsorventes no meio de cultivo submerso no biorreator

Como observado na Figura 1, para as enzimas do complexo xilanases e para CBH, a remoção de parte da fração líquida dos meios de cultivo trouxe aumento na atividade enzimática. Uma alternativa para a remoção de inibidores poderia ser a aplicação de adsorventes em *pellets* durante o cultivo submerso.

Os dados da Figura 2 apresentam os resultados da adição de *pellets* de adsorventes ao cultivo submerso. O ensaio M16h apresentou reduzida atividade enzimática em biorreator, apresentando perfil comparado ao padrão e com valores menores ao observado nos dados prévios (não publicado) realizados em frascos agitados. Uma única exceção foi a atividade de xilanase em 92 h, que apresentou um aumento de 12% nos títulos enzimáticos comparados ao do padrão.

As atividades de CBH e FPAses não apresentaram incremento com a adição dos *pellets* de PVDF e quitina imobilizada em PVDF (Figuras 2D e 2F), enquanto que a atividade de endoglicanase apresentou incremento de 20% na atividade enzimática em 72h de cultivo com a adição de *pellets*.

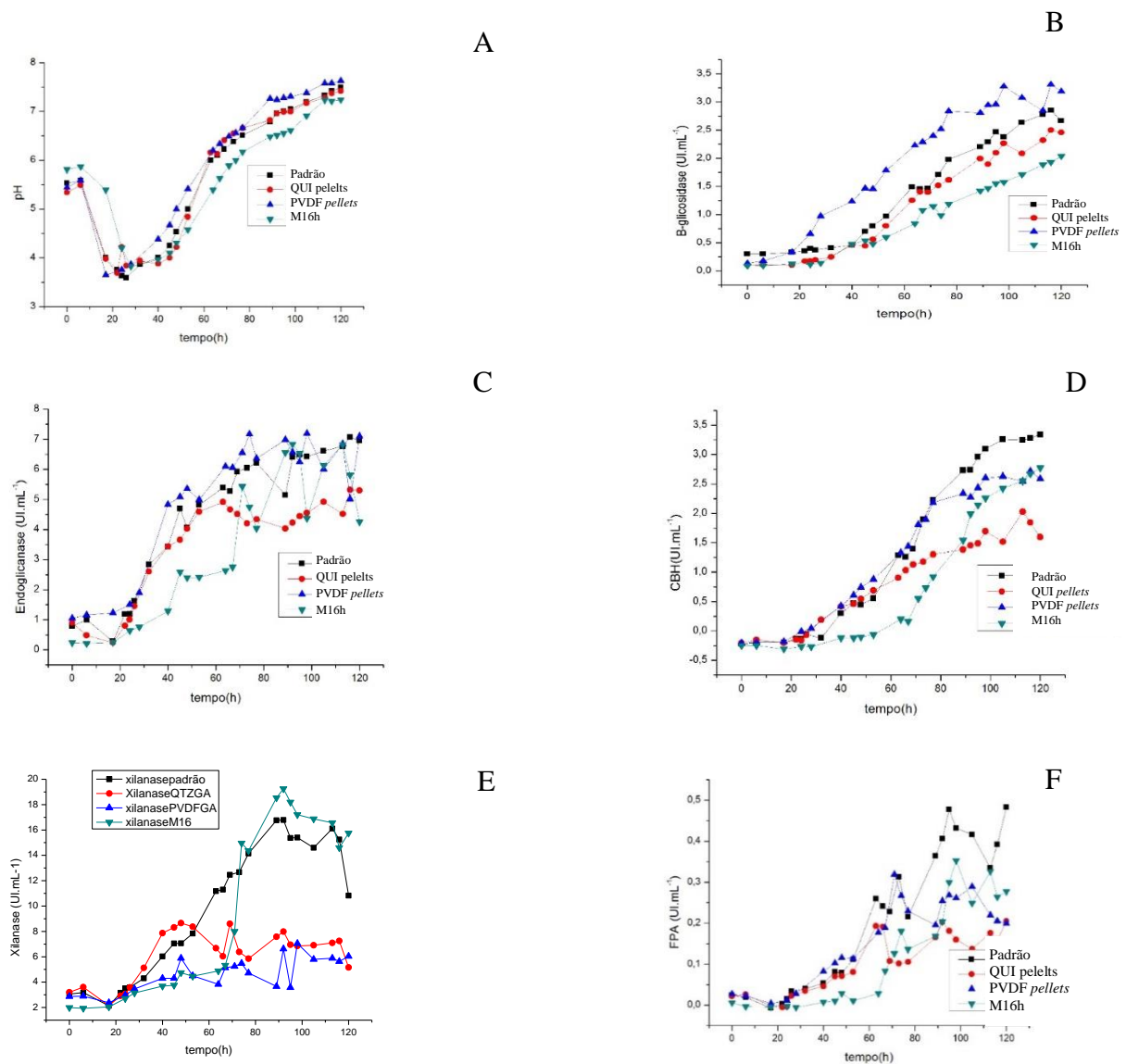


Figura 2. Atividade enzimática e pH em biorreatores utilizando *pellets* de PVDF e com quitosana para a remoção de inibidores enzimáticos e repressores catabólicos.

O uso de *pellets* de PVDF para a remoção dos inibidores e repressores no período de 24 h poderia explicar a reduzida atividade metabólica do fungo, como sugere o aumento rápido do pH (Figura 2 A). Essa adsorção pode ser explicada pela estrutura dos *pellets* que evidencia uma área superficial muito grande (Figura 3 A), cuja pele formada é densa e (Figura 3D) há a presença de macrovoids (Figura 3 C), promovendo maior transferência de massa. Os mesmos apresentaram uma estrutura simétrica porosa, composta por glóbulos poliméricos (Figura 3 E).

Uma vez que a manutenção dos *pellets* no biorreator após as 24 h apresentaram resultados positivos apenas para endoglicanase, optou-se em utilizá-los como adsorventes externamente ao processo submerso em biorreator.

A adsorção física ocorrida entre o adsorvente e adsorbato foi fraca, o que pode ser evidenciado pela oscilação na concentração de açúcares redutores durante o processo. A adsorção permite que a glicose possa ser retirada de um meio e devolvida a outro meio posteriormente. A adsorção física, ou de Van der Waals, é um processo rápido e facilmente reversível, que decorre de ação de forças de atração intermoleculares fracas entre adsorvente e as moléculas adsorvidas (Gomide, 1980).

3.3 Uso de adsorventes externamente ao biorreator

Observou-se, a partir dos resultados de adsorção em biorreatores (Figura 2), que o uso de *pellets* de PVD immobilizados com quitosana influencia na produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas. Dessa maneira, optou-se também por estudar o efeito do uso desses adsorventes externamente ao biorreator.

A adsorção de inibidores e repressores com *pellets* de PVDF 1,4 L externamente ao reator por um período de 15 min produziu aumento de 13% na atividade sobre papel-filtro quando comparada ao meio padrão (Tabela 1). A atividade de xilanase do mesmo ensaio apresentou um incremento de 35% em 88 h de cultivo quando comparada ao padrão. Acredita-se que a adsorção tenha removido pentoses e demais oligômeros polares que atuam como inibidores de celulasas (Andric, 2011). Kim *et al.* (2011) mostraram que a concentração de 21 g .L⁻¹ de xilose resultou em redução de 10% na taxa de hidrólise inicial em comparação com o controle, pois se formaram mais substâncias inibitórias.

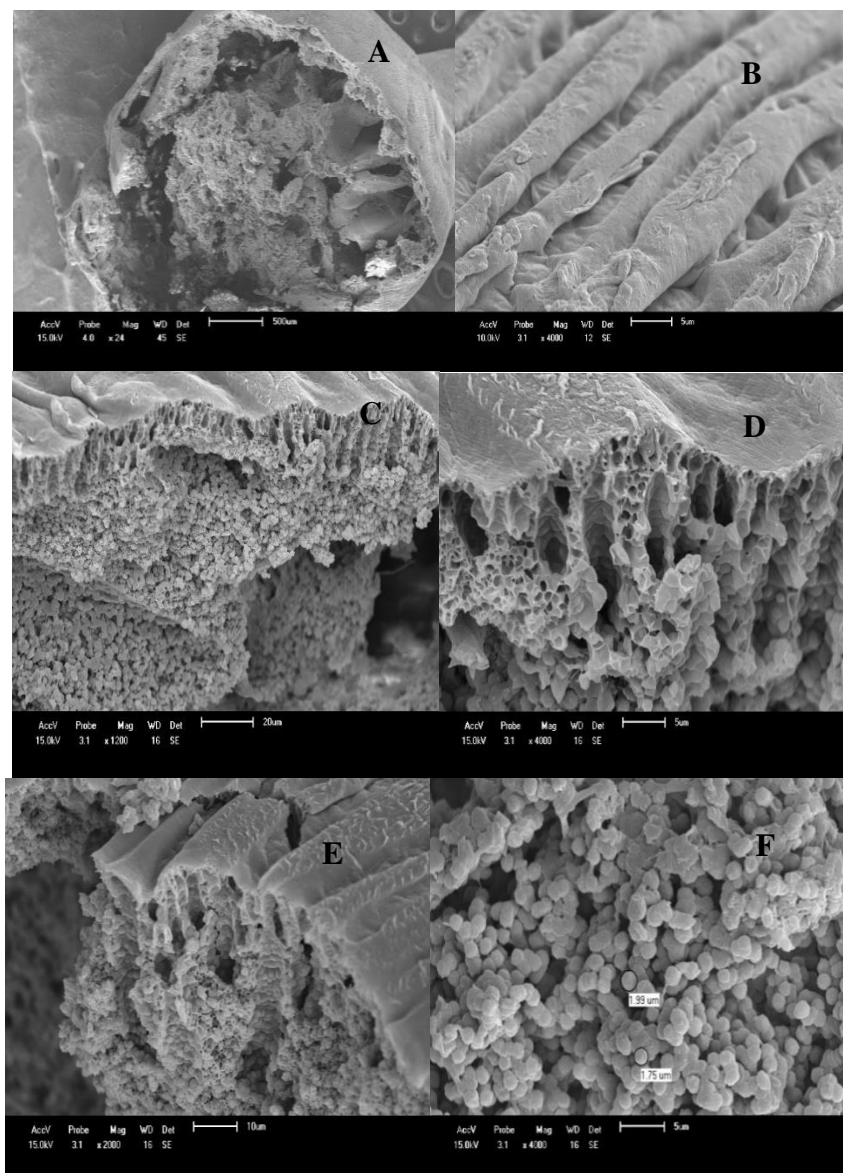


Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura de *pellets* de PVDF tratados com glutaraldeído retirados do biorreator após 120h, aumentada 24 vezes (A), superfície (B), magnitude de 600x externa em corte transversal (C) e de 2000x de corte transversal (D), fratura com magnitude 1000 x (E) e aumento de 2000x de fratura (F).

Já a atividade de endoglicanases apresentou incremento de 6% no ensaio QUI 1,4L. A remoção do açúcar solúvel pode ser observada na Tabela 1, fator que influencia na atividade enzimática. Essa remoção produziu no fungo uma nova modelagem metabólica. Cabe salientar que a celobiose exerce um efeito inibitório na atividade de celulasas quando K_I (constante de dissociação do complexo enzima-produto) atinge concentrações entre 0,01 e 6 g.L⁻¹. Já a glicose exerce efeito similar, pois inibe a atividade de β -glicosidasas quando K_I atinge valores entre 0,04 e 5 g.L⁻¹ e para outras enzimas do complexo celulasas quando a constante está entre 0,1 e 70 g.L⁻¹. (Andric *et al.*, 2010).

O uso dos *pellets* para a remoção de inibidores também apresenta a vantagem de estes serem facilmente removidos do meio.

Em relação à atividade de CBH, observou-se que a filtração de 2 L do meio com posterior adsorção não trouxe resultados positivos, pois reduziu a atividade enzimática. Já a remoção a adsorção de substâncias em 1,4 L de meio com PVDF apresentou aumento de 9% na produtividade volumétrica da enzima.

O uso de *pellets* de PVDF em meio concentrado (PVDF conc) (4,3 L iniciais) não trouxe os mesmos resultados que para o meio completo, uma vez que a remoção dos açúcares reduziu muito a concentração dos mesmos até 40 h. A utilização de carvão ativado foi uma opção paralela aos demais adsorventes, visto que o mesmo é utilizado para a remoção de compostos orgânicos em muitas situações industriais.

A atividade de endoglicanase, CBH e xilanase apresentou um aumento de 50%, 43% e 12%, respectivamente, em meio concentrado utilizando carvão ativado como adsorvente quando comparado ao padrão (Figuras 4A, 4B e 4C). A atividade de xilanase máxima apresentou um adiantamento em 36 h de cultivo, enquanto que a atividade máxima de endoglicanase manteve-se inalterada quando comparada ao padrão e utilizando os *pellets* de PVDF. A adsorção de celobiose também foi estudada por Lammirato *et al.* (2011) que constataram que a adsorção de 97% de celobiose (2 mmol.L⁻¹) após 4,5 h de contato com o carvão ativado e a adsorção foi muito rápida nos primeiros 20 min, indicando a saturação dos poros após este tempo.

Tabela 1. Atividade enzimática e concentração de açúcares redutores máximos e tempo de produção enzimática máxima em ensaios com adsorventes externamente ao biorreator.

Ensaio	Padrão	PVDF	PVDF	QUI	QUI
		1,4L	2L	1,4L	2L
Concentração de AR (g.L ⁻¹)	0,5	0,58	0,43	0,82	0,39
Tempo _{AR max} (h)	48	48	69	27	57
B- glicosidase (UI.mL ⁻¹)	2,8	2,78	1,78	2,1	1,93
Tempo _{B-glicosidase} (h)	116	112	75	72	106
Endoglicanase (UI.mL ⁻¹)	7,07	4,88	6,1	7,49	6,2
Tempo _{Endoglicanase} (h)	116	99	75	99	68
FPA (UI.mL ⁻¹)	0,47	0,53	0,2	0,35	0,25
Tempo _{FPA} (h)	95	116	92	74	88
Xilanase (UI.mL ⁻¹)	16,7	22	9,4	13,8	9,2
Tempo _{Xilanase} (h)	89	88	75	74	57
Exoglicanase (CBH) (UI.mL ⁻¹)	3,4	3,2	2,77	2	1,99
Tempo _{Exoglicanase (CBH)} (UI.mL ⁻¹)(h)	120	105	105	113	92

Em relação à atividade sobre papel-filtro (FPA), o uso dos *pellets* e do carvão não trouxe aumento na atividade enzimática. O uso do carvão como adsorvente produziu produtividade volumétrica máxima de $4,8 \cdot 10^{-3} \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto que o padrão produziu $5,4 \cdot 10^{-3} \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figura 4 D).

O efeito inibitório e repressor dos subprodutos da hidrólise e da produção de enzimas também foi investigado por Murphy *et al.* (2013). Os autores investigaram as cinco principais celulases de *T. reesei*, Cel7A (anteriormente *cbh1*), Cel6A (*cbh2*), Cel7B (GE1), Cel5A (GE2) e Cel12A (EG3), por sua sensibilidade à glicose e produtos celobiose. A inibição mais forte foi encontrada para Cel7A, que apresentou perda de atividade de 50% em $19 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ celobiose ($\text{IC}_{50} = 19 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). A outra exoglicanase, Cel6A, foi muito menos inibida por celobiose, mas mostrou a sensibilidade mais elevada à glicose entre todas as enzimas investigadas. As enzimas endoglicanases Cel12A e Cel7B foram moderadamente inibidas por celobiose ($\text{IC}_{50} = 60\text{-}80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), e fracamente inibidas por glicose. A maior inibição a ambos os produtos foi encontrada para Cel5A, que manteve 75% da sua atividade às concentrações mais elevadas investigadas (respectivamente $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ celobiose e glicose $1000 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$).

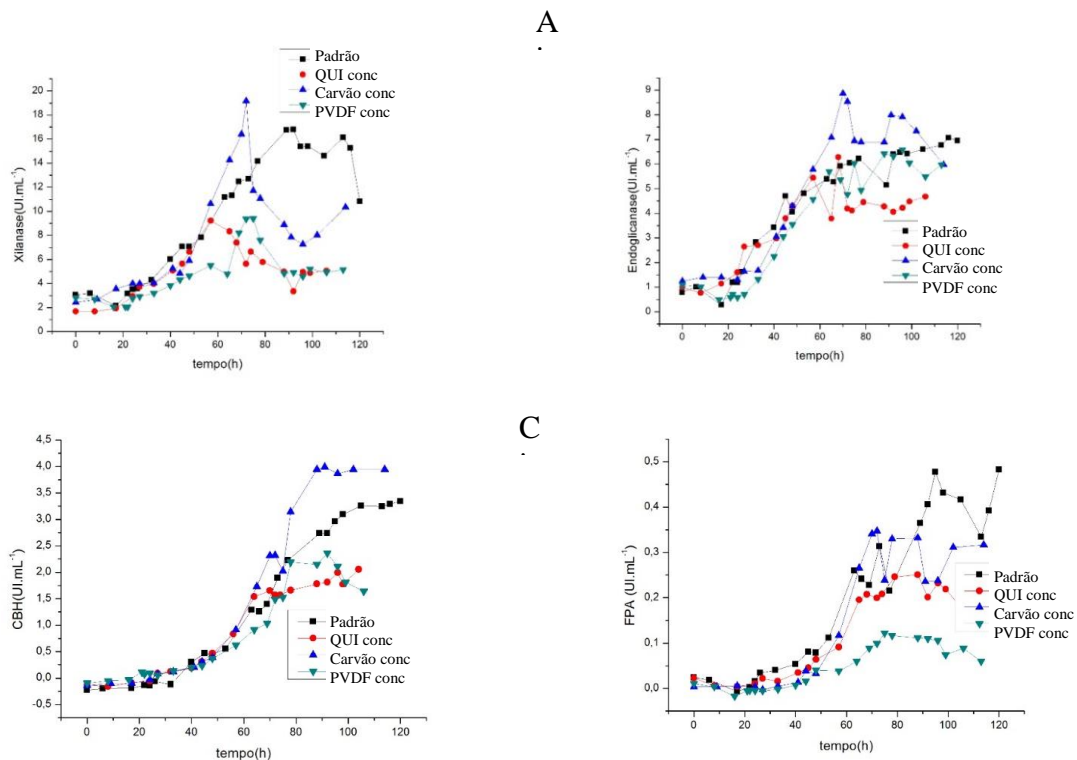


Figura 4. Atividade enzimática produzida em biorreator com 4,3L de volume inicial e uso de *pellets* de PVDF e de quitosana e com carvão ativado para remoção de inibidores.

4. CONCLUSÃO

A partir dos dados analisados, o uso de adsorventes e de *pellets* durante a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas trouxe aumento na atividade enzimática. *Pellets* de PVDF reticulados com glutaraldeído e carvão ativado apresentaram capacidade de adsorção de açúcares redutores durante cultivo submerso em biorreatores. A atividade de xilanase apresentou um incremento de 35% em 88 h de cultivo quando *pellets* de PVDF foram utilizados como adsorventes dos inibidores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrić, P.; Meyer, A.S.; Jensen, P.A.; Johansen, K.D. (2010) Effect and Modeling of Glucose Inhibition and In Situ Glucose Removal During Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochem Biotechnology* 160:280–297 DOI 10.1007/s12010-008-8512-9.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnology* 23, 257-270.
- Camassola, M., Bittencourt, L.R., Sehnem, N.T., Andreaus, J., Dillon, A.J.P., 2004. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. *Biocatal. Biotransform.* 22, 391–396.
- Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *J. Applied. Microbiol.* 103, 1204–2196.
- Chang, K.; Thitikorn-amorn, J.; Chen, S.; Hsieh, J.F.; Ratanakhanokchai, K.; Huang, P.J.; Lin, T.; Chen, S. (2011). Improving the remaining activity of lignocellulolytic enzymes by membrane entrapment, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 2, Pages 519-523, ISSN 0960-8524, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.060>.
- Chauve, M.; Mathis, H.; Huc, D.; Casanave, D.; Monot, F.; Ferreira, N.L. (2010). Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels* 2010, 3:3 doi:10.1186/1754-6834-3-3.
- Daroit, D.J., Simonetti, A., Hertz, P.F., Brandelli, A., 2008. Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. *J. Microbiol. Biotechnology* 18, 933-941.
- Deshpande, M.V.; Eriksson, K.E.; Pettersson, L.G. (1984). An assay for selective determination of exo-1,4-beta-glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*. v. 138, n. 2, p. 481-487.

- Dillon, A.J.P., Bettio, M., Pozzan, F.G., Andrighetti, T., Camassola, M., 2011. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J. Applied. Microbiol.* 111, 48–53.
- Dillon, A.J.P., Zorgi, C., Camassola, M., Henriques, J.A.P., 2006. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Applied. Microbiol. Biotechnology* 70, 740–746.
- Duff, S.D.; Cooper, D.; Fuller, O.M. (1985) Effect of Colloidal Materials on Cellulase Production *Trichoderma reesei* Rut C30. *Applied. Environ. Microbiol.* 49(4):934.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Applied. Chem.* 59, 257-268.
- Ho, W.S.W.; Sirkar, K.K.(1992). *Membrane Handbook*. Kluwer Academic Publishers.
- Kim Y.; Ximenes, E.; Mosier, N.; Ladisch, M.R. (2011). Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 48, Issues 4–5, 408–415.
- Kubicek, C. P.; Mikus, M.; Schuster, A.; Schmoll, M.; Seiboth, B (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels*, v. 2, n. 1, p. 19.
- Lammirato,C., Miltner,A., KaestnerM.(2011). Effects of wood char and activated carbon on the hydrolysis of cellobiose by b-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Soil Biology & Biochemistry* 43, 1936e1942.
- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., 1976. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology Bioengineering. Symp.* 6, 21-33.
- Mandels, M., Reese, E.T., 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals.*J. Bacteriology* 73, 269-278.
- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P., Ramos,L.P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology*. 99: 1417-1424.
- Matos, R.W. A. (2012). Complexo celulolítico de *Penicillium echinulatum*: análise ultraestrutura miceliar e influencia de modeladores epigenéticos. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chemis.* 31, 426-428.

- Murphy, L.; Bohlin, C.; Baumann, M.J.; Olsen, S.N.; Sørensen, T.H.; Anderson, L.; Borch, K.; Westh, P. (2013) Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 52, Issue 3, 5, Pages 163-169, ISSN 0141-0229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.01.002>.
- Quiroz- Castañeda, R.E.; Folch-Mallol, J.L. Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars- Chapter 6- Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass- Techniques, Applications and Commercialization <http://dx.doi.org/10.5772/53719>
- Ritter, C.E.T., Camassola, M., Zampieri, D., Silveira, M.M., Dillon, A.J.P., 2013(a) . Cellulase and xylanase production by *Penicillium echinulatum* in submerged media containing cellulose amended with sorbitol. *Enzyme Res.* 2013, 1-9.
- Ritter, C.E.T., Fontana, R.C., Camassola, M., da Silveira, M.M., Dillon, A.J.P., 2013(b). The influence of sorbitol on the production of cellulases and xylanases in an airlift bioreactor. *Bioresour. Technology* 148, 86-90.
- Suzuki, M. (1990) Adsorption Engineering. Kodansha/Elsevier, Tokyo (1990).
- Todero Ritter, C.E; Bonatto, J.; Zortea, R.; Duarte, J.; Zeni, M.; Dillon, A.J.P. (2015). Retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares impregnadas com solução de PVDF e PA. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volume 16(2).
- Verbeke, J.; Coutinho, P.; Mathis, H.; Record, E.; Asther, M.; Heiss-Blanquet, S.H. (2009) Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Lett* (2009) 31:1399-1405

4.5 Incremento na produção de celulasas e xilanases através da remoção de açúcares por Nanofiltração

A partir dos ensaios em biorreatores utilizando processos de adsorção e filtração para remoção de inibidores, verificou-se a necessidade de aprimorar o estudo sobre o efeito do tempo dos cultivos.

Os ensaios realizados no artigo 4.4 foram realizados em 24 h de cultivo. Entretanto os efeitos repressores e inibidor poderiam já ter ocorrido. Assim, o artigo 4.5 destina-se a elucidar o efeito do tempo de remoção do permeado em cultivo submerso para produção de celulasas e xilanases em Erlenmeyer e em biorreator de mistura completa.

INCREMENTO NA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES ATRAVÉS DA REMOÇÃO DE AÇÚCARES POR NANOFILTRAÇÃO

Carla Eliana Todero Ritter, Roselei Claudete Fontana, Kaliane Regalin Aver, Mara Zeni,
Aldo José Pinheiro Dillon

Resumo: A secreção de enzimas do complexo celulases é dependente da concentração de açúcares solúveis, hidrolisados da ação das mesmas em meio contendo celulose. A inibição das enzimas e a repressão catabólica em cultivo submerso tem seu efeito reduzido quando 10% e 20% do permeado são removidos. A enzima β -glicosidase teve sua atividade aumentada em 100% em 72 h quando 20% do meio foram filtrados em 24 h. A enzima endoglicanase apresentou aumento de 30% na atividade em 96 h quando 20% do meio foram filtrados em 44 h de cultivo. Entretanto, quando o ensaio com filtração de 10% do volume foi realizado em biorreator de agitação mecânica, os resultados não se reproduziram, apresentando dados similares ao padrão. Observa-se que a remoção de parte do permeado aumenta a produtividade enzimática de celulases.

Palavras-chave: *Penicillium echinulatum*, nanofiltração, celulases, repressão catabólica

1. INTRODUÇÃO

A Biotecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado (Roveda *et al.*, 2010).

Dentre as enzimas de grande aplicação na indústria encontram-se as celulases. Esse complexo enzimático é constituído por um conjunto de três enzimas hidrolíticas: as endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra da celulose; as exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que agem nas extremidades redutoras e não redutoras de polímeros gerados pela ação das Endoglicanases, liberando celobiose; e as β -1,4-glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose (Bisaria & Ghose, 1981; Zeilinger *et al.*, 2000).

As celulases fúngicas são produzidas na presença de celulose (Mandels & Reese, 1957). Entretanto, a celulose não induz diretamente a produção das enzimas por se tratar de um açúcar insolúvel. A indução só é possível a partir da ação de celulases basais, que degradam a celulose e a celo-oligossacarídeos solúveis. Estas, por sua vez, conseguem atravessar a célula fúngica desencadeando a indução (Andric, 2010).

A celobiose é o menor celo-oligossacarídeo com ligações β -1,4 e sua capacidade de induzir as celulasas já foi verificada por vários pesquisadores (Eberhart *et al.*, 1977; Rho *et al.*, 1982). A gentiobiose, dissacarídeo de glicose com ligações β -1,6, induz 50 vezes mais celulasas em *Penicillium purpurogenum* (Kurasawa *et al.*, 1991); entretanto, tal indução só é possível na presença de um inibidor de β -glicosidases (Niwa *et al.*, 1970).

Entretanto, os oligossacarídeos produzidos na hidrólise e na produção enzimática podem provocar repressão catabólica em fungos, o que diminui a produção enzimática (Andric & Meyer, 2010). A repressão pela glicose para síntese de celulasas constitui-se em um fator de restrição ao aumento da produtividade enzimática nos microrganismos celulolíticos e várias tentativas têm sido feitas para o desenvolvimento de mutantes resistentes à repressão catabólica e de mecanismos para minimizar seus efeitos (Dillon *et al.*, 2006; Singhania *et al.*, 2010; Dillon *et al.*, 2011; Rachuwanshi *et al.*, 2014).

Assim, o presente estudo tem o objetivo de analisar a remoção de substâncias solúveis causadoras de repressão catabólica em diferentes etapas do cultivo e verificar o efeito na produtividade enzimática de celulasas e xilanases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A linhagem *P. echinulatum* S1M29, pertencente ao Instituto de Biotecnologia, obtida por mutagênese (Dillon *et al.*, 2011) foi empregada para a produção de celulasas e xilanases. Colônias foram crescidas em meio agar-C durante até sete dias, a 28°C até formação de conídios e armazenadas a 4°C até a sua utilização.

2.2 Análise enzimática

A atividade enzimática sobre papel-filtro (FPA) foi realizada como descrito por Mandels *et al.* (1969). Endoglicanase foi determinada de acordo com Ghose (1987) utilizando 2% de carboximetil celulose em tampão de citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ (pH 4,8) e a atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato (Daroit *et al.* 2008). Para a determinação da atividade de celobiohidrolases (Exoglicanase), foi utilizado como substrato o *p*-nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (ρ NPC), empregando-se a metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984). As atividades de xilanase foram determinadas de acordo com Bailey *et al.* (1992). As concentrações de açúcares redutores foram estimadas usando ácido dinitrossalicílico de acordo com Miller (1959). Uma

unidade de atividade enzimática foi definida como um μmol de açúcares redutores libertados por minuto sob as condições de ensaio.

2.3 Meio para o cultivo submerso

O meio de cultivo foi composto de 1% (m/v) de celulose cristalina, 0,2% (m/v) de farelo de soja, 0,5% (m/v) de farelo de trigo, 5% de solução de sais (Mandels & Reese, 1957), 0,02% (v/v) de Tween80, 0,02% (v/v) de antiespumante Fluent e água destilada para completar o volume de 100 mL. A solução de sais era composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): KH_2PO_4 , 20; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; CaCl_2 , 3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,050; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0156; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,014; and CoCl_2 , 0,020.

2.4 Filtração em frascos Erlenmeyer e em biorreator

Durante os cultivos, foram realizadas etapas de filtração do meio, que ocorreram nos períodos de tempo de 18 h, 24 h e 44 h após o inóculo com esporos. O processo de filtração removeu 10 e/ou 20% (v/v) do meio. Para a denominação das amostras, primeiramente utilizou-se o tempo de cultivo seguido pelo percentual removido separado por uma barra inclinada. Exemplificando: no ensaio 18/20, significa que a filtração ocorreu 18 h após a inoculação e removeram-se 20% do meio líquido por processo de filtração. O volume removido foi completo com solução diluída de sais correspondente ao volume removido.

A membrana tubular cerâmica utilizada para esses ensaios possuía um *cut-off* molecular de 5 KDa, conforme especificações da empresa produtora Andritz. O processo em crossflow foi realizado com bomba peristáltica para circulação do meio em velocidade de 0,5 a 1m/s e, para a remoção do permeado, foi usada uma bomba a vácuo acoplada no módulo metálico da membrana. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar para manter a esterilidade do ambiente. Coletou-se amostra do meio de cultivo antes e depois do processo de filtração. O tempo de filtração oscilou entre 2 e 15 min, dependendo da obstrução dos poros da membrana.

Não foi realizada a limpeza da membrana entre os ensaios do mesmo horário, apenas removeu-se o micélio com passagem de ar e circulação de água destilada. Após os ensaios, foi realizada a limpeza química da membrana com solução de NaOH a 5%. A membrana ficou imersa em solução de azida sódica a 0,5% entre os ensaios e depois foi lavada com água corrente e esterilizada com álcool 70% e água destilada esterilizada. Todos os ensaios em Erlenmeyer foram realizados em triplicata.

A filtração em biorreator foi realizada em *crossflow* utilizando bomba peristáltica para circulação do meio e bomba a vácuo para remoção do permeado. Todo o sistema foi autoclavado e, durante a operação, não houve controle de pH. O sistema de aeração e agitação foi controlado a fim de manter o mínimo de 30% de oxigênio dissolvido.

2.5 Percentual de remoção de açúcares

Para o cálculo do percentual de açúcares redutores solúveis removidos por filtração, utilizou-se a Equação 1:

$$\% = [(C_i - C_f) / C_i] \cdot 100 \quad (1)$$

Sendo C_i = concentração inicial de açúcares no meio de cultivo; C_f , concentração de açúcares redutores no meio após a filtração.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados segundo análise de variância usando post-teste Tukey, com significância de $p < 0.05$ no programa GraphPad Prism (Graph Pad, San Diego, CA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de filtração com membrana tubular de nanofiltração removeu parte dos açúcares redutores presentes no meio de cultivo (Tabela 1), sendo no ensaio 18/20, a maior concentração removida ($0,36 \text{ g.L}^{-1}$). Entretanto, houve a remoção de enzimas celulolíticas. A perda de endoglicanase foi mais expressiva nos meios de 44 h de cultivo ($1,3 \text{ UI.mL}^{-1}$) e não houve perdas significativas do complexo celulolítico (FPA) nos ensaios realizados.

Tabela 1. Redução da atividade enzimática de enzimas celulolíticas e percentual de remoção de açúcares redutores no permeado.

Amostras	18/10	18/20	24/10	24/20	44/10	44/20
% de remoção de açúcar	32	32	40	40	78	78
FPA (UI.mL^{-1})	0,06	0,01	0,02	0,01	0,013	0,02
β -glicosidase (UI.mL^{-1})	0,32	0,36	ND	ND	0,4	0,36
AR (g.L^{-1})	0,28	0,32	ND	ND	0,3	0,19
Endoglicanase (UI.mL^{-1})	0,36	0,43	ND	ND	1,3	1,2

Os ensaios avaliados demonstraram que a remoção de 20% do meio por filtração com membrana de *cutt off* molecular de 5 KDa em 24 h de cultivo produziu um incremento de

46% na atividade de FPA em 96 h (Figura 1A). Quando a remoção do mesmo percentual foi em 44 h (44/20), houve um aumento de 33% quando comparado ao padrão em 96 h. Os demais ensaios não apresentaram diferença estatística para FPA em 96 h. Em 120 h de cultivo, os ensaios 24/20 e 44/10 apresentaram pequena diferença estatística em relação ao padrão na atividade sobre papel-filtro, apresentando vantagem à remoção de parte da fração solúvel do meio de cultivo.

Em relação à atividade de exoglicanase (Figura 1B), em 72 h, o aumento na atividade enzimática do ensaio 24/20 foi de 50%. O ensaio 18/10 apresentou as menores atividades enzimáticas para todas as enzimas analisadas (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D). A partir de 96 h, não se observa diferença estatística entre os ensaios, excetuando o 24/20 em 72 h de cultivo.

Diferentemente destes dados, a atividade de endoglicanase apresentou-se sensível à remoção da fração solúvel entre 72 h e 96 h, em que todos os ensaios apresentaram incremento, excetuando o 18/10 e 18/20 (96 h) (Figura 1C). Os ensaios 18/20, 24/10, 24/20, 44/10 e 44/20 apresentaram, em média, em 72 h, um incremento de 33%. Já em 96 h, o ensaio 44/20 apresentou atividade superior a 40% do padrão. Em 120h, a atividade de endoglicanase dos ensaios realizados iguala-se estatisticamente ao do padrão, excetuando o cultivo 18/10 (Figura 1C).

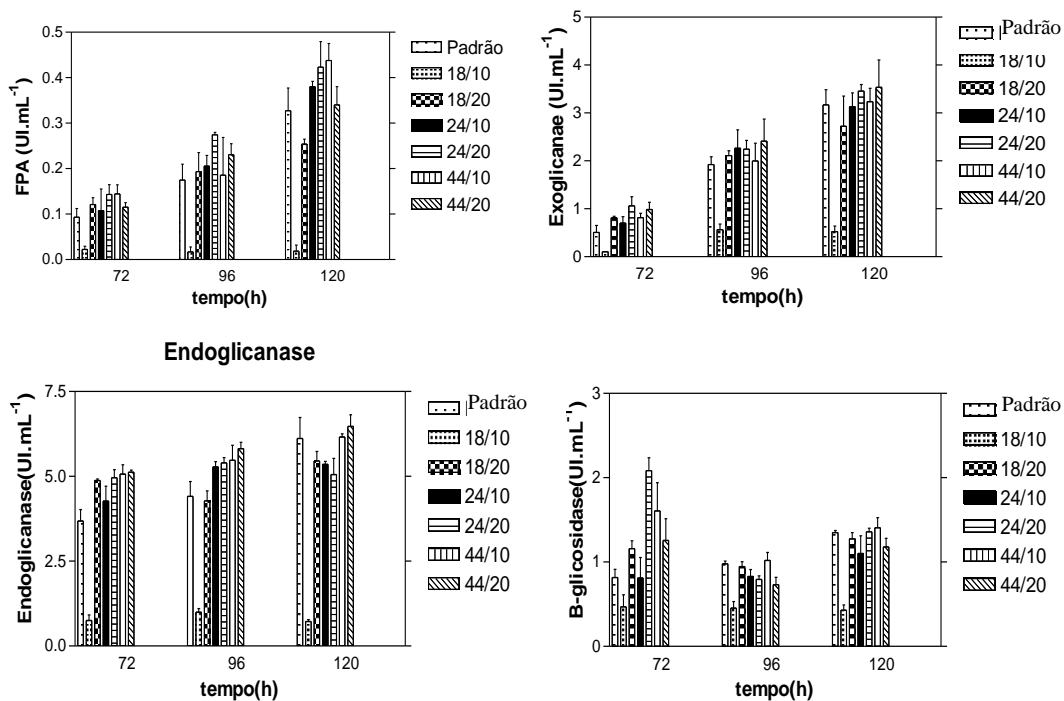


Figura 1. Atividade enzimática de ensaios com filtração de 10 % a 20 % do meio e cultivo com membranas tubulares em 18 h, 24 h e 44 h de cultivo.

Em relação à concentração de açúcares redutores, observa-se que a mesma aumenta de 30% a 96% até 72 h nos ensaios filtrados, excetuando o 18/10. Após esse período, a concentração de açúcares livres (Figura 2) reduz para concentrações mínimas. Em relação ao pH, o ensaio 18/10 apresentou pH mais elevado que o do padrão, razão que poderia evidenciar baixa atividade enzimática.

A partir da constatação, o ensaio 24/20 apresentou bons resultados para β -glicosidase e FPA, aumentando a atividade enzimática em relação ao padrão. Portanto, optou-se em reproduzi-lo em biorreatores com agitação mecânica.

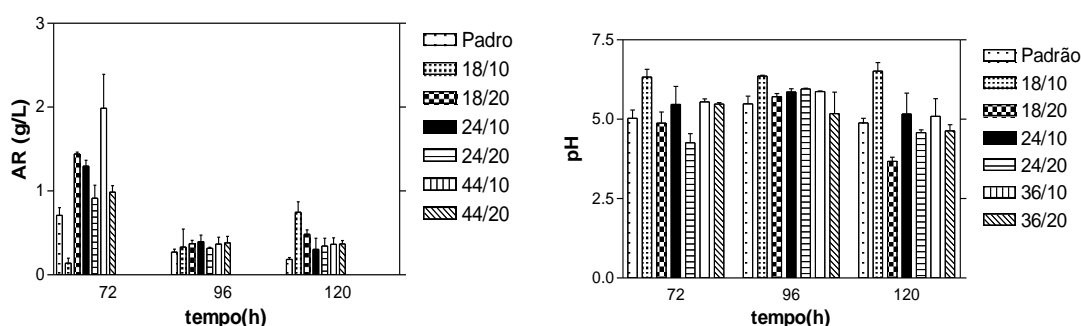


Figura 2. Concentração de açúcares redutores e valores de pH em ensaios com filtração.

Os resultados do ensaio 24/10 foram similares ao do padrão em termos de concentração de AR, pH e enzimas analisadas (Figura 3). Apesar de não haver aumento na atividade enzimática nesse ensaio, observa-se que no permeado não houve a remoção de enzimas Endoglicanases e FPA, enquanto que 90% das enzimas xilanolíticas foram permeadas nos 700 mL removidos. A remoção de AR foi de 50% nas 24 h de cultivo (42 mg de AR), evidenciando que a remoção pode ser realizada sem dano ao processo e com futura utilização do açúcar removido.

Para as atividades xilanolíticas (Figura 3E) e de CBH (Figura 3F), observou-se que a filtração de 10% do meio em biorreator não alterou significativamente o comportamento e títulos enzimáticos.

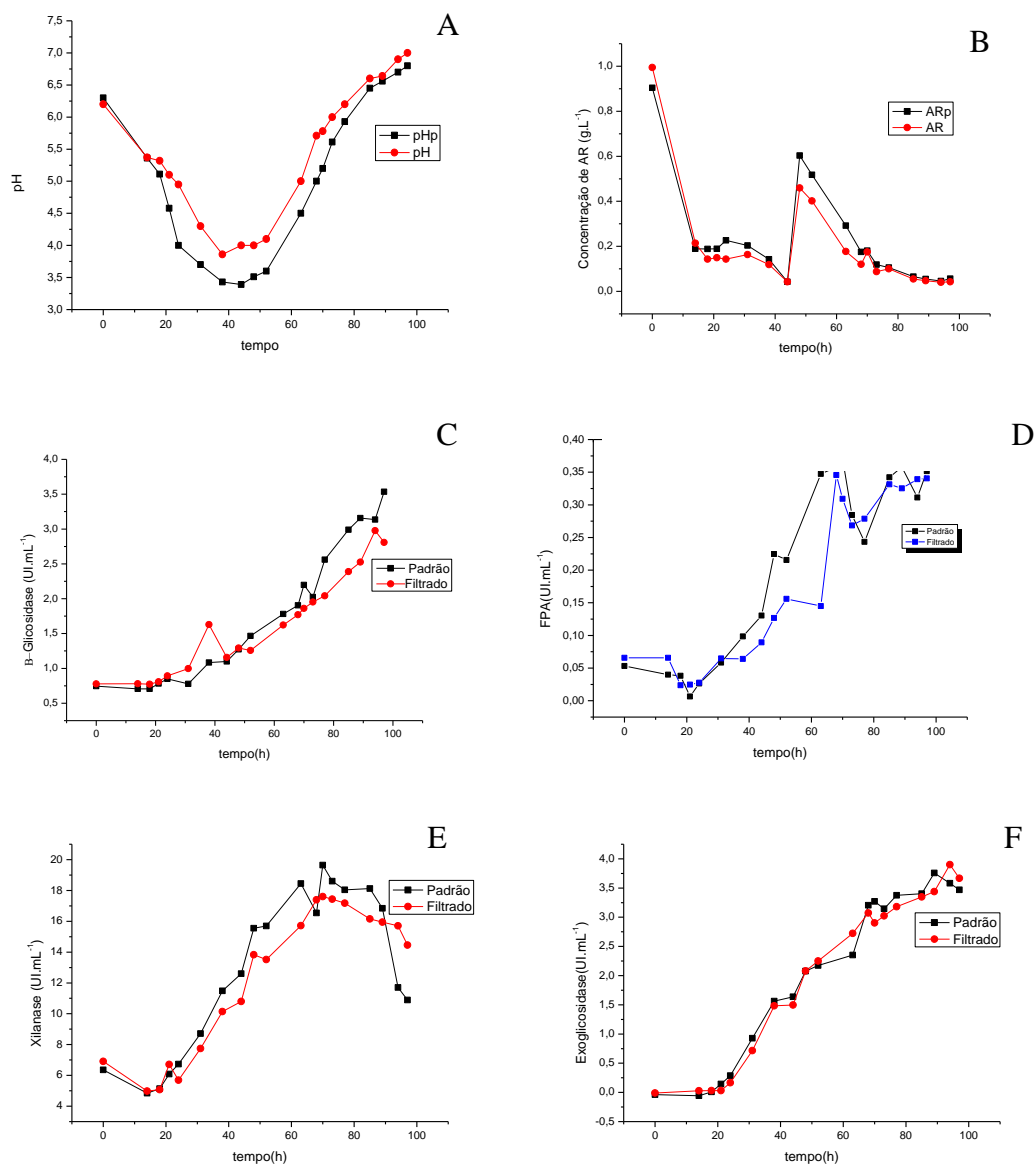


Figura 3. Dados de pH (A), concentração de AR (B) e atividade enzimática (C a F) do ensaio 24/10 em biorreator.

4. CONCLUSÃO

A partir dos ensaios com remoção de parte do permeado, observa-se que o processo é promissor, uma vez que aumentou a produtividade enzimática. A atividade de β -glicosidase apresentou picos máximos anteriores ao ensaio padrão para todos os ensaios ocorridos após 24h de cultivo. A remoção de 10% e 20% de permeado aumentou, em média, 33% da produção enzimática de endoglicanase em ensaios em frascos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIĆ, P.; Meyer, S.Y. (2010) Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of celobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 308-324.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnology* 23, 257-270.
- Bisaria, V. S.; Ghose, T. K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. *Enzyme Microb. Technology* 3: 90-104.
- Daroit, D. J.; Simonetti, A.; Hertz, P. F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. *J. Microbiol. Biotechnology* 18: 933-941.
- Deshpande, M.V.; Eriksson, K.E.; Pettersson, L.G. (1984). An assay for selectivedetermination of exo-1,4-beta-glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*. v. 138, n. 2, p. 481-487.
- Dillon, A. J. P.; Pozza, F.; Andrighetti, T.; Bettio, M.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J. Applied. Microbiol.*, v. 111(1), p. 48-53
- Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J. A. (2006) Use of 2- deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 70, p. 740–746.
- Eherhart, B. M.; Beck; R. S.; Goolsby, K. M. (1977). Cellulase of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriology* 130: 181-186.
- Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Applied Chem* 59: 257-268.
- Kurasawa, T.; Yachi, M.; Suto, M.; Kamagata, Y.; Takao, S.; Tomita, F. (1991). Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Applied. Environ. Microb.* 58: 106-110.
- Mandels, M.; Reese, E. T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriology* 73: 269-278.
- Mandels, M.; Weber, J. (1969) The production of cellulases. *Amer Chem Soc Adv Ser* 95:391-414.

- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31: 426-428.
- Niwa, T.; Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Koaze, Y.; Niida, T. (1970). "Nojirimycin" as a potent inhibitor of glucosidase. Agric. Biol. Chem. 34: 966-968.
- Raghuwanski, S.; Deswal, D.; Karp, M.; Kuhad, R. C.(2014) Bioprocessing of enhanced cellulose production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. **Fuel**, v. 124, p. 183-189.
- Rho, D.; Desrochers, M.; Jurasek, L.; Driguez, H. Defaye, J. (1982). Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new inducer. J. Bacteriology 149: 47-53.
- Roveda, M.; Hemkemeier, M. Colla, L.M (2010) Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 30(1): 126-131.
- Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Proche A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. (2010) Advanced and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology, v. 46, p. 541-549.
- Zeilinger, S.; Haller, M.; Mach, R.; Kubicek, C. P. (2000). Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jeconina*. Biochem. Biophys. Res. Commun.277: 581-588.

4.6 Nanofiltração na remoção de inibidores de celulasas durante cultivo submerso de *Trichoderma reesei*

A remoção de parte da fase aquosa (10% e 20%) dos cultivos em Erlenmeyer com *P. echinulatum* representou aumento na produtividade enzimática das enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

Entretanto, a aplicabilidade do método de filtração não está restrita a apenas um microrganismo. O artigo de item 4.6 visa avaliar o comportamento do fungo *Trichoderma reesei* RUT C30, desreprimido à glicose, frente ao método de remoção de parte do permeado durante a produção de celulasas.

NANOFILTRAÇÃO NA REMOÇÃO DE INIBIDORES DE CELULASES DURANTE CULTIVO SUBMERSO DE *TRICHODERMA REESEI*

Carla Eliana Todero Ritter¹, Cláudia Galinha², João Paulo Serejo Crespo², Mara Zeni¹, Aldo José Pinheiro Dillon¹

e-mail autor: cetodero@gmail.com

¹Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Brasil

² Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

Resumo: Os hidrolisados de lignocelulósicos produzidos a partir de enzimas celulolíticas possuem grande importância no cenário mundial devido à aplicação das mesmas na produção de etanol, butadieno, etanol, manitol, xylitol, resinas, poliéter dentre outros. Aumentar a produtividade enzimática a partir da remoção de parte do permeado durante o cultivo submerso de *T. reesei* foi o objetivo desse trabalho, no qual se constatou que essa remoção tem efeito positivo após 8 h. As enzimas β -glicosidase e endoglicanase apresentaram aumento na atividade enzimática quando 10% de permeado foram removidos em 12 h de cultivo. Em biorreatores, a remoção não apresentou incremento na atividade para situação de pH não controlado. Entretanto, em pH 5, a FPA e atividade de endoglicanase apresentaram incremento significativo em relação ao padrão.

Palavras-chave: celulases, nanofiltração, repressão catabólica, *Trichoderma reesei*

1. INTRODUÇÃO

Biomassa lignocelulósica é uma abundante e renovável fonte de carboidratos para conversão a produtos químicos de alto valor agregado (Geddes *et al.*, 2011), combustíveis (Nigam & Singh, 2011) e subprodutos (Howard *et al.*, 2003).

Celulose é o principal constituinte da biomassa. É um polímero linear de monômeros de glucose e que pode ser hidrolisada pela ação de enzimas (Ahamed & Vermette, 2008). As enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose são as celulases, complexo enzimático que cliva ligações glicosídicas e está dividido em três grupos majoritários (Goyal *et al.*, 1991; Rabinovich *et al.*, 2002a,b): endoglicanases ou endo-1,4- β -glicanase (EC 3.2.1.4), celobiohidrolase (CBH) ou (EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21).

O ascomiceto *Trichoderma reesei* é um fungo capaz de degradar biomassa secretando enzimas celulolíticas que são utilizadas nas indústrias do papel, de alimentos e de produtos têxteis (Ries *et al.*, 2014). Em *T.reesei*, o dissacarídeo sofrorose (Mandels & Weber, 1969) e a lactose (Ivanova, 2013) induzem a capacidade de produção dessas enzimas, enquanto que a glicose e celobiose agem como inibidores (Smith *et al.*, 2010) e repressores catabólicos (Teugjjas & Våljamäe, 2013). Os genes susceptíveis à repressão em *T.reesei* são expressos na presença de açúcares facilmente metabolizáveis, como a glicose (Teleman *et al.*, 1995, Mach *et al.*, 1996, Ilmén *et al.*, 1996).

Como alternativa, substâncias causadoras de inibição enzimática podem ser removidas utilizando-se membranas de extração, adsorção e separação, aumentando, com isso, a taxa de hidrólise (He *et al.*, 2012). O uso de ultrafiltração e nanofiltração na hidrólise de lignocelulósicos apresenta-se como promissor na geração de produtos destinados à produção de bioprodutos fermentativos e biocombustíveis (Qi *et al.*, 2012).

Assim, o objetivo desse trabalho é verificar o efeito da remoção do permeado na produção de enzimas celulolíticas em cultivo submerso por *T. reesei*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A linhagem *Trichoderma reesei* RUT C30 foi empregada para a produção de celulases e xilanases. Colônias foram crescidas em meio agar-C durante até sete dias, a 28°C até a formação de conídios e armazenadas a 4°C até a sua utilização.

2.2 Meio para o cultivo submerso

O meio de cultivo foi composto de 1% (m/v) de celulose cristalina, 0,2% (m/v) de farelo de soja, 0,5% (m/v) de farelo de trigo, 5% de solução de sais (Mandels & Reese, 1957), 0,02% (v/v) de Tween80 e água destilada para completar o volume de 100 mL. A solução de sais era composta por (g.L⁻¹): KH₂PO₄, 20; CO(NH₂)₂, 3; MgSO₄ · 7H₂O, 3; CaCl₂, 3; FeSO₄ · 7H₂O, 0.050; MnSO₄ · H₂O, 0.0156; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.014; e CoCl₂, 0.020.

2.3 Condições experimentais

O biorreator utilizado possuía 2L de volume e controle de pH, aeração (0,6 vvm), agitação (30% mínimos de saturação de O₂), antiespumante (polietilenoglicol) e temperatura

(28°C). O controle do pH 5 foi feito com a adição de soluções 2 mol.L⁻¹ NH₄OH ou 1 mol.L⁻¹ H₂SO₄. Em um dos experimentos em biorreator não houve controle de pH.

Os inóculos dos experimentos em biorreator de agitação mecânica e em frascos Erlenmeyer corresponderam a 10% do volume total e, quando realizados com esporos, foram adicionados 1.10⁵ esporos.mL⁻¹.

Os ensaios em Erlenmeyer foram realizados em duplicata.

Amostras foram coletadas (10 mL), centrifugadas e preservadas com 10 µL de solução de azida sódica (0,02%) sob refrigeração a 4°C até posterior análise.

2.4 Condições de filtração em biorreator e em frascos Erlenmeyer

Inicialmente foram realizados ensaios com água destilada e com meio de cultivo submerso com membranas cerâmicas tubulares de *cut-off* molecular de 5 KDa (N5) e 10 KDa (N10), fornecida pela empresa Andritz.

O processo de filtração realizou-se em crossflow, utilizando-se bomba peristáltica para circulação do meio de cultivo e bomba Carretos para a remoção do permeado. O volume de permeado (P) removido foi de 10% do volume total do biorreator e 10% e 20% para os meios realizados em flasks Erlenmeyer. Os meios foram nomeados seguindo o critério: inicialmente o tempo de filtração (h) e posteriormente o percentual de permeado removido (%). Os ensaios em frascos foram realizados em duplicata.

A filtração em biorreator iniciou-se com 20 h de cultivo e houve a remoção de 200 mL de permeado. Em frascos Erlenmeyer com inóculo com esporos, a filtração ocorreu em 12 e 20 h a fim de evitar a remoção de esporos, enquanto que, em frascos inoculados com pré-inóculo de 48 h, a filtração ocorreu em 3 h, 8 h e 22 h.

2.5 Fluxo de permeado

Os ensaios de fluxo permeado foram realizados utilizando água destilada e com meio de cultivo submerso. O fluxo segue expresso conforme a Equação 1:

$$J = \frac{V}{A \times \Delta t} \quad (1)$$

Sendo: J: o fluxo de permeado (L.m⁻².h⁻¹); V: volume (L); A: área (m²); Δt: tempo (h).

2.6 Análise da Atividade enzimática e proteínas totais

A atividade enzimática sobre papel-filtro (FPA) foi realizada como descrito por Mandels *et al.* (1969). Endoglicanase foi determinada de acordo com Ghose (1987) utilizando 2% de carboximetil celulose em tampão de citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e a atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato (Daroit *et al.*, 2008). Para a determinação da atividade de celobioidrolases (exoglicanase), foi utilizado como substrato o ρ -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (pNPC), empregando-se a metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984). As atividades de xilanase foram determinadas de acordo com Bailey *et al.* (1992) e proteínas totais segundo Bradford (1976). As concentrações de açúcares redutores (AR) foram estimadas usando ácido dinitrossalicílico de acordo com Miller (1959).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como um μ mol de açúcares redutores liberados por minuto sob as condições de ensaio.

2.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados segundo análise de variância usando post-teste Tukey, com significância de $p < 0.05$ no programa GraphPad Prism program (Graph Pad, San Diego, CA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das membranas

Na figura 1 são apresentados os dados que representam a característica de fluxo da membrana trabalhando com água e com meio de cultivo de 24h.

Na Tabela 1, foram apresentados os dados de filtração do meio de cultivo de 24h e 48 h referentes à permeabilidade e seletividade da membrana. Observou-se que, com a filtração, houve remoção de 15% da atividade de FPA no cultivo de 48h e 50% no cultivo de 24 h. Ainda ocorreu remoção de 80% das proteínas totais dos meios de cultivo, resultado da hidrólise da celulose e farelos e da presença de enzimas do complexo celulolítico (5 a 200 KDa). Em estudo com endoglicanases II, Kim *et al* (1994) apresentaram que a massa molecular dessa enzima varia de 60 a 62 KDa.

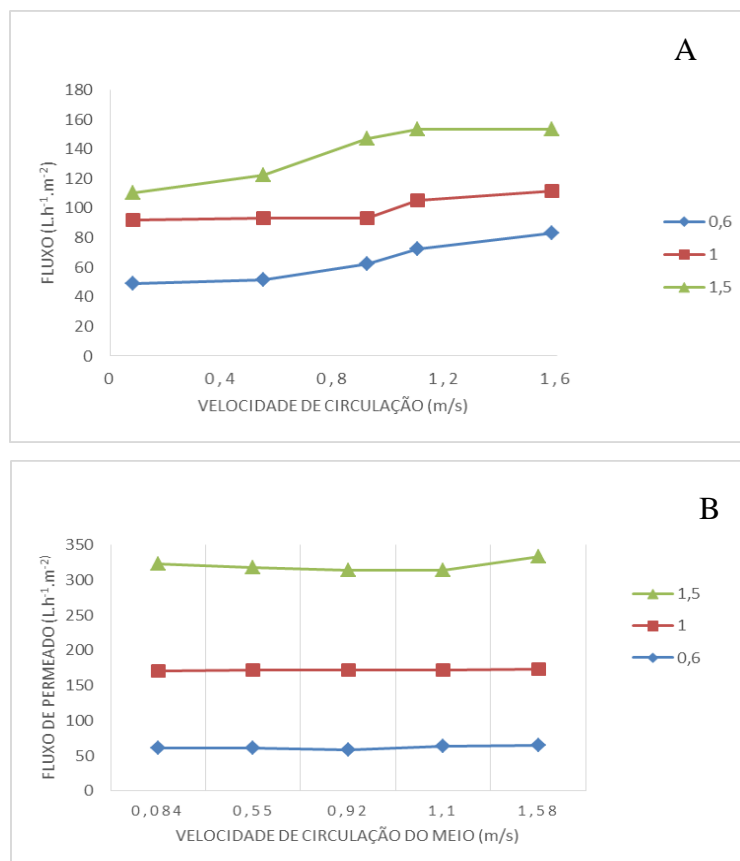


Figura 1. Fluxo de permeado durante nanofiltração em ensaio com água (A) e com meio de cultivo de 24h (B). Ensaios realizados com velocidade de permeação de 0,6, 1 e 1,5 mL.min⁻¹.

Tabela 1. Fluxo e percentual de remoção enzimática e de AR em ensaios de filtração com meios completos de 24 h e 48 h.

Meio de cultivo	Fluxo (L.h ⁻¹ .m ⁻²)		Remoção de AR(%)	Remoção (%)		
	mínimo	máximo		FPA	Proteínas totais	Endoglicanase
24 h	40	7	5	50	80	32
48 h	10	4	40	15	80	42

Em relação à morfologia do fungo, não houve modificações no decorrer dos ensaios (Figura 2). As hifas não apresentaram fragmentação e o diâmetro manteve-se inalterado, evidenciando que o processo de filtração aplicado não causa danos ao microrganismo.

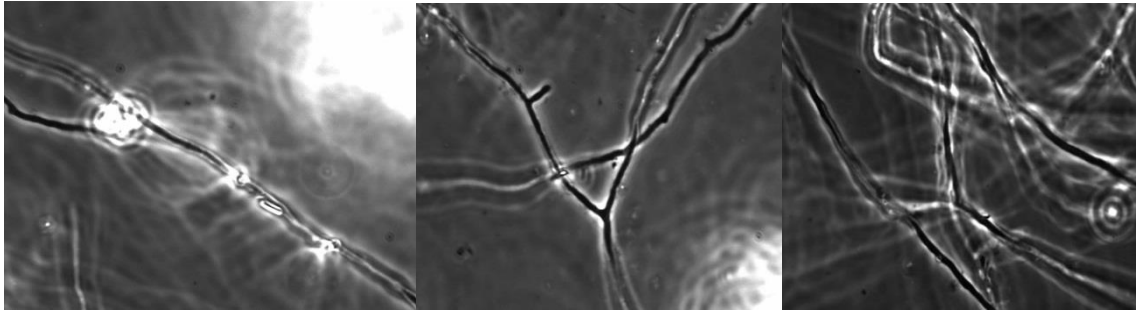


Figura 2. Morfologia de *T.reesei* em 24 h de cultivo submerso de 24 h (A), após 30min em filtração (B) e após 60 min (C).

3.2 Produção de celulases com emprego de inóculo micelial ou conidial e filtração do meio por nanofiltração

O efeito da filtração sobre a produção de enzimas celulolíticas foi significativamente alterado em função do tempo de remoção do permeado, percentual de remoção (%) e do inóculo realizado. Quando o inóculo foi realizado com esporos (Figura 3), observa-se que, em 48 h de cultivo, as atividades enzimáticas sobre papel-filtro, β -glicosidase e endoglicanase apresentaram títulos menores que o padrão.

Após 60 h de cultivo, a atividade de β -glicosidase do meio padrão foi de $1,97 \pm 0,13 \text{ UI.mL}^{-1}$, enquanto que os meios filtrados (10%) em 12 h (12/10) e 20 h (20/10) atingiram atividade de $2,44 \pm 0,197 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $1,8 \pm 0,197 \text{ UI.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 3B).

Os ensaios 12/10 e 20/10 também apresentaram aumento de FPA em 60 h (Figura 3 D) de 15% e 11%, respectivamente. Para a enzima endoglicanase, a atividade apresentou incremento de 40,7% e 52,2% (Figura 3C), respectivamente, para os ensaios citados, demonstrando o fator positivo da remoção de 10% de permeado na produção enzimática. Já para FPA, o aumento representou 15% e 11% para os meios 12/10 e 20/10.

Entretanto, a remoção de 20% de permeado não foi favorável para nenhuma das enzimas analisadas, fato relacionado à menor concentração de açúcares redutores no tempo analisado quando comparado ao padrão (Figura 3).

Em relação ao permeado, o processo de filtração com o meio iniciado com esporos apresentou remoção de enzimas e de açúcares redutores (Tabela 2). Endoglicanases I, III e IV exibem massas moleculares de 52 KDa, 42 KDa e 38 KDa, respectivamente (Kim, *et al.*, 1994), e para β -glicosidase de *T. reesei* (BGL1), 75 KDa (Chauve *et al.*, 2010).

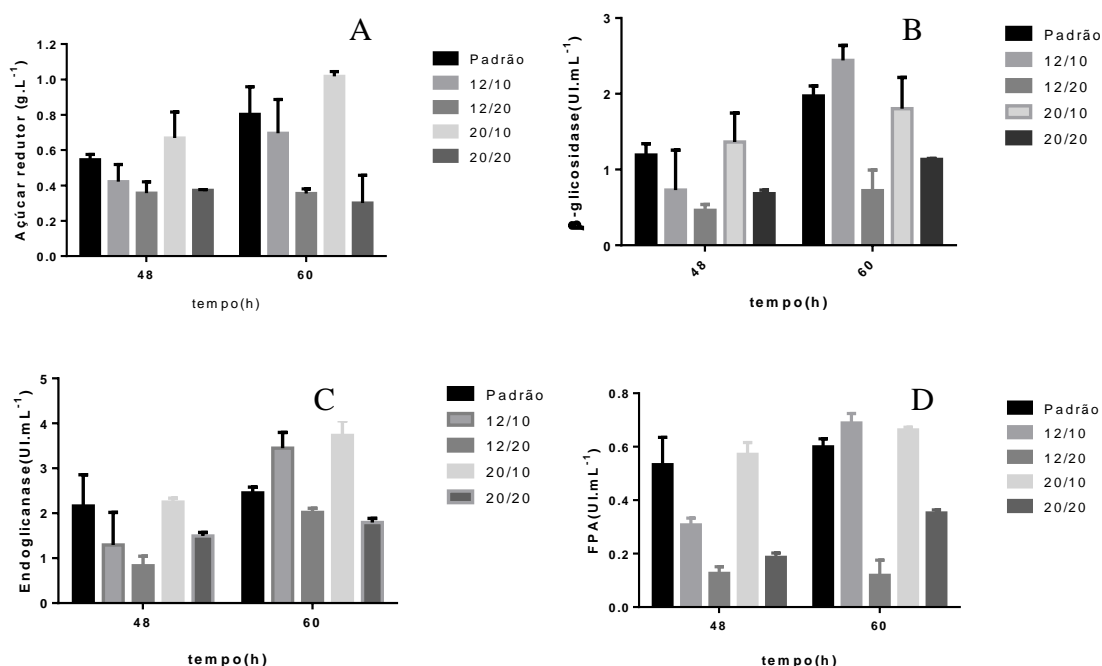


Figura 3. Atividade enzimática de β -glicosidase, endoglicanase e sobre papel-filtro e concentração de açúcares redutores durante cultivo submerso inoculado com esporos após filtração com membrana (O primeiro número refere-se ao tempo (h) de cultivo que ocorreu a filtração e o segundo número refere-se ao percentual de permeado).

Tabela 2. Açúcares redutores e atividade enzimática (FPA, β - glicosidase e endoglicanases) após a filtração em cultivo submerso em frascos inoculados com esporos.

	Meios de cultivo			
	P 12/10	P 12/20	P 20/10	P 20/20
AR(%)	36	35	20	42
FPA(%)	0	0	0	0
β - glicosidase(%)	0	0	0	0
Endoglicanase(%)	0,1	6	0	0

Os dados correspondem à média da duplicata realizada.

Uma vez que o inóculo realizado com esporos apresentou atividade máxima em 60 h, optou-se em realizar os ensaios com pré-inóculos de 48 h (10% v/v), simulando situação idêntica em biorreatores. Os efeitos da filtração apresentaram-se negativos para a atividade FPA (Figura 4B). A partir desses dados, conclui-se que a remoção de permeado em até 8 h tem efeito negativo sobre FPA, visto que as 24, 30 e 34 h, nas condições em que ocorreram filtrações, as atividades enzimáticas foram menores do que a obtida pelo controle. Porém, a condição 8/20 nas 48h apresentou atividade enzimática 35% superior ao padrão.

Em relação à atividade de endoglicanase, o pico máximo de atividade foi em 34 h. Nesse período, observou-se que a condição 3/10 apresentou atividade 10% superior ao ensaio 3/20, mas inferior em relação ao padrão (Figura 4A).

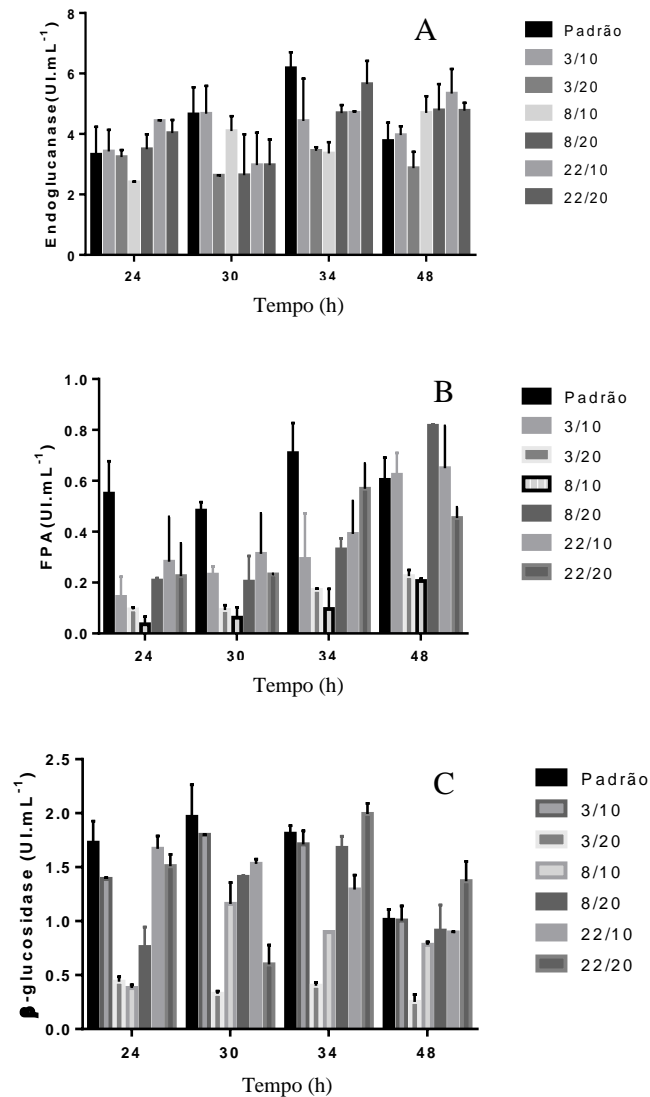


Figura 4. Atividade enzimática de β-glicosidase, endoglicanase e FPA em cultivo submerso inoculado com pré-inóculo de 48 h após filtração com membrana. Nas legendas, o primeiro número refere-se ao tempo (h) de cultivo que ocorreu a filtração e o segundo número refere-se ao percentual do volume do permeado.

3.3 Filtração em biorreatores

Adicionalmente ao estudo em frascos Erlenmeyer, também se estudou o efeito da filtração em atividades enzimática em cultivos realizados em biorreator de agitação mecânica.

Foi realizada filtração de 20% do meio nas 20 h de cultivo, sendo que, em um ensaio, não houve controle de pH (Figura 5) e, no outro, o controle foi em pH 5 (Figura 6).

A análise da Figura 5 sugere que o processo de filtração não resultou variação na concentração de açúcares redutores (Figura 5 A), pH (Figura 5 B). Entretanto, o processo de filtração aparentemente não foi favorável para atividade de β -glicosidase (Figura 5 C), FPA (Figura 5 D) e endoglicanase (Figura 5 E).

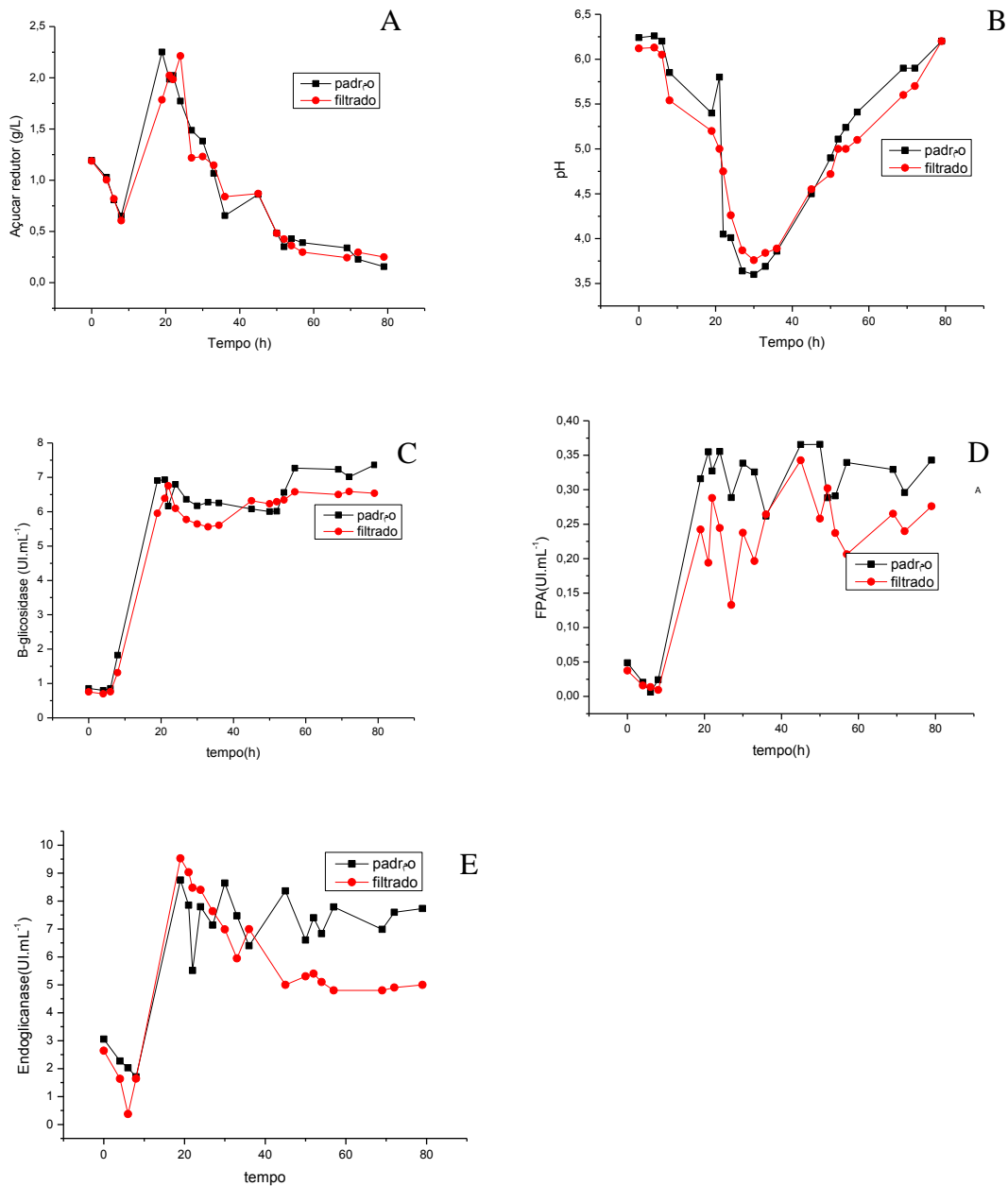


Figura 5. Atividade enzimática, pH e concentração de açúcares redutores em biorreator sem controle do pH com filtração de 10% do volume utilizando membranas de nanofiltração.

Quando o pH foi mantido em 5 (Figura 6), a atividade de endoglicanases (Figura 6A) e FPA (Figura 6B) foram superiores ao padrão. Uma possível explicação para o menor valor das atividades de endoglicanases e FPA quando o controle do pH em 5, é de que este pH, ao estar perto do ótimo para a atividade das enzimas, permitiria maior metabolismo em função da maior disponibilidade de açúcares, tal como observado anteriormente por Reis *et al.*, 2013. Porém, com o processo de filtração às 20 h, pode ter diminuído a concentração de glicose no meio e consequente redução da repressão catabólica, o que poderia explicar as maiores atividades de endoglicanases e FPA.

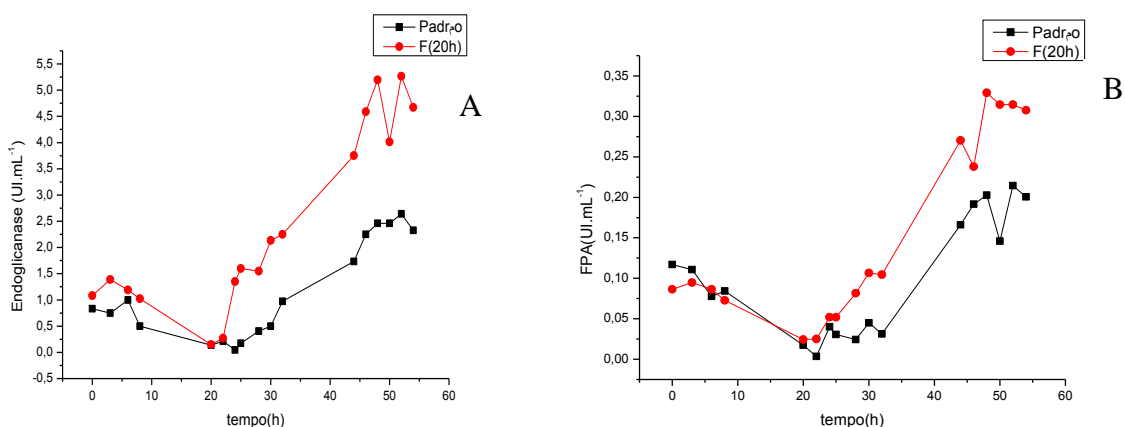


Figura 6. Atividade enzimática de endoglicanase (A) e FPA (B) em cultivo em biorreator com pH 5. Filtração após 24h de cultivo de 10% do volume utilizando membrana de nanofiltração.

4. CONCLUSÃO

A membrana N5 apresentou fluxo de permeado constante durante filtração e o processo de filtração não causou danos ao micélio de *T. reesei*, removendo açúcares redutores e retendo enzimas.

A filtração apresentou-se como estratégia positiva para a remoção de repressores no aumento da atividade enzimática em ensaios inoculados com esporos.

Em biorreator, o ensaio com pH controlado em 5, a filtração removeu metabólitos, o que aumentou a produtividade volumétrica de endoglicanase e FPA.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Nova de Lisboa (Portugal).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahamed, A.; Vermette, P. (2008) Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochem Eng J*40:399-407.
2. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
3. Chahal, D.S. (1985). Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. *Applied. Environ.Microbiol.* 49: 205-210.
4. Chauve, M. Mathis, H.; Huc, D.; Casanave, D.; Monot, F.; Ferreira, N.L. (2010). Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels* 2010, 3:3. doi:10.1186/1754-6834-3-3.
5. Geddes, C.C.; Nieves, I.U.; Ingram, L.O.(2011) Advances in ethanol production. *Curr Opin Biotechnol*22:312-319.
6. Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Applied Chem* 59:257-268.
7. Goyal A, Ghosh B, Eveleigh D (1991). Characterisation of fungal cellulases. *Biores. Technology* 36:37-50.
8. He, Y.; Bagley, D. M.; Leung, K. T.; Liss, S. N.; Liao, B. Q. (2012). Recent advances in membrane technologies is biorefining and bioenergy production. *Biotechnology Advances.* 30: 817-858.
9. Howard, R.L.; Abotsi, E.; Jansen van Rensburg, E.L.; Howard.S (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp. 602-619.
10. Ilmén, M.; Thrane, C.; Penttilä, M. (1996). The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full length and truncated mutant form *Mol Gen Genet*, 251:451-460.
11. Ivanova, C., Baath, J. A., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2013). Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PloS one*, 8(5), e62631.
12. Kim; D.W.; Jeong ;Y.K.; Jang, Y.H. (1994) Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. vol. 77, n° 4, pp. 363-369.

13. Mach, R.L. (1996). Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular microbiology*, 21(6), pp.1273–81.
14. Mandels, M.; Reese, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *J Bacteriol* **73**:269-278 (1957).
15. Mandels, M.; Weber, J. (1969) The production of cellulases. *Amer Chem Soc Adv Ser* 95:391-414.
16. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chemis***31**:426-428 (1959).
17. Nigam, P.S.; Singh, A. (2011). Production liquid biofuel from renewable resource. *Progress in Energy and Combustion Science* 37.
18. Qi,B.; Luo,J.; Chen,G.; Chen,X.; Wan,Y. (2012). Application of ultrafiltration and nanofiltration for recycling cellulase and concentrating glucose from enzymatic hydrolyzate of steam exploded wheat straw, *Bioresource Technology*, Volume 104, Pag. 466-472, ISSN 0960-8524, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.049>.
19. Rabinovich, M.L.; Melnik, M.S.; Bolobova, A.V. (2002a). Microbial cellulases: A review. *Applied. Biochem. Microbiol.* 38(4):305-321.
20. Rabinovich, M.L.; Melnik, M.S.; Bolobova, A.V. (2002b). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)* 67(8): 850-871.
21. Ries, L.; Belshaw, N.J.; Ilmén, M.; Penttilä, M.E.; Alapuranen, M.; Archer, B.D.(2014). The role of CRE1 in nucleosome positioning within the *cbh1* promoter and coding regions of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* Volume 98, Issue 2, pp 749-762.
22. Smith, B.T.; Knutsen, J.S.; Davis, R.H. (2010). Empirical Evaluation of Inhibitory Product, Substrate, and Enzyme Effects During the Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. *Applied Biochem Biotechnology* 161:468–482 DOI 10.1007/s12010-010-8931-2.
23. Teleman, A., Koivula, A., Reinikainen, T., Valkeajarvi, A., Teeri, T. T., Drakenberg, T., and Teleman, O. (1995) Progress-curve analysis shows that glucose inhibits the cellotriose hydrolysis catalysed by cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, 231:250.
24. Teugjas, H.; Väljamäe, P. (2013) Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels* **6**:104. doi:10.1186/1754-6834-6-104.

5 DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho, analisaram-se duas estratégias operacionais para a remoção de glicose e outros metabólitos solúveis, que podem agir como repressores catabólicos durante o cultivo submerso na produção de celulases e xilanases de uma linhagem de *Penicillium echinulatum*: filtração e adsorção.

Para a realização da filtração de metabólitos causadores de repressão catabólica, foram produzidas membranas a partir de suportes cerâmicos (alumina) e polimérico (polipropileno) pelo método de inversão de fases. Os suportes foram impregnados com soluções de PVDF (polifluoreto de vinilideno) a 10% e PA66 (poliamida) a 10% e 17%. Observou-se que as membranas de suportes poliméricos impregnadas com PA66 apresentaram maior fluxo em ensaios com água e com extrato enzimático, entretanto, apresentaram reduzida seletividade de proteínas totais.

Por meio do processo de adsorção, o uso de *pellets* produzidos pelo método de inversão de fases contendo quitina e quitosana adicionados em 36 h e 48 h triplicou a atividade de β -glicosidase em cultivo submerso. Entretanto, quando o uso de *pellets* foi substituído por discos poliméricos de PVDF contendo quitosana como adsorvente adicionado em 36 h de cultivo, a adsorção produziu aumento de 95% na atividade de FPA. *Pellets* de PVDF utilizados para adsorção de metabólitos em 48 h e cultivo aumentaram 95% a atividade de xilanases, possivelmente como consequência da adsorção preferencial dos açúcares causadores de repressão catabólica em detrimento das proteínas enzimáticas.

O uso do adsorvente carvão ativado em contato com o meio de cultivo mostrou-se como uma possível estratégia na remoção de metabólitos de repressão catabólica. O processo de concentração do meio realizado com volume do reator em 60% do volume de trabalho, posterior filtração e adsorção produziu efeito na atividade enzimática. Nessa situação, houve aumento de 50% na atividade de endoglicanase, 43% de CBH e 12% na atividade de xilanase.

A membrana C1 (suporte cerâmico impregnado com solução de PVDF a 10%) apresentou maior retenção de enzimas em comparação às membranas comerciais de nanofiltração (N5 e N10), sendo utilizadas em ensaios de filtração em frascos sob agitação e em biorreatores. Em sua morfologia, a membrana C1 apresentou uma espessa camada polimérica aderida à superfície e algumas irregularidades devidas, possivelmente, à velocidade de remoção do solvente e à entrada do não solvente da matriz polimérica.

Membranas planas preparadas pelo método de inversão de fases também foram utilizadas para a remoção de parte do permeado em cultivos submersos com *P. echinulatum*, iniciados em três meios diferentes: meio com indutor (celulose), meio com açúcares solúveis (glicose, sacarose, frutose, celobiose e lactose) e meio associando indutor e açúcares. As membranas de PVDF 10% permearam metabólitos causadores de repressão catabólica em meio contendo somente o indutor, triplicando a produção de enzimas celulolíticas. Os meios iniciados com açúcares e/ou associados ao indutor, posteriormente filtrados, e o micélio adicionado ao meio contendo celulose não apresentaram aumento na atividade enzimática. Os meios iniciados com celulose nos quais ocorreu filtração e, após, o micélio ressuspense em frascos com o indutor apresentou atividade de FPA 50% a 80% maior que a do padrão, quando a filtração ocorreu após 18 h de cultivo (5º dia) e aumento de 40% a 60% para xilanase (4º dia) para mesmo período de filtração.

Quando a filtração foi realizada em cultivo em pH 5 com o *Trichoderma reesei* Rut C30, que é parcialmente desreprimida a glicose, a filtração com a membrana N5 aumentou a atividade enzimática de endoglicanase e FPA, demonstrando que a remoção de metabólitos foi positiva em relação à produtividade enzimática. Em frascos sob agitação e em cultivo iniciado com esporos, a atividade da enzima endoglicanase, quando 10% do meio foram filtrados em 12 h e 20 h, após 60h de cultivo, apresentou aumento de 50% e 55%, respectivamente. Nesses ensaios, a retenção de enzimas FPA e endoglicanase foi total. Durante os ensaios com meios de 24 h e 48 h, o fluxo da membrana N5 mante-se constante.

Quando a filtração com a membrana N5 ocorreu em biorreator de agitação mecânica em meio com *P. echinulatum*, observou-se que o processo pode ser utilizado para aumento de atividade enzimática. A filtração de 20% do meio produziu aumento de 33% na atividade de xilanase (70 h) e, quando a filtração foi de 12% do meio, o aumento foi de 25% na atividade de CBH (120 h).

Assim, observou-se, de maneira geral, que a filtração de parte do meio de cultivo produz significativo aumento na atividade enzimática, principalmente para as enzimas endoglicanase, β -glicosidase e xilanasas.

6 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

6.1 Conclusões

As estratégias de remoção de substâncias que agem como repressores catabólicos durante a síntese de celulasas demonstraram-se promissoras. O uso de adsorventes e de pellets com adsorventes e a filtração com membranas de nanofiltração foram avaliados neste trabalho, que destaca como conclusão:

- suportes cerâmicos com filmes de PVDF (10%) retêm glicose, sendo possível sua aplicação na remoção de substâncias repressoras da produção de enzimas. A seletividade da membrana C1 é similar à membrana comercial N5. O aumento da concentração de PA66 reduziu significativamente o fluxo, mas não aumentou a seletividade da membrana. As membranas de suporte polimérico possuem alto fluxo, entretanto, baixa seletividade;

- a filtração com membranas de suporte cerâmico retém enzimas celulolíticas sem danos à morfologia do fungo;

- o processo de adsorção com filmes poliméricos e pellets contendo adsorventes permite a remoção de açúcares aumentando a produtividade enzimática. Quando pellets de PVDF contendo quitina e quitosana foram introduzidos em 36 h e 48 h de cultivo produziram efeito positivo na atividade de β -glicosidase, com aumento de até duas vezes na atividade. A adição de discos nas mesmas condições apresentaram resultados similares, demonstrando ser uma estratégia positiva para o aumento da produtividade enzimática. A adição em 48 h de pellets de PVDF sem adsorventes no cultivo aumentou a atividade de xilanase em duas vezes após 120 h de ensaio;

- em ensaios em biorreatores com adsorção externa, a atividade de endoglicanase, CBH e de xilanase apresentou um aumento de 50%, 43% e 12% respectivamente em meio iniciado com volume de 4,3 L, e utilizando carvão ativado como adsorvente quando comparado ao padrão. A atividade de xilanase máxima apresentou um adiantamento em 36 h de cultivo;

- o tempo de filtração do permeado dos meios de cultivo é um fator determinante, para a resposta de secreção enzimática. A filtração realizada em períodos de tempo menores que 8 h não apresentam efeito positivo para a atividade enzimática em cultivos de *P. echinulatum*;

- a produção de enzimas pelo fungo *Trichoderma reesei* Rut C 30, parcialmente desreprimido à glicose, é sensível a remoção de parte da fase líquida dos cultivos submersos. Após 60h de cultivo, a atividade de β - glicosidase do meio padrão foi de $1,97 \pm 0,13 \text{ UI.mL}^{-1}$, enquanto que os meios filtrados (10%) em 12 h (12/10) e 20 h (20/10) atingiram atividade enzimática de $2,44 \pm 0,197 \text{ UI.mL}^{-1}$ e $1,8 \pm 0,197 \text{ UI.mL}^{-1}$ respectivamente. Os ensaios com filtração de 10% do meio em 12 h e 20 h também apresentaram aumento de FPA em 60 h de 15% e 11%, respectivamente. Para a enzima endoglicanase, a atividade apresentou incremento de 40,7% e 52,2%, respectivamente, para os ensaios citados, demonstrando o fator positivo da remoção de 10% de permeado na produção enzimática.

6.2 Sugestões

A partir do exposto na tese, sugestões são consideradas:

- desenvolvimento de sistema de filtração interna no biorreator capaz de volumes de permeado superiores aos avaliados;
- desenvolvimento de dispositivo de adsorção acoplado ao biorreator;
- uso de adsorventes associados em série para remoção contínua de inibidores e repressores;
- ensaios em biorreator *airlift* de circulação externa com dispositivo de nanofiltração;
- ensaios de banho finito com diferentes concentrações de repressores e avaliação do efeito da agitação na adsorção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* Rut C-30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochemistry Engineering** 42: 41-46.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2010). Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemistry Engineering Journal**.15:125-133.
- Andrade, S.V.; Polizzelli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. (2004). Effect of carbon source on the biochemical properties of β -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1931-1938.
- Andreotti, R. F.; Andreotti, J.E.; Medeiros, C.; Roche, Mandels, M. (1981). Effects of strain and substrate on production of cellulases by *Trichoderma reesei* mutants. **Biochemistry Engineering Journal**, 12.
- Andrić, P.; Meyer, A.; Jensen, P.A.; Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. **Biotechnology Adv.** 28: 407–425.
- Andrić, P.; Meyer, A.; Jensen, P.A.; Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, 28: 308–324.
- Andrić, P.; Meyer, A.S.; Jensen, P.A.; Johansen, K.D. (2010). Effect and Modeling of Glucose Inhibition and In Situ Glucose Removal During Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw. **Applied Biochemistry Biotechnology** (2010) 160:280–297 DOI 10.1007/s12010-008-8512-9.
- Aro, N.; Saloheino, A.; Ilmén, M. Pentilla, M. (2001). ACEII, a novel transcription activator involved in regulation of cellulases and xylanases gene of *Trichoderma reesei*. **Journal Biology**, 271: 24309-24314.
- Badhan, A. K.; Chadha, B.S.; Kaur, J.; Saini, H.S.; Bhat, M.K. (2007). Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099, **Bioresource. Technology**: 98, Issue 3, 504-510, ISSN 0960-8524, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.009>.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal Biotechnology** 23, 257-270.

- Bansal, R.C.; Goyal, M. Activated carbon adsorption. Taylor and Francis Group. 2005.
- Bansod, S. M.; Dutta-Choudhary, M.; Srinivasan, M. C.; Rele M. V. (1993). Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species. **Biotechnology Letters**:15, Issue 9, pp. 965-970.
- Beguin P (1990). Molecular biology of cellulose degradation. Annu.. **Microbiology**,44:219-248.
- Bélafi-Bakó, K. (2006). Effect of operation conditions on the efficiency of membrane bioreactors. **Desalination** 200: 511–513.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Adv.** 18: 355-383.
- Bisaria, V.S. (1991). Bioprocessing of agro-residue to glucose and chemicals. A.M. Martin (Ed.), Bioconversion of waste materials to industrial products, **Elsevier**, London, pp. 210–213.
- Botella, C.; Diaz, A.; de Ory, I.; Webb, C.; Blandino, A. (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation, **Process Biochemistry**:42, Issue 1, 98-101, ISSN 1359-5113, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.025>.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochemistry** 72: 248-254.
- Brown, J.A., Falconer. D.J; Wood, I.M. (1987). Isolation and properties of mutants of the fungus *Penicillium pinophilum* with enhanced cellulase and β -glucosidase production. **Enzyme Microbiology Technology** 9:169-175.
- Buonomenna, M. G.; Lopez, L. C.; Favia, P.; D'Agostino, R.; Gordano, A.; Driolli, E. New PVDF membranes: The effect of plasma surface modification on retention in nanofiltration of aqueous solution containing organic compounds. **Water Research**. Vol 41, p. 4309-4316.
- Callow, N. V.; Ju, L. (2012) Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulose production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 311-317.
- Camassola, M.; Bittencourt, L. R.; Shenem, N.; Andreus, J.; Dillon, A.J.P. (2004). Characterization of the Cellulase Complex of *Penicillium Echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**. VOL. 22 (5/6). pp. 391_/396.

- Camassola, M.; Dillon, Aldo, J.P. (2010). Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1889-1900.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 1, p. 1-9.
- Camassola, M.; Dillon, A.J. P. (2012). Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 01, p. 1.
- Caramez, M. (1999). Produção de Endoxilanasas Termoestáveis por *Termomyces anuginosus* IOC-4145 em Meio Semi-Sólido. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- Castro, A.M.; Pereira Jr, N. (2010). Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos industriais. **Química Nova**, Vol. 33, No. 1, 181-188.
- Chahal, D.S. (1985), Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Applied Environ. Microbiology.**, 49 pp. 205–210.
- Cheryan, M. (1998). Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. **Technomic Publishing**. CO. Illinois.
- Chipeta, Z.A.; Preez, J.; Christopher, L. (2008). Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **Journal Ind. Microbiology and Biotechnology** 35: 587-594.
- Chisti, M.Y.; Moo-Young, M. (1987). Airlift reactors: Characteristics, Applications and design considerations. **Chemistry Engineering Commun.** 60: 195-242.
- Chisti, Y. (1989). Airlift bioreactors. London: Elsevier Science Publishers. 355p.
- Costa, A.C.M. (2009). Desenvolvimento de membranas de osmose inversa resistentes à deposição de matéria orgânica e bioincrustações. **Tese de Doutorado**, COPPE-UFRJ.
- Coulson, J.M.; Richardson, J.F.(2002). Particle Technology and Separation Processes. **Chemical Engineering**.
- Czjzkek, M.; David, A.B.; Bravman, T.; Shoham, G.; Henrissat, B.; Shoham, Y. (2005). Enzyme-substrate complex structures of a GH39 β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. **Journal Microbiology Biotechnology** v. 353, p. 838-846. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.09.003.

- Daroit, D.J.; Simonetti, A.; Hertz, P.F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **Journal Microbiology Biotechnology** 18: 933-941.
- Delabona, P. S.; Farinas, C. S.; Silva, M. R.; Azzoni, S. F.; Pradella, J. G. C.(2012). Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulose production. **Bioresource Technology**, v.107, p. 517-521.
- Deshpande, M.V.; Eriksson, K.E.; Pettersson, L.G. (1984). An assay for selectivedeterminantion of exo-1,4- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes.**Analytical Biochemistry**. v. 138, n. 2, p. 481-487.
- Dillon, A.J.P.; Pozza, F.; Andrighetti, T.; Bettio, M.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **Journal Applied Microbiology**.,v. 111(1), p. 48-53.
- Dolphen, R.; Thiravetyan, P. (2011). Adsorption of melanoidins by chitin nanofibers. **Chemical Engineering Journal**: 166, Issue 3, 1.Pages 890-895, ISSN 1385-8947, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.11.063>.
- Doppelbauer, R.; Esterbauer, H.; Steiner, W.; Lafferty, R.M.; Steinmüller, H. (1987). The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei* **Applied Microbiology and Biotechnology**: 26, Issue 5, pp 485-494.
- Du, F.; Wolger, E.; Wallace, L.; Liu A. (2010) Determination of Product Inhibition of CBH1, CBH2, and EG1 Using a Novel Cellulase Activity Assay. **Applied Biochem Biotechnology** 161:313–317.
- Durand, H.; Calnet, H.; Tiraly, G. (1988). Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale celulases production. **Enzyme. Microbio. Technology** 10:341-346.
- El-NaaS, M. H., AL-Zuhair, S., Alhaija, A. M. A., “Reduction of COD in refinery wastewater through adsorption on date-pit activated carbon”, **Journal of Hazardous Materials**, v. 173, n. 1-3, pp. 750-757, 2010.
- Empresa de Pesquisa Energética (EPE). *Balanço Energético Nacional 2007 (BEN 2007)*, Ministério das Minas e Energia; www.mme.gov.br, acessada em Janeiro 2009.
- Foo, K., Hamees, B., “Insights into the modeling of adsorption isotherm systems”, **Chem. Engineering Journal**, v. 156, n. 1, pp. 2-10, 2010.

- Fritscher, C. Messner, R. Kubicek, C.P Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. **Experimental Mycology**: 14, Issue 4, December 1990, Pages 405-415, ISSN 0147-5975, [http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975\(90\)90063-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975(90)90063-Y).
- Gamerith,G.; Groicher, R.; Zeilinger,S.; Herzog, P.; Kubicek, C. (1992) Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on hemicellulose substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**: 38, Issue 3, pp 315-322.
- Ganesh, K.; Joshi, J.B.; Sawant, S.B. (2000). Cellulases desactivation in stirred reactor. **Biochem. Eng. J.** 4: 137-141.
- Ghose TK. (1987). Measurement of cellulase activities. Pure Applied Chem 59: 257-268. coding genes for *Aspergillus niger* require D- xylose. **Applied Environ. Microbiology** 65,4340-4345.
- Giles, C. H.; Macewan, T. H.; Nakhwa, S. N.; Smith, D.(1960). Studies in Adsorption. Part XI.* A System of Classification of Solution Adsorption Isotherms, and its Use in Diagnosis of Adsorption Mechanisms and in Measurement of Specific Surface Areas of Solids. **Journal Dyers Colourists**.
- Gluzcs, P.; Michalski, H. (1994). Cultivation of *Aspergillus niger* in a pilot plant external-loop air-lift bioreactor. **FEMS Microbiol. Rev.** 14: 83-88.
- Goldemberg, J. (2009) Biomassa e energia. **Química. Nova**, Vol. 32, No. 3, 582-587, 2009.
- Gomes, J.; Gomes, I.; Steiner, W.; Esterbauer, H. (1992), Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 36, 701-707.
- Gomez, J.M.; Romero, M.D., Fernandez, T.M., Diez, E. (2012) Immobilization of b-glucosidase in fixed bed reactor and evaluation of the enzymatic activity. **Bioprocess Biosyst Engineering**, 35:1399–1405 DOI 10.1007/s00449-012-0728-y.
- Gregg, S.J.; Sing, K.S.W. (1982). Adsorption, surface area, and porosity. 2nd ed., London New York : Academic Press, 1982. ISBN:0123009561 9780123009562.
- Grogan DW. (1991). Evidence that beta-Galactosidase of *Sulfolobus solfataricus* Is Only One. **Enzyme Microbiol Technology**, 38 (2006), pp. 381–390.
- Guibal, E. (2004). Interactions of metals ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, p. 43-74.

- Guerasimov, Y. A., Dreving, V. Eriomin, E., Kiseliyov, A., Lebedev, V., Panchenkov, G., Shliguin, A. (1977) Curso de Química Física. 2ª Edição, Moscou: Editorial Mir, V. 1, Capítulo XVI, pág. 441-466.
- Habert, A.C.; Borges, C.P.; Nobrega, R. (2006). Processos de separação por membranas. Escola Piloto em Engenharia Química –COPPE/UFRJ. E-papers Serviços Editoriais.
- Han, W., He, M. (2010). The Application of exogenous cellulase to improve soil. Acceleration of straws decomposition **Bioresource Technology** 101: 3724-3731.
- Hanif, A.; Yasmeen, A.; Rajoka, M.I. (2004). Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**:94, Issue 3, Pages 311-319, ISSN 0960-8524.
- He, Y.; Bagley, D.M.; Leung, K.T.; Liss, S.N.; Liao, B.Q. (2012). Recent advances in membrane technologies for biorefining and bioenergy production. **Biotechnology Advance v. 30**, p. 817–858.
- Hegazi, H.A. (2013). Removal of heavy metals from wastewater using agricultural and industrial wastes as adsorbents, **HBRC Journal**, Volume 9, Issue 3, 276-282, ISSN 1687-4048, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hbrcj.2013.08.004>.
- Hendy, N.A.; Wilke, C.R.; Blanch, H.W. (1984). Enhanced cellulase production in fed batch culture of *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microbiology Technology** 6: 73-77.
- Hrmová M, Biely P, Vrsanská M (1986). Specificity of cellulase and xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. **Arch Microbiology** 144: 307-311.
- Ho, W.S.W.; Sirkar, K.K. (1992). **Membrane Handbook**. Kluwer Academic Publishers.
- Ilmén, M., C. Thrane, and M. Penttilä. (1996). The glucose repressor gene of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. **Mol. Genetic** 251:451-460.
- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. and Olsson, L. (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme Microbial Technology** 32: 851-861.
- Juang, R.; Wu, F.; Tseng, G, R. (2001) Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Bioresource Technology**: 80, p. 187-193.
- Juhász, T.; Szengyel, Z.; Reczey, K.; Silka-Aho, M.; Viikari, L. (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525.

- Kalogeris, E.; Christakoulos, P.; Macris, B.J. (1998). Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*. Characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, vol 60, n° 3, pp. 155-163.
- Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Katapodis, P.; Alexiou, A.; Vlachou, S.; Kekos, D.; Macris, B.J. (2003). 'Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes' **Process Biochemistry**: 38, no. 7, pp. 1099-1104.
- Katapodis, P.; Christakopoulou, V.; Kekos, D.; Christakopoulos, P. (2007). Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology, **Biochemical Engineering Journal**, Volume 35, Issue 2, 136-141, ISSN 1369-703X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2007.01.007>.
- Klepacova, K.; Mravec, D.; Hajekova, E.; Bajus, M. (2003). Etherification of glycerol for diesel fuels. **Pet. Coal**. 45: 54-57
- Kim, T.U.; Gu, B.G.; Jeong, J.Y.; Byum, S.M. and Shin, Y.C. (1995) Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline μ -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 61, no. 8, p. 3105-3112.
- Klasson, K.T.; Uchimiya, M.; Lima, I.; Boihem Jr, L. (2011). Feasibility of removing furfurals from sugar solutions using activated biochars made from agricultural residues **BioResources**, 2011.
- Knetsen, J.S.; Davis, R.H. (2004). Cellulase Retention and Sugar Removal by Membrane Ultrafiltration During Lignocellulosic Biomass Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Vol. 113–116.
- Kumar, K. V.; Ramamurthi, V.; Sivanesan, S. (2006). Short communication: Biosorption of malachite green, a cationic dye onto *Pithophora sp.*, a fresh water algae. **Dyes and Pigments**, 69, 102-107.
- Kurasawa, T.; Kamagata, Y.; Yachi, M Suto, M.; Sasaki, M.; Takao, S. (1991). Cellulase induction by cellobiose-octaacetate in *Penicillium purpurogenum*, **Journal of Fermentation and Bioengineering**:72, Issue 3, Pages 217-220, ISSN 0922-338X, [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90221-2](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(91)90221-2).
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

- Latifian M, Hamidi-Esfahani Z, Barzegar M Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology** 2007 Dec; 98(18):3634-7. Epub 2007 Jan 4.
- Lee, P.C.; Lee, W.; Chang, H.N, (1998). Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succinici* producing succinic acid. **Process Biochemistry** v. 35, p. 49-55.
- Lemos, J.L.S. (2001). Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.
- Lenartovicz, V.; Souza, C.G.M.; Moreira, F.G.; Peralta, R.M. (2003) Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry** v. 38, p. 1775-1780.
- Lima, A.J.B.; Cardoso, M.G.; Guimarães, L.G.; Lima, J.M. (2009). Efeito de Substâncias empregadas para remoção de cobre sobre o teor de compostos secundários da cachaça. *Química Nova*, Vol. 32, No. 4, 845-848.
- Lin, J.Q.; Lee, S.M.; Koo, Y.M. (2000). Modeling of typical microbial cell growth in batch culture. **Biotechnology Bioprocess Eng.** 5: 382-385
- Lipnizki, F. (2010). Membrane process opportunities and challenges in the bioethanol industry. **Desalination** 250, 1067–1069
- Liu, J.; Lu, J.; Cui,Z. (2010). Enzymatic hydrolysis of cellulose in a membrane bioreactor: assessment of operating conditions. **Bioprocess Biosystem. Eng** DOI 10.1007/s00449-010-0501-z.
- Liu, Z., Hou,L.; Li,Y.; Wang, J. Hong Wang, Wu Du, Wenfang Wang, Yizhuo Qin, Zhaoping Liu, (2010) Complement activation associated with polysorbate., **International Immunopharmacology**, Volume 15, Issue 1. 144-149.
- Lynd, L. R.; van Zyl, W.H.; McBride, J.E.; Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Curr Opin Biotechnology**, 16, pp. 577–583.
- Man, H.U. (2012) Adsorptive Capacity of Pb^{2+} by Modified Chitosan. **Journal of Anhui Agricultural Sciences** 7: 134.
- Mandels, M., Reese, E.T., 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **Journal Bacteriology** 73, 269-278.

- Mandels, M.; Weber, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v.95, p.391-414, 1969.
- Mansfield, S.D.; Mooney, C.; Saddler J.N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, 15: 804-816.
- Manttari, M.; Viikko, K.; Nystrom, M. (2006). Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry **Journal of Membrane Science** 272 (2006) 152–160.
- Margolles-Chark,M.; Ilmen, M., Pentilla, M. (1997). Expression patterns of 10 hemicellulases genes from *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Journal of Biotechnology** 57:167-179.
- Matsuo, M.; Endou, A.; Okada A, T.; Yamaoka, Y. (1998) Purification and characterization of β -xylosidase from *Thermoascus* sp.J. **Fermentation. Bioengineering.**, v. 86, n° 4, p. 403-405.
- Mello-de-Souza, T. M.; Silva-Pereira, I.; Fonseca,I.; Poças-fonseca, M. J. (2011). Carbon source and pH – Dependent transcriptional regulation of cellulose genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, 19-26.
- Milagres, A.M.F.; Santos, E.; Piovan,T.; Roberto, I.C.(2004). Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor, **Process Biochemistry**:39, Issue 11, 30, 1387-1391, ISSN 1359-5113, [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00272-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00272-3).
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Mir, V.G.; Heinämäki, J.; Antikainen, O.; Revoredo, O.B.; Colarte, A.I.; Nieto, O.M.; Yliruusi, J. (2008). Direct compression properties of chitin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Volume 69, Issue 3, 964-968.
- Miroshnichenko, ML, Kublanov IV, Kostrikina NA, Tourova TP, Kolganova TV, BirkelandNK, Bonch-Osmolovskaya EA (2008). *Caldicellulosiruptor kronotskyensis* sp. nov.and *Caldicellulosiruptor hydrothermalis* sp.: two extremely thermophilic, cellulolytic,anaerobic bacteria from Kamchatka thermal springs. **Industrial Crops and Products**; 58(Pt 6):1492-6.
- Mores, W.D.; Knutsen, J.S.; Davis R.H. (2001).Cellulase Recovery via Membrane Filtration. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Vol. 91–93.

- Mulder, M. (1987) **Basic principles of Membrane Technology**. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Mulder, M. (2003). Basic principles of membrane technology. The Netherlands, 2° edição. 564p.
- Nogawa, M.; Goto, M.; Okada, H.; Morikawa, Y. (2004). L-sorbose induce cellulose gene transcription the cellulolytic fung *Trichoderma reesei*. **Curr. Genet.** 38:329-334.
- Pardo, A.G. (1996). Effect of Surfactants on Cellulase Production by *Nectria catalinensis*. **Curr Microbiol.**; 33(4):275-8.
- Poletto, P.; Duarte, J.; Thurmer, M.B.; Zeni, M. (2010). Estudo de membranas de poliamidas preparadas pelo método de inversão de fases a partir do sistema ternário água/ácido clorídrico/poliamida 66. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, 11(7), 550-557.
- Polizzelli, M.L.; Rizzatti, A.C.; Monti, R.; Terenzi, H.; Jorge, J. Amrim, D. (2005) Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** (Mini-Review), v. 67, n.5, p. 577-591. DOI: 10.1007/s00253-005-1904-7.
- Prasad, S.; Singh, A.; Joshi, H.C. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resour Conserv Recycling**, 50, pp. 1–39.
- Química verde no Brasil: 2010-2030 - Brasília, DF: **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, 2008.
- Reis, L., Fontana, R.C., Delabona, P.S., Lima, D.J.S., Camassola, M., Pradella, J.G.C., Dillon, A.J.P. (2013) Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology** 146, 597-603.
- Ritter, C.E.T.; Fontana, R.C.; Camassola, M.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2013a) The influence of sorbitol on the production of cellulases and xylanases in an airlift bioreactor. **Bioresource Technology** 148, 86–90.
- Ritter, C.E.T.; Camassola, M. Zampieri, D.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.D. (2013). Cellulase and Xylanase Production by *Penicillium echinulatum* in Submerged Media Containing Cellulose Amended with Sorbitol. **Enzyme Research**. Volume 2013, Article ID 240219.
- Rizzatti, A.C.S.; Freitas, F.Z.; Bertolini, M.C.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Polizeli, M.L.T.M. (2008) Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 237-244. DOI:10.1007/s10295-0070290-9.

- Rodrigues, C.; Cavaco Morao, A. I.; Pinho, M.N.; Geraldés, V. (2010). On the prediction of permeate flux for nanofiltration of concentrated aqueous solutions with thin-film composite polyamide membranes. **Journal of Membrane Science** 346: 1–7.
- Ruthven, D. M. (1984). Principles of adsorption and adsorption process. New York: John Wiley & Sons. Canadá.
- Salim, V.M.M., Borges, C.P.; Alves, T.L.M. Fenômenos Interfaciais, Escola Piloto - Programa de Engenharia Química – COPPE/UFRJ, 2005.
- Santos, C.P.F.; Melo, D.M.A.; Melo, M.A.F.; Sobrinho, E.V. (2002) Characterization and uses of bentonite and vermiculite clays for adsorption of copper (II) in solution. **Cerâmica** 48 (308).
- Santos, D.; Camelo, D.S.; Rodrigues, D.P.; Pereira Jr, N. (2009). Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by *Zymomonas mobilis* Using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 121, n. 1-8, p. 93-105.
- Sarı, A.; Tüzen, M. (2013). Adsorption of silver from aqueous solution onto raw vermiculite and manganese oxide-modified vermiculite, **Microporous and Mesoporous Materials**: 170, Pages 155-163, ISSN 1387-1811, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.12.004>.
- Sawai, H.; Mimitsuka, T.; Minegishi, S.; Henmi, M.; Katsushige Yamada, K.; Shimizu, S.; Yonehara, T. (2010). A novel membrane-integrated fermentation reactor system: Application to pyruvic acid production in continuous culture by *Torulopsis glabrata*. **Bioprocess Biosyst Eng**. DOI 10.1007/s00449-011-0521-3.
- Schmidell, W.; Facciotti, M.C.R. (2001). **Biorreatores e processos fermentativos**. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher. pp. 179-192.
- Schneider, R.P.; Tsutiya, M.T. (2001). Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. São Paulo.
- Sehnm, N.T.; de Bittencourt L.R.; Camassola M.; Dillon A.J.P. (2006) Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbiology Biotechnology** Aug;72(1):163-7. Epub.

- Seyis, I.; Aksoz, N. (2005) Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.55, p. 115-119.
- Silva, L.A.D. (2008). Produção e caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS. Porto Alegre.
- Silva, M.K. (2009) Biorreatores com membrana: uma alternativa para tratamento de efluentes. **Tese**. Universidade do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Singh, A.; Kumar, P.K.R.; Schugerl, K (1992). Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi. **Advance Biochemistry Bioengineering Biotechnology** 45, pp. 29–55.
- Sjoman, E.; Manttari, M.; Nyström, M.; Koivikko, H.; Heikkila, H. (2007). Separation of xylose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions. **Journal of Membrane Science** 292: 106–115.
- Smith, D.C.; Wood, T.M (1991). Xylanase production by *Aspergillus awamori*. Development of a medium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracellular xylanase and xylosidase while maintaining low protease production. **Biotechnology Bioengineering**, 38: 880- 890.
- Smith, B.T.; Knutsen, J.S.; Davis, R.H. Empirical Evaluation of Inhibitory Product, Substrate, and Enzyme Effects During the Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology** (2010) 161:468–482 DOI 10.1007/s12010-010-8931-2.
- Sohail, M.; Siddiqi, R.; Ahamd. A.; Khan, S. A.(2009) Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, v. 25, p. 437- 441.
- Souza, J.F.; Ferrarini, E.; Riveiros, R.; Zeni, M. (2008) Preparação e caracterização de membranas enantioseletivas de polissulfonas com lípase imobilizada. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. Volumen 9(1), 54-61.
- Souza, M.C.; Roberto, I.C.; Milagres, A.M.F. (1999). Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology, **Applied Microbiology and Biotechnology**. Volume 52, Issue 6, pp 768-772.
- Stephenson, T.; Judd, S.; Jefferson, B.; Brindle, K. (2000). Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment. **IWA Publishing Alliance House**. London.

- Sternberg, D.; Dorval, S. (1976). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Journal Biotechnology and Bioengineering**. v21. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.2602102> 10.1002/bit.260210205.
- Sternberg, D.; Mandels, G. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **Journal Bacteriology** 139: 761-769.
- Suto, M.; Tomita, F. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulose in fungi. **Journal of Biocience and Bioengineering**. Vol 92, n° 4, 305-311.
- Takao, S.; Kamagata, Y.; Sasaki, H. (1985). *Cellulase production by Penicillium purpurogenum*. Journal of fermentation technology, - ci.nii.ac.jp.
- Techapun, C.; Poosaran, N.; Watanabe, M.; Sasaki, K. (2003). Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulose-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. **J. Bioscience Bioengineering**. 95: 298-301.
- Todero Ritter, C. E.; Bonatto, J.; Zortea, R.; Duarte, J.; Zeni, M.; Dillon, A.J.P.(2015) Retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares impregnadas com solução de PVDF e PA. **Revista Iberoamericana de Polímeros Volume:16(2)**.
- Vaheri, M.P.; Caheri, M.E.O.; Kaappinen, V.S. (1975). Formation and release of cellulolytic enzymes during growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glicerol. **Jornal Applied Microbiology**. 8: 73-80.
- Valencia, E. Y.; Chambergo, F. S. (2013) Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9-18.
- Wang, M.; Li, Z.; Fang, X.; Wang, L.; Qu, Y. (2012). **Advances Biochemistry Engineering Biotechnology** 128: 1-24.
- Wase, D.A.J., McManamey, W.J. Raymahasay, S.; Vaid, A.K.L. (1985). Comparison between cellulase productions by *Aspergillus fumigatus* in rotated vessel in air-lift fermentation. **Biotechnology Bioengineering**, 271: 166-172.
- Xiong, H.; Weymarn, N.; Turunen, O.; Leisola, M.; Pastinem, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresour. Technology** 96: 753-759.
- Zambare, V.P.; Bhalla, A.; Muthukumarappan, K.; Sani, R.K.; Christopher, L.P. (2011).
- Zhang, Y.; Li, H.; Xiao, F.; Chen, H.; Jianming, L.X.D. (2011). Effect of Modified Vermiculite on Mercury Ion Adsorption [J]. **Journal of Shihezi University (Natural Science)**, 5, 019.

- Zampieri, D.; Guerra, L.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2013). Secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. **Ind. Crop. Prod.** 50: 882-886.
- Zhang, M.; Su, R.; Li, Q.; Qi, W.; He, Z.(2010). Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. **Bioenergy Res.** DOI 10.1007/s12155-010-9107-1.
- Zhang, Z., Donaldson, A.A.; Ma, X. (2012). Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**, 30, 913-919.
- Zheng,P.; Wang, J.; Lu, C.; Xu, Y.; Sun, Z. (2013). Immobilized β -glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose, **Process Biochemistry**: 48, Issue 4, 683-687, ISSN 1359-5113, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.027>.