



MAYRA ALEJANDRA MARIÑO BOHÓRQUEZ

**AVALIAÇÃO DO ETANOL COMO AGENTE PRECIPITANTE DE
GLICOSIL HIDROLASES PRODUZIDAS POR *Trichoderma*
harzianum P49P11**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

MAYRA ALEJANDRA MARIÑO BOHÓRQUEZ

**AVALIAÇÃO DO ETANOL COMO AGENTE PRECIPITANTE DE
GLICOSIL HIDROLASES PRODUZIDAS POR *Trichoderma harzianum*
P49P11**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestra em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. EVERSON ALVES MIRANDA

Co-orientadora: Dra. SINDÉLIA FREITAS AZZONI, CTBE, CNPEM

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MAYRA
ALEJANDRA MARIÑO BOHÓRQUEZ, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. EVERSON ALVES MIRANDA.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Everson", is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

CAMPINAS

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M339a Mariño Bohórquez, Mayra Alejandra, 1985-
Avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* P49P11 / Mayra Alejandra Mariño Bohórquez. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Everson Alves Miranda.
Coorientador: Sindélia Freitas Azzoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Glicosil hidrolases. 2. *Trichoderma harzianum*. 3. Precipitação (Química). 4. Proteínas - Agregação. 5. Hidrólise enzimática. I. Miranda, Alves Everson, 1959-. II. Azzoni, Sindélia Freitas. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *Trichoderma harzianum* P49P11

Palavras-chave em inglês:

Glycosyl hydrolases

Trichoderma harzianum

Precipitation (Chemical)

Proteins - Aggregation

Enzymatic hydrolysis

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Everson Alves Miranda [Orientador]

José Geraldo da Cruz Pradella

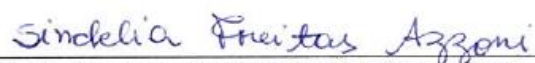
Georgia de Oliveira Figueiredo Barros

Data de defesa: 17-02-2014

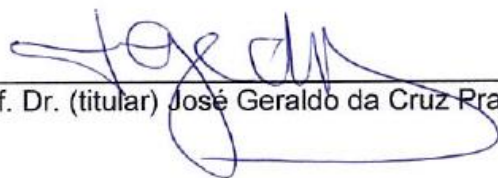
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

}

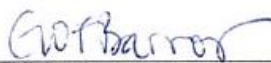
Dissertação de Mestrado defendida por Mayra Alejandra Mariño Bohórquez e aprovada em 17 de fevereiro de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. co-orientadora Sindélia Azzoni



Prof. Dr. (titular) José Geraldo da Cruz Pradella



Dra. (titular) Georgia de Oliveira Figueiredo Barros

RESUMO

O crescente interesse pelo aproveitamento da matéria-prima renovável vem demandando novas tecnologias eficientes na produção de etanol de segunda geração a fim de reduzir os altos custos associados com as enzimas envolvidas na sacarificação. Este estudo teve como objetivo principal concentrar, através de precipitação com etanol, glicosil hidrolases responsáveis pelas atividades de endoglucanase, β -glicosidase, FPase e xilanase produzidas por *Trichoderma harzianum* P49P11. As variáveis de precipitação testadas foram temperatura, concentração de etanol e pH do fermentado. O etanol demonstrou potencial para recuperar ao redor de 98% da atividade de xilanase correspondente a 17,6 U/mL através de precipitações com 90% de etanol (v/v) em todas as temperaturas testadas (5,0, 15 e 25°C) e pH 5,0. Sob estas mesmas condições de precipitação, 90% de etanol (v/v) e pH 5,0, porém a 5°C, foi obtida a máxima recuperação da atividade de celulase (FPase) sendo 77% correspondente a 0,08 U/mg. Esta última formulação causou precipitação instantânea. Desta forma, a precipitação com etanol pode ser considerada uma técnica eficiente para concentrar xilanase e, em certa medida, para o complexo de celulase.

Palavras-chaves: glicosil hidrolases, *Trichoderma harzianum*, precipitação de proteínas por etanol

ABSTRACT

Growing interest in the use of renewable raw materials for the production of second generation ethanol has led to the need of new efficient technologies to reduce the high costs associated with saccharification enzymes. This study aimed to concentrate by ethanol precipitation glycosil hydrolases responsible for FPase, β -glucosidase, endoglucanase and xylanase activities produced by *Trichoderma harzianum* P49P11. The precipitation variables tested were temperature, ethanol concentration and pH of the fermentation broth. The results showed that the precipitation by ethanol recovered more than 98% of the total xylanase activity using ethanol at concentration of 90% (v/v) at all temperatures tested (5.0, 15 e 25°C) and pH 5.0. The maximum recovery of cellulose activity as FPase was 77% by precipitation carried out at this same ethanol concentration and pH (90% v/v and pH 5.0) but at 5.0°C. This last set of conditions caused almost instantaneous precipitation. Therefore, ethanol precipitation can be considered an efficient technique for xylanase concentration and, to a certain extent, for the cellulase complex.

Keywords: glycosil hydrolases, *Trichoderma harzianum*, protein precipitation by ethanol

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Colocação do problema.....	2
1.2 Objetivo.....	4
1.3 Etapas executadas.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Enzimas envolvidas na despolimerização de material lignocelulósico.....	6
2.1.1 Características estruturais das glicosil hidrolases.....	11
2.2 Recuperação de proteínas por precipitação (ou “salting out”).....	13
2.2.1 Precipitação por salificação.....	15
2.2.2 Precipitação por solventes orgânicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Materiais.....	22
3.1.1 Produção do fermentado de <i>Trichoderma harzianum</i> P49P11.....	22
3.1.2 Reagentes químicos diversos.....	23
3.1.3 Equipamentos.....	24
3.2 Métodos analíticos.....	24
3.2.1 Determinação da concentração de proteína.....	24
3.2.2 Ensaio de atividade de β -glicosidase.....	25
3.2.3 Ensaio de atividade de endoglucanase e xilanase.....	25
3.2.4 Ensaio de atividade de celulase.....	26
3.2.5 Análise de proteína por eletroforese SDS-PAGE.....	27
3.3 Métodos experimentais.....	28
3.3.1 Ensaio cinéticos para determinar o tempo de equilíbrio da precipitação com etanol.....	28
3.3.2 Determinação da janela de precipitação de proteínas por adição de etanol.....	28
3.3.3 Efeito do etanol nos ensaios enzimáticos.....	29

3.3.4	Precipitação das enzimas de interesse em função da temperatura, do pH do fermentado e da concentração de etanol.....	29
3.3.5	Cinéticas de precipitação a 5°C em função da concentração de etanol.....	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
4.1	Estudo cinético da precipitação proteica por adição de etanol.....	31
4.2	Determinação da faixa de concentração de etanol efetiva para precipitar as proteínas.....	32
4.3	Efeito de etanol nos ensaios enzimáticos.....	33
4.3.1	Efeito da presença de etanol na atividade de β -glicosidase.....	33
4.3.2	Efeito da presença de etanol na atividade de endoglucanase.....	34
4.3.3	Efeito da presença de etanol na atividade de xilanase.....	34
4.3.4	Efeito da presença de etanol na atividade FPAse.....	34
4.4.	Estudo de precipitação de proteínas e da partição das atividades enzimáticas do fermentado de <i>Trichoderma harzianum</i> P49P11 por adição de etanol.....	36
4.4.1.	Estudo de precipitação de proteína.....	36
4.4.2.	Estudo de precipitação de xilanase.....	37
4.4.3.	Estudo de precipitação de endoglucanase.....	41
4.4.4.	Estudo de precipitação de β -glicosidase.....	43
4.4.5.	Estudo de precipitação de FPAse.....	45
4.5.	Estudo cinético da precipitação proteica do fermentado de <i>T. harzianum</i> a 5°C em função da concentração de etanol.....	46
4.6.	Análise de proteína por eletroforese SDS-PAGE.....	50
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
	APÊNDICE A.....	64
A.1.	Cinética de precipitação do fermentado de <i>T. harzianum</i> P49P11 a 5 °C para 60% v/v de etanol.....	64
A.2.	Quantificação da proteína total obtida após precipitações do fermentado de <i>T. harzianum</i> P49P11 com diferentes concentrações de etanol a 5°C durante 6 h.....	64

APÊNDICE B.....	65
B.1. Balanços de massa proteica após precipitação com etanol a 5°C em função do pH do fermentado e a concentração de etanol.....	65
B.2. Balanços de massa proteica após precipitação com etanol a 15°C em função do pH do fermentado e a concentração de etanol.....	65
B.3. Balanços de massa proteica após precipitação com etanol a 25°C em função do pH do fermentado e a concentração de etanol.....	66
B.4. Recuperação da atividade de xilanase por precipitação com etanol a 5°C.....	66
B.5. Recuperação da atividade de xilanase após precipitação com etanol a 15°C.....	67
B.6. Recuperação da atividade de xilanase após precipitação com etanol a 25°C.....	67
B.7. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 5°C em pH do fermentado igual a 5,0.....	68
B.8. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 5°C em pH do fermentado igual a 6,5.....	68
B.9. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 5°C em pH do fermentado igual a 8,0.....	69
B.10. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 15°C em pH do fermentado igual a 5,0.....	69
B.11. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 15°C em pH do fermentado igual a 6,5.....	70
B.12. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 15°C em pH do fermentado igual 8,0.....	70
B.13. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 25°C em pH do fermentado igual a 5,0.....	71
B.14. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 25°C em pH do fermentado igual a 6,5.....	71
B.15. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 25°C em pH do fermentado igual a 8,0.....	72

A meu filho Juan Diego, a meus pais e a Deus

*Whatever course you decide upon,
there is always someone to tell you that you are wrong.
There are always difficulties arising which tempt you
to believe that your critics are right.
To map out a course of action and*

follow it to an end requires courage.

*To be yourself in a world that is
constantly trying to make you something else
is the greatest accomplishment.*

Ralph Waldo Emerson

Agradecimentos

Inicialmente gostaria agradecer ao prof. Everson Miranda e à Dra. Sindélia Freitas Azzoni pela ajuda científica constante na conclusão desta dissertação.

Gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico por fornecer os recursos econômicos desta pesquisa. Além disso, gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Campinas e ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol pelo uso de seus recursos e empréstimo de suas instalações.

Meus agradecimentos também se estendem a meus pais, a Yesid e a Juan, o apoio mais importante que recebi nesta investigação científica. Sem eles nada disto tivesse sido possível. A meus colegas de laboratório por ter me acolhido e acompanhado na vida acadêmica. Ao governo brasileiro pela valiosa oportunidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma das etapas experimentais deste estudo.....	6
Figura 2.1.	Esquema do modo de ação das enzimas celulolíticas.....	8
Figura 2.2.	Componentes estruturais básicos das hemiceluloses e os locais de ataque das hemicelulases responsáveis de sua despolimerização.....	9
Figura 4.1.	Cinética de precipitação do fermentado de <i>T. harzianum</i> P49P11 a 5 °C com 60% de etanol.....	31
Figura 4.2.	Precipitação de proteínas do fermentado de <i>T. harzianum</i> P49P11 com etanol a 5°C e tempo de envelhecimento de 6 h.....	32
Figura 4.4.1.	Perfil de precipitação com etanol das proteínas do fermentado em função da concentração de etanol, o pH do fermentado e a temperaturas das precipitações.....	37
Figura 4.4.2.	Perfil de recuperação da atividade de xilanase por precipitação com etanol.....	39
Figura 4.4.3.	Perfil de recuperação da atividade de endoglucanase por precipitação com etanol.....	41
Figura 4.4.4.	Perfil de recuperação da atividade de β -glicosidase por precipitação com etanol.....	43
Figura 4.4.5.	Perfil de recuperação da atividade FPAse por precipitação com etanol.....	45
Figura 4.5.1.	Cinética de precipitação proteica a 5°C e pH 5,0 do fermentado em função da concentração de etanol.....	47

Figura 4.5.2.	Cinética de precipitação de xilanase a 5°C e pH 5,0 do fermentado em função da concentração de etanol.....	48
Figura 4.5.3.	Cinética de precipitação de FPase a 5°C e pH 5,0 do fermentado em função da concentração de etanol.....	49
Figura 4.5.4.	Efeito da concentração de etanol nas recuperações de proteína, atividade de xilanase e atividade FPase nas precipitações a 5°C e pH 5,0 com separação da fase precipitado imediatamente após adição de etanol.....	50
Figura 4.6.	Elektroforese SDS-PAGE do fermentado de <i>T. harzianum</i> P49P11 e precipitado formado a 5°C, pH 5,0 e 90% (v/v) de etanol.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades de glicosil hidrolases de <i>T. reesei</i>	12
Tabela 2.1.	Resumo de estudos realizados sobre precipitação de glicosil hidrolases por salificação.....	16
Tabela 2.2.	Resumo de estudos realizados sobre precipitação de glicosil hidrolases por adição de etanol.....	21
Tabela 4.3.1.	Efeito do etanol na atividade de β -glicosidase sobre p-NPG.....	33
Tabela 4.3.2.	Efeito do etanol na atividade de endoglucanase sobre CMC.....	34
Tabela 4.3.3.	Efeito do etanol na atividade de xilanase sobre xilana de bétula.....	34
Tabela 4.3.4.	Efeito do etanol na atividade de celulase sobre papel de filtro.....	35
Tabela 4.4.1.	Balanços de massa proteica das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante as 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol.....	38
Tabela 4.4.2.	Balanços de atividade de xilanase das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante as 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol.....	40
Tabela 4.4.3.	Balanços de atividade de endoglucanase das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol.....	42

Tabela 4.4.4. Balanços de atividade de β -glicosidase das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante as 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol.....	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BGL	β -Glicosidase
BSA	Albumina de soro bovino
C[açúcar]	Concentração de açúcar
CBH	Celobiohidrolase
CBM	Domínio de ligação a celulose
CCD	Domínio catalítico
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DSP	Downstream processing
EG	Endoglucanase
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FD	Fator de diluição
FP	Fator de purificação
ρ -NP	ρ -Nitrofenol
ρ -NPG	ρ -4-Nitrofenil- β -D-glicopiranoside

PCR	Polymerase chain reaction
pI	Ponto isoelétrico
rpm	Rotações por minuto
SDS–PAGE	Sodium dodecyl sulphate - Polyacrylamide gel eletrophoresis of proteins
T[reação]:	Tempo de reação
Temed	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TRIS	Tris(hidroxi)metilaminometano
UF	Ultrafiltração
UA	Unidades de atividade enzimática
UI	Unidade Internacional
V[enzima]:	Volume total da enzima
V[reação]:	Volume total da reação
XYN	β -1,4-Endoxilanase

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima renovável com grande potencial como fonte de energia limpa. A fim de competir com fontes de energia fósseis é desejável uma adequada utilização deste tipo de recursos. No entanto, um desafio chave nesta otimização é o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes de conversão dos componentes desta biomassa em diferentes tipos de combustíveis (PTASINSKI *et al.*, 2007).

A biomassa lignocelulósica, principal componente estrutural das plantas e a maior fonte de matéria-prima renovável, consiste principalmente em uma rede robusta de microfibrilas entrecruzadas de três tipos diferentes de biopolímeros: celulose (35-50%), hemicelulose (25-30%) e lignina (25-30%), variando esta proporção entre diferentes espécies (RAGAISKAS *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos da biomassa lignocelulósica podem ser hidrolisados mediante tratamento químico, utilizando-se ácido diluído ou concentrado, ou mediante tratamento enzimático, utilizando-se celulasas (gerando principalmente glicose) e hemicelulasas (gerando principalmente xilose). A rota enzimática ocorre sob condições brandas que permitem maior controle da reação e consequente minimização da degradação dos biopolímeros, uma vez que não se solubiliza a lignina e conserva-se a estrutura original dos carboidratos, em contraste com a rota química que leva à produção de substâncias tóxicas como o furfural e o hidroximetilfurfural (BADGER, 2002).

A hidrólise enzimática de material lignocelulósico é o resultado de uma ação cooperativa de diversas glicosil hidrolases. Destacam-se as endo- β -1,4-glucanases (EG, E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolases ou exoglucanases (CBH, E.C. 3.2.1.91) e β -glicosidases (BGL, E.C.3.2.1.21) que atuam sobre a fração celulósica e um conjunto de hemicelulasas, tais como xilanases, β -xilosidases, glucuronidases, acetilesterases, galactomananases e glicomananases, que atuam sobre a fração hemicelulósica (CANILHA *et al.*, 2012). Muitos

esforços no sentido de se aumentar a eficiência da hidrólise enzimática têm sido voltados para a obtenção de preparados enzimáticos de proporções adequadas das diferentes enzimas envolvidas e de alta concentração para que se tenha, assim, um efeito sinérgico máximo do complexo enzimático, além de mínima diluição da mistura de hidrólise e facilidade no armazenamento e transporte destes biocatalizadores (QUEIROZ et al., 2007).

Os fungos filamentosos são os organismos mais eficientes para a produção de celulasas extracelulares, sendo que alguns foram extensivamente estudados e utilizados para aplicações industriais, como na indústria de alimentos, processamento do café e secagem de grãos (Kasai et al, 2006), agroindústria, ração animal, produção de papel, indústria têxtil, tratamento de dejetos, detergentes e indústrias químicas (WONGANU et al, 2008). Dessa forma o estudo das diversas celulasas não se restringe ao atual e crescente mercado dos biocombustíveis, sendo também enzimas atrativas a outros setores industriais.

No tocante à produção de etanol de segunda geração (etanol 2G), estudos na literatura têm antecipado que a produção do coquetel enzimático *on-site*, ou seja, em uma planta anexa a planta de etanol 2G, pode ser a melhor opção para a viabilização desta tecnologia, uma vez que a biomassa lignocelulósica pode ser usada como principal fonte de carbono (BARTA et al., 2010; PIOVESAN et al., 2013). Consequentemente, a recuperação primária visando concentrar o coquetel enzimático, torna-se uma etapa necessária para a obtenção de um coquetel com concentração protéica aceitável para a aplicação na reação de hidrólise, principalmente considerando os esforços no desenvolvimento de reações com alta carga de sólidos com vistas a tornar o reator de hidrólise mais produtivo.

1.1. Colocação do problema

Embora o uso de material lignocelulósico na produção de bioetanol ofereça várias vantagens como fonte de energia limpa e matéria-prima renovável, sua viabilização ainda exige a aplicação de tecnologias para reduzir os altos custos dos coquetéis enzimáticos. Em termos de disponibilidade no Brasil, uma nova linhagem do fungo *Trichoderma harzianum*, isolada da Amazônia, apresentou potencial similar ao fungo *Trichoderma reesei* para hidrolisar fitobiomassa (DELABONA et al., 2012). O fungo *T. reesei* tem sido um dos fungos mais estudados e empregados para hidrolisar biomassa, enquanto o *T. harzianum* foi inicialmente considerado apenas para o biocontrole de fitopatógenos e só há alguns anos

tem sido estudado como agente de hidrólise para produção de etanol 2G (THRANE et al, 1997).

Estudos demonstram que linhagens do fungo *T. harzianum* apresentam, quando crescidas em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono, atividades enzimáticas que hidrolisam diferentes tipos de carboidratos (MEDEIROS et al, 2002; SILVEIRA et al, 1997; RUEGGER et al, 2004). Este fungo, assim como o bem estudado *T. reesei*, expressa uma diversidade de celulasas e têm demonstrado a grande eficiência na desconstrução e conversão de materiais lignocelulósicos (LIBERATO et al., 2012; MAEDA et al., 2011; COLUSSI 2011; CASTRO et al., 2010).

Em outros estudos foi demonstrado que elevadas proporções das atividades de β -glicosidase e xilanase de *T. harzianum* IOC 3844 evitaram o acúmulo de inibidores melhorando os rendimentos da hidrólise enzimática, já que o aumento do grau de sinergismo depende principalmente das concentrações enzimáticas (NOBUYUKI et al., 2011).

Considerando o conteúdo brasileiro, as pesquisas com o fungo *T. harzianum* P49P11 são importantes na indústria de etanol-2G não só pela acessibilidade e produtividade enzimática, mas também por ser um fungo selvagem isolado no Brasil, o que facilitaria o uso e produção do coquetel enzimático na biorrefinaria e possibilitaria a execução de modificações genéticas para o melhoramento da produção de hidrolases. O *T. reesei*, principal linhagem em uso na produção industrial de celulasas atualmente, já foi extensivamente otimizado, contudo seus processos de produção e melhoramento genético encontram-se protegidos através de patentes.

Não obstante as enzimas sejam catalisadores altamente específicos, ainda são necessários processos de recuperação eficientes que as concentrem a fim de facilitar a estocagem, além de favorecer a aplicação de etapas posteriores do desenvolvimento e otimização da produção de bioetanol. Os coquetéis enzimáticos concentrados favorecem, portanto as etapas posteriores dos bioprocessos tanto para aplicações em reação com alta carga de sólidos como para continuação dos tratamentos de purificação.

Dentro deste contexto, a precipitação de proteínas apresenta-se como uma técnica simples de recuperação de enzimas, podendo ser assim reduzidos significativamente os

custos da produção enzimática industrial sem afetar negativamente a função catalítica das enzimas.

Sabe-se que as moléculas de proteína em um estado precipitado exibem alta estabilidade por causa da restrição de sua mobilidade, sendo o estado ideal para estocagem e transporte (SCHMID, 2011). A precipitação é considerada uma operação unitária simples largamente utilizada para concentrar biomoléculas em soluções aquosas, principalmente proteína, e através da recuperação do precipitado permite o armazenamento e transporte de proteínas de modo compacto, estruturalmente estável e pronto para a aplicação a que se destina (QUEIROZ et al., 2001). Especificamente, a precipitação com etanol oferece a vantagem de ser de baixos custos de capital e operacional. Ela apresenta a possibilidade de se poder reciclar este agente precipitante por destilação simples após a separação da fase líquida da fase precipitado, reduzindo, assim, o impacto ambiental dos afluentes. Além disto, considerando o cenário de produção de celulasas *on-site*, a recuperação primária utilizando etanol como agente de precipitação apresenta-se como uma técnica fortemente recomendável por ser o etanol um produto na biorrefinaria de cana de açúcar.

1.2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros de precipitação para se obter concentrados enzimáticos com alta atividade xilanásica e celulásica através de precipitação com etanol a partir do fermentado de *Trichoderma harzianum* P49P11.

1.3. Etapas executadas

O presente estudo constou das seguintes etapas (Figura 1):

1. Implementação da metodologia analítica dividida em:

1a. Determinação do desvio padrão dos métodos analíticos utilizados para quantificar as atividades enzimáticas.

1b. Avaliação da magnitude da interferência do etanol nos ensaios de medida de atividades enzimáticas.

2. Produção do fermentado com atividade celulásica e xilanásica a partir da fermentação submersa de *T. harzianum* P49P11 com bagaço de cana pré-tratado sob alta pressão e deslignificado como substrato e remoção das células por centrifugação.

3. Estudos preliminares:

3a. Estudo preliminar do tempo adequado de incubação após adição de etanol em precipitações realizadas com 60% de etanol a 5°C.

3b. Determinação da janela de precipitação para os estudos seguintes, através de quantificação da proteína precipitada, para a concentração de etanol entre 60% e 80% (v/v) a 5°C. Entenda-se janela de precipitação como a faixa de concentração de etanol que leva a uma maior quantidade de proteína a precipitar.

4. A partir dos resultados obtidos nas etapas anteriores foi realizado um estudo detalhado de precipitação com etanol das enzimas celulasas e xilanasas produzidas por *T. harzianum* durante a hidrólise enzimática, o qual dividiu-se em:

4a. Avaliação dos principais parâmetros que influenciam a precipitação de proteínas: concentração de etanol entre 60% e 90% (v/v), valores de pH do fermentado 5,0, 6,5 e 8,0 e temperatura a 5°C, 15°C e 25°C. Estes experimentos foram avaliados por medidas de concentração proteica e atividades enzimáticas de xilanase, β -glicosidase, endoglucanase e FPase dos produtos obtidos após separação (precipitado e sobrenadante).

4b. Estudo cinético final para diferentes concentrações de etanol. Neste estudo foram determinadas as atividades de xilanase e FPase da fase precipitado para diferentes tempos de precipitação usando como solução de alimentação o fermentado com pH 5,0 a 5°C.

4c. Separação e comparação das proteínas do fermentado com as proteínas que foram precipitadas e as proteínas que permaneceram na fase sobrenadante através de eletroforese SDS-PAGE. As condições de precipitação utilizadas nesta etapa foram aquelas que permitiram uma maior recuperação de atividade de xilanase e de celulase (90% de etanol (v/v), 5°C e pH 5,0 do fermentado).

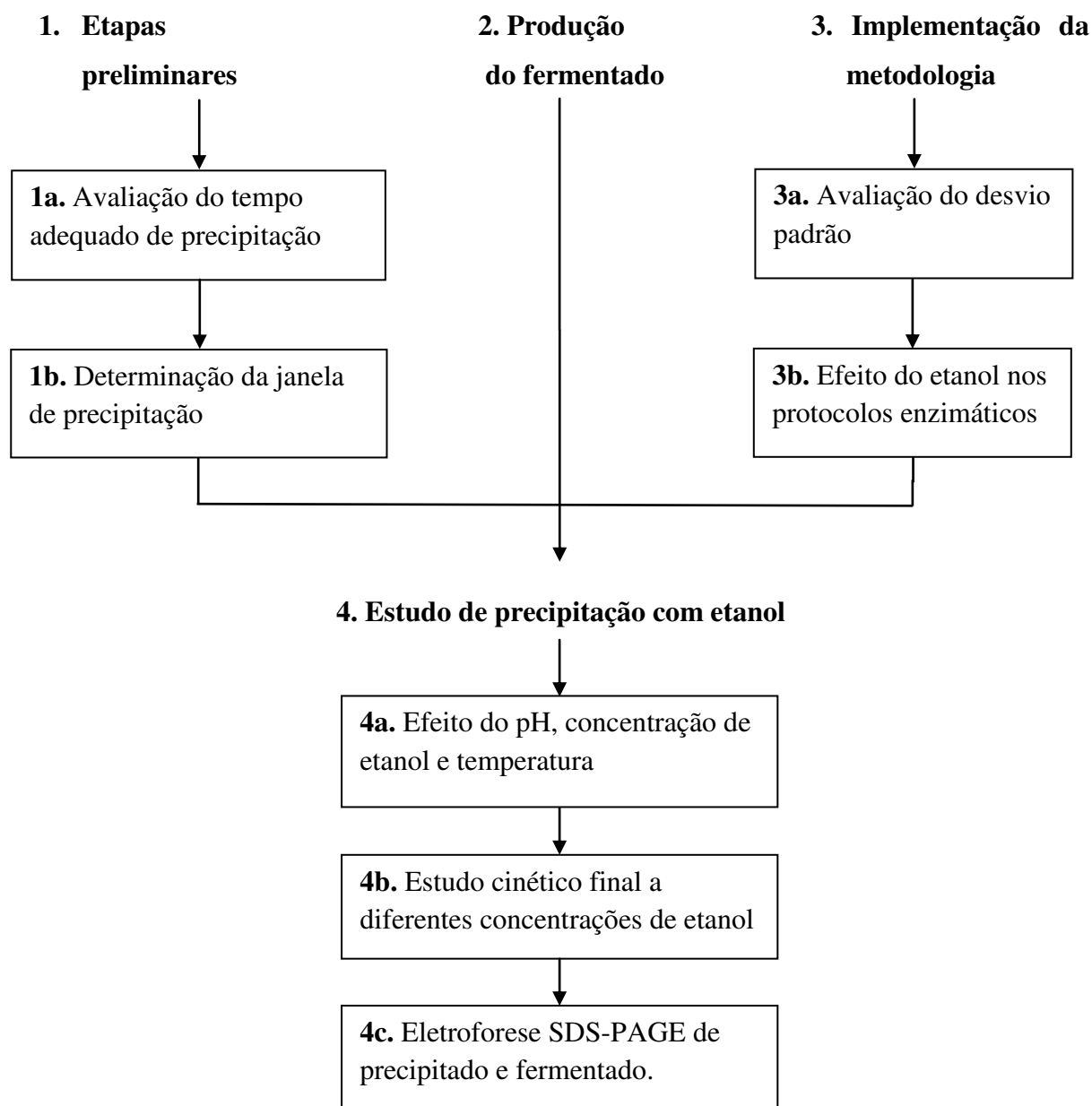


Figura 1. Fluxograma das etapas experimentais deste estudo.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre as características estruturais e funcionais das enzimas glicosil hidrolases, dando ênfase para as celulasas e as xilanases. Posteriormente, são apresentados os fundamentos teóricos sobre os fenômenos envolvidos na precipitação de proteínas. Paralelamente, é apresentada uma revisão dos trabalhos publicados que tratam de precipitação de enzimas hidrolases, assim como os fatores que afetaram a eficiência do aproveitamento de enzimas através do uso de precipitação por sais e precipitação por solventes.

2.1. Enzimas envolvidas na despolimerização de material lignocelulósico

As enzimas que catalisam a fragmentação de compostos através de reação com moléculas de água são chamadas hidrolíticas ou hidrolases. Essas enzimas são produzidas por uma grande diversidade de espécies, tanto em meio líquido como em meio sólido, e atuam sobre diferentes substratos. Muitos microorganismos capazes de biossintetizar enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas são conhecidos, mas apenas alguns deles possuem uso na produção em larga escala. Isto é devido ao fato que para hidrolisar celulose e hemicelulose é necessária a síntese de um complexo de enzimas que atuam sinergicamente e de preferência sejam secretadas a fim de facilitar o processo de separação dessas enzimas do meio celular (SUKUMARAM et al., 2005).

Os fungos filamentosos sintetizam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e, portanto, várias espécies fúngicas são atualmente utilizadas para a produção de enzimas industrialmente importantes, tais como proteases, celulasas, amilases, lipases, entre outras.

Sabe-se que o complexo de celulasas secretado por fungos filamentosos está formado por três componentes majoritários cujas ações são cooperativas (Figura 2.1), (BHAT e BHAT, 1997; SHEWALE, 1982; WOODWARD e WISEMAN, 1983):

- a) Endoglucanase (EG, β -1,4-D-glucano glicanohidrolase ou EC 3.2.1.4): realiza a hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas intramoleculares liberando celo-oligossacarídeos e gerando um decréscimo significativo do grau de polimerização;
- b) Exoglucanase (CBH, β -1,4-D-glicano celobiohidrolase ou EC 3.2.1.91): hidrolisa as ligações β -1,4-glicosídicas terminais liberando celo-oligossacarídeos pequenos como os dissacarídeos (celobioses) e monômeros de glicose solúveis;
- c) β -Glicosidase (BGL, β -D-glicohidrolase ou celobiase ou EC 3.2.1.21): hidrolisa a celobiose liberando os monossacarídeos (D-glicoses) e controlando a inibição por celobiose das endoglucanases e das exoglucanases.

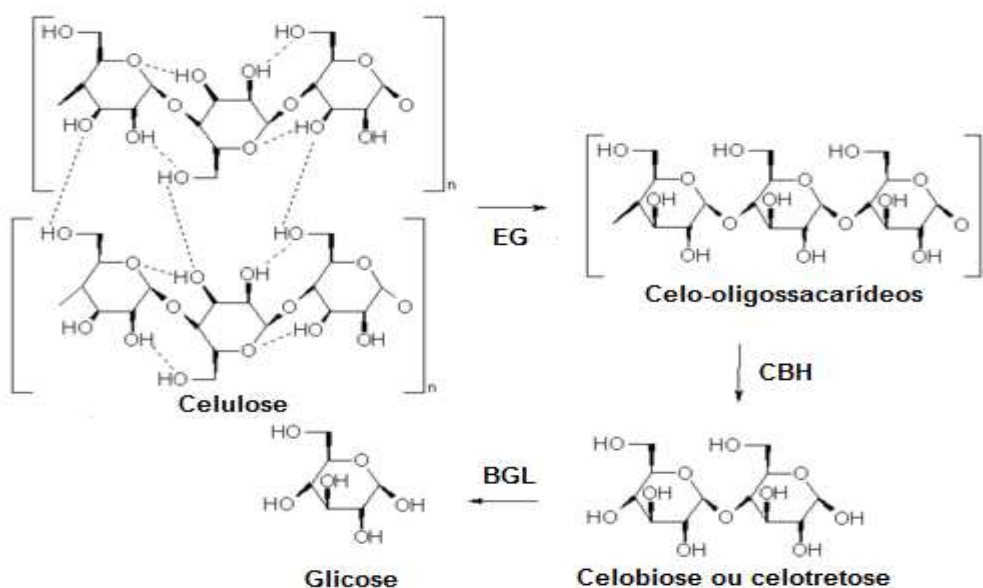


Figura 2.1. Esquema do modo de ação das enzimas celulolíticas (KARMAKAR e RAY, 2011).

O complexo de hemicelulases varia segundo os polímeros heterogêneos presentes na biomassa utilizada e envolve principalmente as seguintes enzimas (Figura 2.2) (GÍRIO et al., 2010; SHALLOM e SHOHAM, 2003; SUBRAMANIYAN e PREMA, 2002):

a) Xilanases: devido a sua heterogeneidade e complexidade, a hidrólise completa de xilana requer uma grande variedade de enzimas atuando cooperativamente. As endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) hidrolisam a ligação glicosídica da cadeia principal dos polissacarídeos de β -D-xilose, liberando xilopiranosil-oligômeros e as 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37) hidrolisam a ligação glicosídica de xilo-oligômeros com terminais não redutores liberando resíduos de β -D-xilopiranosil. Seu principal substrato é o dissacarídeo xilobiose. A remoção dos grupos secundários presentes no xilano é catalisada por α -L-arabinofuranosidases, α -D-glucuronidases, α -galactosidases, acetilxilano esterases, ácido ferúlico esterases e ácido *p*-coumárico esterases. Verificou-se que o sistema xilanolítico é bastante difundido entre os fungos, actinomicetos e bactérias, entre eles os *Aspergilo*, *Trichoderma* e *Clostridia*;

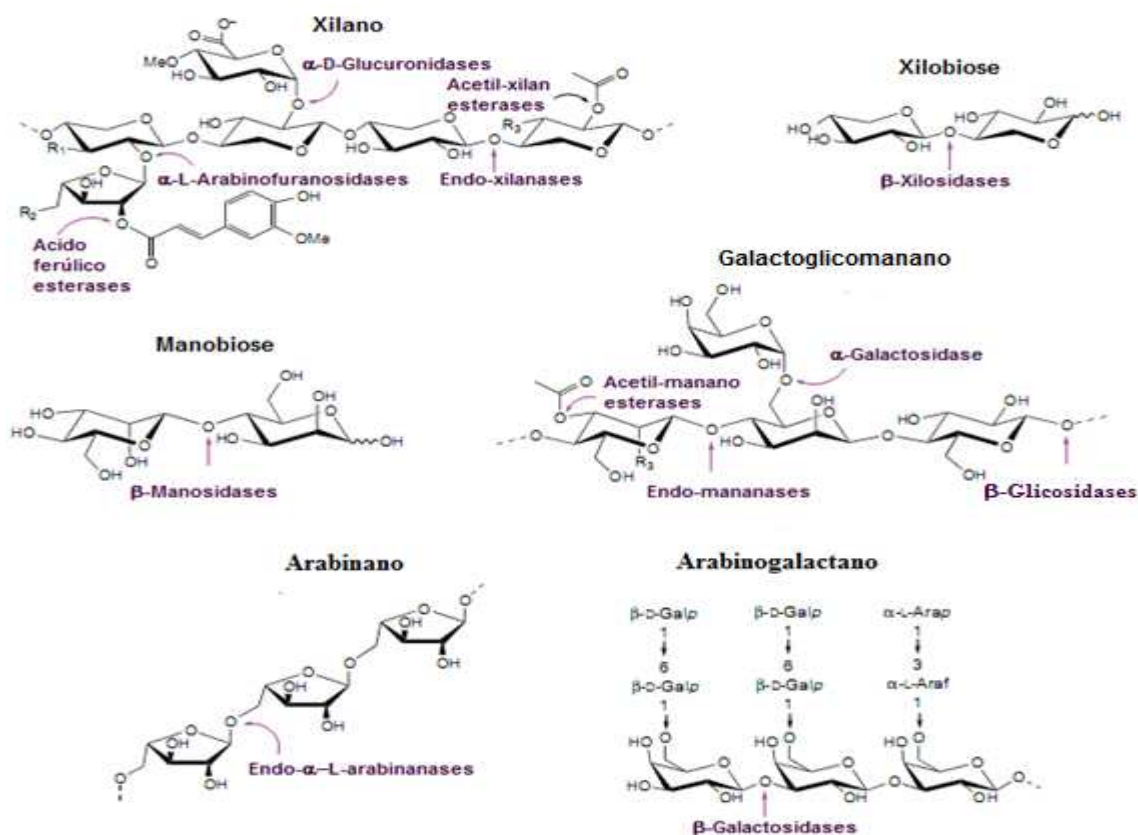


Figura 2.2. Componentes estruturais básicos das hemiceluloses e os locais de ataque das hemicelulases responsáveis pela sua despolimerização (SHALLOM e SHOHAM, 2003).

- b) Mananases: estas são enzimas que hidrolisam a ligação β -1,4 da cadeia principal dos polissacarídeos de β -D-manose (mananos). As principais enzimas são a endo- β -mananase (EC 3.2.1.78) que hidrolisa a ligação glicosídica das cadeias intramoleculares liberando β -1,4-D-mano-oligômeros e a exo- β -manosidase (EC 3.2.1.25) que hidrolisa a ligação glicosídica de pequenos mano-oligômeros com terminais não redutores liberando resíduos de β -D-manopiranoose. Enzimas adicionais como a β -glicosidases (EC 3.2.1.21) e α -galactosidases (EC 3.2.1.22) são requeridas para remover açúcares das cadeias ramificadas que constituem os galactoglicomananos e os arabinogalactanos;
- c) α -L-Arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55): cataizam a hidrólise das ligações α -2, 3 e 5 de α -L-arabinofuranosil terminal não redutor como substituinte simples de arabinoxilanos ou como substituinte dobre de xilana nas posições 2 e 3 de arabinanos e arabinogalactanos. Estas enzimas de ampla especificidade de substrato atuam tanto em monômeros como em oligômeros e polímeros;
- d) α -D-Glucuronidasas (EC 3.2.1.139): são as enzimas que hidrolisam as ligações α -1,2 entre os resíduos do ácido 4-O-metil-D-glucurônico e as unidades de β -D-xilopiranosil existentes nos glucuroxilanos;
- e) Esterases hemicelulolíticas: tratam-se de um complexo de enzimas que hidrolisam a ligação éster das hemiceluloses, o qual contém a acetilxilano esterase (EC 3.1.1.72), que remove o grupo acetil nas posições 2 e/ou 3 nos resíduos β -D-xilopiranosil de acetilxilanas e as esterases do ácido felúrico e do ácido p-coumárico, que hidrolisam a ligação éster presente nas xilanas liberando os respectivos ácidos fenólicos que substituem as unidades de arabinofuranosides. A clivagem dos grupos acetilo, feruloil e p-coumaroil da xilana contribuem para a remoção de lignina por clivagem das ligações éster entre lignina e hemicelulose.

2.1.1. Características estruturais das glicosil hidrolases

Um dos micro-organismos capazes de hidrolisar fitobiomassa mais estudados e caracterizados é o gênero *Trichoderma* spp. (*T. viride*, *T. reesei* e *T. harzianum*), isto devido à sua alta produtividade para digerir celulose cristalina (ZHOU et al., 2008). A espécie mais popularmente conhecida é *T. reesei*, a qual está entre os produtores mais estudados em detalhe e amplamente empregado na produção comercial de hemicelulases e celulases. Produtos comerciais de vários isolados de *T. reesei* estão disponíveis há muito tempo destinados a aplicações na indústria alimentícia, na indústria cervejeira, no processamento de vegetais e frutas, além de serem numerosamente avaliadas e aplicadas na produção de bioetanol. Na indústria, os isolados de *T. harzianum* e *T. reesei* têm sido destaques nas formulações de hidrolases devido às quantidades elevadas de enzimas secretadas, de até 100 g por litro (VIKSO-NIELSEN, 2008).

Uma característica do sistema de celulases é a sua heterogeneidade, já que os microorganismos produzem geralmente várias enzimas em cada uma das subclasses ou isoformas (Tabela 1). O fungo *T. reesei* produz pelo menos duas celobiohidrolases (CBHI e CBH II) e cinco endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV e EGV), as quais juntas podem fazer parte até de 90% do coquetel enzimático. Já as sete β -glicosidases secretadas por este fungo, geralmente apresentam menos do 1% (HERPÖE, et al., 2008; LYND et al., 2002).

Além disto, a grande variedade de endoglucanases e celobiohidrolases estão compostas por dois domínios catalíticos: o grande domínio do núcleo catalítico e o pequeno módulo de ligação a celulose, CCD e CBM, respectivamente, por suas siglas em inglês. Os mecanismos de reconhecimento, ligação, deslocamento e inserção final no sítio ativo do CCD ainda não estão bem esclarecidos, mas sabe-se que o CBM desempenha um papel importante na indução da biocatálise através da afinidade pelo substrato. Porém, existem algumas poucas exceções de celulases que hidrolisam a celulose sem CBM. Entre elas estão a endoglucanase 3 ou Cel12A de *T. reesei* (TrEG3) e *T. harzianum* (ThEG3) caracterizadas por adsorção fraca na superfície do substrato, no entanto, com destacada atividade hidrolítica nas regiões amorfas da celulose ou de oligossacarídeos solúveis, o qual levou a suspeitas sobre a presença de um módulo de ligação a substratos deste tipo (PRATES, et al., 2013).

Tabela 1. Propriedades de glicosil hidrolases de *T. reesei* (Vinzant et al., 2001).

Enzimas de <i>T. reesei</i>	Massa molecular (kDa)	Número de amino-ácidos	pI calculado (experimental)
EG I	48,209	459	5,50 (4,7)
EG II	44,228	418	5,60 (5,5)
EG III	23,481	218	6,20 (7,4)
EG IV	35,512	344	5,50
EG V	24,412	242	5,10
CBH I	54,075	513	5,60
CBH II	49,655	471	5,90
XYN I	24,583	229	5,60
XYN II	24,173	222	9,10
BGLI	78,436	744	6,50

A hidrólise de celulose apresenta um alto grau de sinergismo, no qual a ação de uma mistura de duas ou mais celulasas individuais é maior do que a soma das ações de cada uma das enzimas. Parece provável que o sinergismo ocorre apenas quando duas celulasas atuam em diferentes regiões das microfibrilas de celulose e que progressivamente cada enzima cria novos locais de ataque para outras enzimas presentes na mistura (HENRISSAT et al., 1985).

As celulasas fúngicas apresentam dois tipos de sinergismo. O chamado endo-exo sinergismo é geralmente um mecanismo sequencial de ação enzimática no qual as endoglucanases iniciam a hidrólise nas extremidades das cadeias amorfas da celulose fornecendo uma nova cadeia susceptível à ação das exo-glucanases e libertando celobiose como produto principal (WOOD e MCCRAE, 1979; HENRISSAT et al., 1985).

Adicionalmente o exo-exo sinergismo é raramente encontrado entre duas endoglucanases diferentes, mas é nitidamente observado entre celobiohidrolases determinadas. Este é um processo complexo que ainda não está completamente compreendido (ROUVINEN et al., 1990)

2.2. Recuperação de proteínas por precipitação

A formação de uma fase sólida de proteína é uma etapa comum no início das etapas de recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) ou downstream processing (DSP) a fim de reduzir o volume inicial facilitando assim as etapas posteriores. Geralmente não é possível conseguir alta purificação através da precipitação visto que a proteína alvo precipita junto

com outras proteínas, mas esta operação é considerada um importante passo no fracionamento e purificação primária de proteínas (PESSÔA et al., 2011).

A precipitação é conhecida por ser o método mais tradicional para concentrar proteínas de meios aquosos, principalmente por ser uma técnica que requer equipamentos simples, além de ser de escalonamento e baixo consumo de energia (PESSÔA e KILIKIAN, 2005). O propósito principal da precipitação de uma proteína é concentrar a biomolécula. Devido à grande quantidade de material de partida requerido para a produção de uma quantidade de proteína de interesse, é adequado diminuir o volume no qual a proteína está dissolvida. As proteínas frequentemente são mais estáveis como precipitados e deste modo a concentração de proteínas oferece também vantagens para armazenar e reduzir o tamanho dos equipamentos durante a sequencia de passos do fracionamento proteico (SCOPES, 2004).

A solubilidade de uma determinada proteína depende da composição do solvente, do pH, da temperatura e a força iônica. Consequentemente, a manipulação destes parâmetros proporciona uma forma de concentração de proteínas por precipitação ou inclusive para purificação de proteínas por precipitação fracionada (CUTLER, 2004).

A desnaturação ocorre geralmente por exposição ao calor, a valores de pH extremos ou a solventes orgânicos. Se a proteína de interesse pode ser precipitada quantitativamente sem desnaturação, e em seguida pode ser redissolvida em outro pH e está ainda em estado nativo, tem-se então um bom meio de recuperação. No entanto, o ajuste de pH pode induzir a precipitação isoeletrica da proteína, isto acontece quando a carga líquida da proteína é igual a zero (pI), já que as proteínas do mesmo pI se associam e precipitam sem necessariamente serem desnaturadas. (SCOPES, 2004).

Todos os métodos de precipitação, com exceção dos que dependem de interação iônica, são mais eficazes no ponto isoeletrico da proteína. Aproximadamente 80% das proteínas são carregadas negativamente a um pH neutro e, geralmente têm valores de pI entre 4 e 6; os outros 20% têm valores de pI básicos e, deste modo, a carga líquida da proteína é positiva a pH neutro e não são susceptíveis de ser precipitadas no seu ponto isoeletrico devido a mudanças conformacionais a valores altos de pH (SCOPES, 2004). Os valores de pI para as celulas de *Trichoderma reesei* estão entre 5,1 e 9,0 (VINZANT et al., 2001).

A operação unitária usada para recuperar os precipitados de proteína formados por precipitação é geralmente a filtração ou a centrifugação, e a separação dos traços finais do

agente precipitante é feita geralmente por diálise ou diafiltração se a precipitação for por salificação (MORAES et al., 2008). Nos casos mais promissores de precipitação por adição de solventes orgânicos ou por sais voláteis, é possível reciclar o agente precipitante por destilação simples ou por elevação da temperatura, respectivamente, reduzindo assim os impactos ambientais através da redução de efluentes (WATANABE et al., 2006).

Existem muitos métodos de recuperação de proteínas, sendo mais destacada a precipitação de proteínas por adição de sais e por adição de solventes orgânicos em virtude de seu custo efetivo.

2.2.1. Precipitação por salificação (ou “salting-out”)

A adição de altas concentrações de sal a uma solução proteica geralmente causa precipitação. Isto acontece por deslocamento das moléculas de água das porções hidrofóbicas na superfície das proteínas pelos íons do sal (solvatação). Deste modo, a solubilidade da proteína gradativamente se reduz à medida que suas porções hidrofóbicas interagem facilmente entre si e formam agregados entre diferentes moléculas proteicas até precipitar (*salting-out*). Consequentemente, as proteínas maiores ou com maiores regiões hidrofóbicas irão geralmente se agregar e precipitar a concentrações salinas baixas (CUTLER, 2004; MORAES et al., 2008).

Acredita-se, então, que a precipitação é devida, além da remoção de moléculas de água consolidadas nas superfícies hidrofóbicas da proteína, à interação hidrofóbica, a qual é conhecida por ser mais forte em presença de altas quantidades de sal. Conforme é aumentada a temperatura a solubilidade proteica diminui, tal como é esperado para um efeito hidrofóbico. A solubilidade proteica também depende da presença de outras proteínas, já que uma proteína precipita a menores quantidades de sal em um extrato bruto, do que em solução relativamente pura (SCOPES, 2004).

A adição de sal deverá ter uma boa agitação e deve ser feita devagar, isto para evitar altas concentrações locais do sal associados com valores extremos de pH e consequente precipitação de proteínas antecipadamente. (SCOPES, 2004). O sulfato de amônio é muito utilizado na precipitação de proteínas, e as principais razões para tal fim incluem sua acentuada solubilidade em água (ao redor de 4 mol/L), seu baixo calor de diluição e por ser

a densidade de suas soluções saturadas (1,235 g/mL) menor do que da densidade das proteínas, o que permite a coleta do precipitado seja por centrifugação (CUTLER, 2004).

A Tabela 2.1 contém exemplos da diversidade da aplicação de salificação na precipitação de proteínas. Os parâmetros que possuem maior influência na precipitação são o tempo de contato entre agente precipitante e proteína e a concentração do agente precipitante. Estudos realizados usando o agente precipitante sulfato de amônio no percurso de 12 horas, como etapa inicial de purificação de endoglucanases, reportaram fatores de recuperações que variaram entre 60 a 80%. As enzimas celulolíticas de *Trichoderma harzianum* RIFAI foram precipitadas por fracionamento durante 6 horas a 4°C agregando sulfato de amônio sólido até atingir a faixa de concentração de saturação: 40-80%. Esse processo obteve as seguintes recuperações: 92,6% de atividade FPase, 92,7% de atividade CMC-celulase e 91,1% de atividade β -glicosidase e um valor de 1,9 como fator de purificação (SIDHU et al., 1985).

Tabela 2.1. Resumo de estudos realizados sobre precipitação de glicosil hidrolases por salificação.

Procedência	Recuperação	Condições	Sal	Referência
<i>T. harzianum</i> RIFAI	93% FPase 93% CMCase	4°C - 6 h	80% (NH ₄) ₂ SO ₄ (aq)	Sidhu et al., 1985
<i>T. harzianum</i> E8	70% xilanase	4°C – 30 min	390 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ (s)	Tan et al., 1987
<i>T. reesei</i>	78% FPase com HPMC	35°C – 11 h	80% (NH ₄) ₂ SO ₄ (aq)	Avelino et al., 1999
<i>Gymnoascus</i> <i>citrina</i>	85% endoglucanase	4°C – 12 h	35% e 64% (NH ₄) ₂ SO ₄ (s)	Jabbar et al., 2008
<i>S. cyaneus</i>	59% xilanase	4°C – 12 h	60% (NH ₄) ₂ SO ₄ (aq)	Ninawe et al., 2009
<i>A. crossean</i>	62% endoglucanase	4°C – 12 h	55% (NH ₄) ₂ SO ₄ (aq)	Li et al., 2009
<i>T. reesei</i>	31% sem HPMC 61% com HPMC	4°C – 1 h	9,0 mol/Kg H ₂ NCOONH ₄	Silva et al., 2010
<i>A. niger</i>	56% endoglucanase	10°C – 3 h	80% (NH ₄) ₂ SO ₄ (aq)	Farinas et al., 2011

Paralelamente, Tan et al. (1987) recuperaram 70% da atividade inicial xilanásica de *Trichoderma harzianum* E8 durante 30 minutos a 4°C adicionando 390 g de sulfato de

amônio per litro de fermentado clarificado. O objetivo do procedimento descrito era produzir xilanase livre de celulase a partir do fermentado clarificado.

Avelino et al. (1999) investigaram a recuperação da atividade celulásica do fermentado de *Trichoderma reesei* por adição de sulfato de amônio e hidroxipropil(metilcelulose) como co-precipitante. A análise dos resultados por planejamento experimental evidenciou a velocidade de adição do sal como a variável com maior influência na recuperação de proteínas por salificação. A recuperação da atividade foi maior para uma alta taxa de adição do sal. Isto possivelmente seja devido a que grandes partículas de precipitado foram formadas e, deste modo, a separação da fase líquida por centrifugação foi mais eficiente.

No caso das xilanases da bactéria *Streptomyces cyaneus*, foi recuperado 59% da atividade inicial destas enzimas após adição de 60% de sulfato de amônio em solução saturada durante 12 horas de precipitação a 4°C (NINAWA et al., 2008). Em outro estudo foram usadas duas etapas de precipitação, cada uma com 12 horas de duração. A primeira etapa de precipitação foi com 35% de saturação de sulfato de amônio sólido a 4°C e a segunda etapa, também a 4°C, foi com adição de 65% de saturação de sulfato de amônio sólido ao sobrenadante após centrifugação. O resultado obtido foi 85% de recuperação da atividade endoglucanase de *Gymnoascus citrina* (JABBAR et al., 2008).

Posteriormente, Li et al. (2009) obtiveram uma recuperação de 62% adicionando 55% de solução saturada de sulfato de amônio e deixando em precipitação durante 12 horas a 4°C a fim de purificar uma endoglucanase não conhecida do molusco *Ampullaria crosseana*.

Farinas et al. (2011) obtiveram um fator de recuperação de 56% diminuindo o tempo de contato para só 3 horas a 10°C com endoglucanases de *Aspergillus niger* precipitadas por uma solução saturada de 80% de sulfato de amônio.

A precipitação de proteínas exige a aplicação de operações unitárias posteriores para remover o agente precipitante, assim como o tratamento de águas residuais e remoção de tóxicos ou vapores explosivos devido às grandes quantidades de reagentes que são utilizados neste processo de concentração (TAN et al., 1987). Não entanto, uma alternativa muito interessante desta técnica de recuperação de proteínas é a utilização de sais voláteis, a qual oferece a grande vantagem de poder retirar as quantidades do sal da solução mediante conversão numa forma gasosa volátil por elevação de temperatura (e.g. secagem

por atomização) ou por diminuição da pressão (e.g. secagem a vácuo), sendo facilmente recuperadas e realimentadas no sistema (SCHMID, 2011).

Como exemplos de sais voláteis têm-se o bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) e o carbamato de amônio ($\text{NH}_4\text{NH}_2\text{COO}$), em cujas soluções coexistem em equilíbrio espécies iônicas (como o íon amônio) e moleculares (como a amônia).

O uso de eletrólitos voláteis para induzir a precipitação de proteínas por salting-out, apresentou-se como uma técnica promissora segundo o trabalho de Watanabe et al. (2006), que recuperaram 80% da atividade total de tripsina suína mediante precipitação com carbamato de amônio. No entanto, o alto valor de pH das soluções de carbamato de amônio causou certa desnaturação na atividade da tripsina. Estudos posteriores revelaram que o uso da precipitação com sais voláteis é efetivo para concentrar α -amilase e lipase, enquanto evidenciou um efeito de desnaturação para a celulase e a peroxidase. Portanto, cada enzima deve ser estudada individualmente (SILVA et al., 2010).

2.2.2. Precipitação por solventes orgânicos

A precipitação de proteínas por adição de solventes orgânicos é um processo que envolve principalmente a redução da constante dielétrica do meio, o qual promove a agregação de proteínas por interação de cargas. A desvantagem do uso deste método é a possível desnaturação das proteínas. Ainda assim, isto pode ser minimizado através da redução da temperatura para valores geralmente em torno de 0°C , já que, a baixa temperatura a flexibilidade das biomoléculas é menor, diminuindo assim a capacidade de penetração do solvente e de qualquer desnaturação irreversível das enzimas (PESSÔA e KILIKIAN, 2005).

As interações proteína-solvente foram estudadas inicialmente por Timasheff (1970) durante a desnaturação de lisozima por 2-cloroetanol e envolveram principalmente interações hidrofóbicas entre moléculas de solvente e resíduos não polares que normalmente estão situados no interior da proteína enovelada. As ditas interações dependem principalmente da composição da solução, uma vez que para perturbar as interações hidrofóbicas intramoleculares da proteína enovelada é necessário que a atividade do solvente seja suficientemente alta.

Conforme é elevada a temperatura o efeito desestabilizador dos solventes orgânicos é intensificado uma vez que são fortalecidas as interações hidrofóbicas intermoléculas, não obstante, a altas concentrações de solvente orgânico o processo de agregação da proteína geralmente é induzido e as mudanças na estrutura nativa da proteína agregada dependerão principalmente da temperatura e termoestabilidade da proteína, propriedade que está determinada em grande medida pelas forças hidrofóbicas da proteína em questão (LI et al., 2005; RENARD et al., 1999).

As mudanças da conformação proteica por efeito de solventes orgânicos continuaram sendo estudadas em diversas condições de agregação com fins terapêuticos (especialmente β -lactoglobulina e glicodelina). Principalmente foram observadas mudanças na estrutura secundária, como formação de β -folhas intermoleculares e perda de α -hélice e β -folhas intramoleculares devido às interações hidrofóbicas com 50% (v/v) de etanol a temperatura ambiente (ROBERT et al., 2002; RENARD et al., 1999). A exposição do núcleo hidrofóbico das proteínas em solução alcoólica aumenta com o aumento do comprimento da cadeia alifática de alcoóis e deste modo a tendência ao desdobramento das proteínas foi maior (HERSKOVITS et al., 1970). O valor do pH da solução teve também alta influência no processo de agregação das biomoléculas devido a que um aumento na carga líquida da proteína tende a diminuir a velocidade do processo pela repulsão entre moléculas carregadas e, especificamente em meio alcalino, as moléculas de solvente, além de interagir com os grupos hidrofóbicos da proteína, vão interagir por ligações de hidrogênio com grupos peptídeos $-NH$ formando a estrutura de β -folhas intermolecular (SASHI et al., 2012).

Os solventes adequados para precipitação de proteínas são aqueles miscíveis em água em todas as proporções e não tóxicos; os solventes mais usados que cumprem esses requerimentos são a acetona e o etanol (CUTLER, 2004), sendo este último o solvente mais popular e amplamente produzido no Brasil e no mundo.

A precipitação por solventes orgânicos depende muito da temperatura. Embora o mecanismo convencional da precipitação de proteínas por solventes orgânicos é associado com uma mudança da constante dielétrica do meio, essa premissa não pode ser sempre considerada devido a um estudo que apresentou o pesquisador Van Oss (1989). Através do uso de etanol como agente precipitante no fracionamento de proteínas do plasma

comprovou-se que, para sistemas em temperaturas negativas a 0°C, a presença do etanol não diminuiu significativamente a constante dielétrica da água, de fato 20% de etanol à temperatura de -5 °C tem a mesma constante dielétrica da água a 20 °C. O estudo concluiu que, para temperaturas inferiores, a interação do etanol com a água é mais significativa do que a interação com as proteínas, de modo que a precipitação é induzida pelo efeito de desidratação ocasionado nas superfícies de moléculas isoelétricas de proteína. Isto também evidenciou que a precipitação com etanol nestas condições deverá ser realizada a baixa concentração de sal, devido a que os sais tendem a ligar-se a superfícies de proteínas, diminuindo assim a probabilidade de atração electrostáticas entre proteínas.

Sobrenadantes de cultura de diversos fungos têm sido precipitados com etanol, principalmente devido a suas adequadas propriedades físico-químicas, como a sua baixa toxicidade e baixo custo. A Tabela 2.2 resume alguns estudos de precipitação de glicosil hidrolases por etanol.

Tan et al. (1987) conseguiram recuperar 63% de atividade xilanásica a 4°C usando 80% (v/v) de etanol como agente precipitante do fermentado filtrado de *T. harzianum* E8. A precipitação com etanol de β -xilosidase e xilanase produzidas pelo fungo *Penicillium janthinellum* foi estudada por Cortez e Pessôa Jr. (1999). Os melhores valores de recuperação reportados foram 74% de β -xilosisase e 80% de xilanase obtidas com 60% (v/v) e 80% de etanol (v/v), respectivamente, após 15 minutos de precipitação a 4°C. Recuperações por precipitação foram realizadas por Saha (2004) na purificação de endoglucanase produzida por uma nova linhagem do fungo *Mucor circinelloides*. A etapa inicial de purificação foi precipitação com etanol (75% v/v) durante 12 horas, seguida por duas etapas cromatográficas. Uma recuperação de 29% e um fator de purificação 11 foram obtidas na etapa de precipitação.

Farinas et al. (2004) avaliaram os parâmetros operacionais na precipitação de celulase e xilanase através do uso de planejamento experimental. Temperaturas elevadas e longos tempos de precipitação diminuem a atividade recuperada neste caso, enquanto temperaturas elevadas e curtos tempos de precipitação incrementam a recuperação da atividade proteica. Máximas eficiências foram obtidas para 80% (v/v) de etanol a 10°C durante 3 horas, mas os resultados das atividades recuperadas foram baixos: 40% para endoglucanase e 23% para xilanase produzida por *Aspergillus niger* (FARINAS et al., 2011).

Também para outros tipos de enzimas, principalmente na recuperação de enzimas extracelulares, a precipitação com solventes orgânicos demonstrou ser um método eficaz para alcançar certo grau de purificação. Cui et al. (2007) concentraram 85% da atividade de transglutaminase proveniente de *Streptomyces higroscopicus* com 70% v/v de etanol a 4°C durante uma noite e obtiveram 2 como fator de purificação. Analogamente, Golunski et al. (2011), obtiveram um fator de purificação de 2,3 e 120,3% da atividade recuperada de inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 mediante a precipitação com 55% v/v de etanol a 5°C. O valor da atividade (superior a 100%) sugere que a precipitação eliminou inibidores da enzima.

Tabela 2.2. Resumo de estudos realizados sobre precipitação de glicosil hidrolases por adição de etanol.

Procedência	Recuperação	Condições	Concentração	Referência
<i>T. harzianum</i> E8	63% xilanase	4°C – 15 min	80% (v/v)	Tan et al., 1987
<i>P. janthinellum</i>	74% β -glicosidase 80% xilanase	4°C – 30 min	60% (v/v) e 80% (v/v)	Cortez e Pessoa Jr, 1999
<i>Mucor circinelloides</i>	29% endoglucanase FP: 11	4°C – 12 h	75% (v/v)	Saha, 2004
<i>A. niger</i>	40% endoglucanase 23% xilanase	10°C – 3 h	80% (v/v)	Farinas et al., 2004
<i>T. reesei</i> (comercial)	99% FPase	20°C – 30 min	30% (v/v) e 1,96 MPa de CO ₂	Yao et al., 2004

*FP: fator de purificação.

Acetona, dimetoxietano e n-propanol foram testados para precipitação a 4°C de enzimas da preparação comercial (Pectinex™ Ultra SP-L), a qual contém pectinase, xilanase e celulase. Entre os três solventes testados, os melhores resultados foram usando n-propanol para as atividades finais das três enzimas quase inalteradas (DALAL et al., 2007).

A enzima celulase já foi também precipitada com soluções de etanol e água pressurizadas com CO₂ (YAO et al., 2004). Os autores reportaram que o efeito da pressão do CO₂ não foi significativo. Em relação à temperatura e a concentração de etanol, a atividade da celulase diminuiu para concentrações de etanol maiores do que 30% e temperaturas maiores do que 35°C.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Produção do fermentado de *Trichoderma harzianum* P49P11

A produção do coquetel enzimático fúngico foi realizada utilizando-se a cepa de *T. harzianum* P49P11 seguindo protocolo do laboratório de hidrolases fúngicas do CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas – SP) proposto por Delabona e colaboradores (2012). Para alcançar uma biomassa satisfatória na indução de proteínas fez-se uma pré-cultura e um cultivo posterior em biorreator mantendo constante a temperatura e o pH (29°C e pH 5,0).

O pré-inóculo foi obtido por raspagem de quatro placas de Petri contendo o fungo crescido. O material da raspagem de cada placa foi distribuído em meio contendo 20 mL de Tween 80 0,1% e a seguir foram transferidas a frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 1 L de meio de cultivo (10 g de celuflok, 5 g de glicose, 1,0 mL de Tween 80, 1,0 g de peptona e 50 mL de solução de sais). O volume final da solução continha as seguintes massas de sais adaptadas de Mandels e Webber (1969): 1 g. de KH_2PO_4 , 0,7 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 g de uréia, 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g de CaCl_2 , 5,0 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2 mg de CoCl_2 e 40 mL de inóculo. Agitação foi mantida usando agitadores orbitais (Inova 44, New Brunswick Scientific, EUA) por 72 horas a 150 rpm.

A seguir, a pré-cultura foi transferida assepticamente para um bioreator Bioflo (Eppendorf, Alemanha) de 20 L (volume total) contendo 10 L de volume de meio (1 L de volume de pré-inóculo, sendo o meio de propagação constituído de meio peptona vegetal 1,5 g/L, Tween 80 1,5 mL/L, solução de sais 150 mL/L, e com 10 g/L de bagaço de cana explodido e deslignificado e sacarose na proporção 3:1, como fonte de carbono). O ar

injetado entre 0,3 e 3,0 L/min foi controlado pelo sistema de cascata e estava saturado com 30% oxigênio dissolvido. A agitação variou entre 100 e 150 rpm. No volume final do cultivo, os sais estavam nas seguintes concentrações: 6 g/L de KH_2PO_4 , 4,2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,9 g/L de uréia, 0,9/L g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,9 g/L de CaCl_2 , 15 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,2 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,8 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 6 mg/L de CoCl_2). O bagaço de cana pré-tratado foi preparado pela técnica de explosão de vapor seguida de deslignificação com NaOH, usando uma proporção sólido-líquido de 1:10 (w/v) (ROCHA et al., 2012).

Durante o cultivo foram retiradas amostras de 1,0 mL do fermentado para a determinação de concentração de proteína total e da atividade enzimática. Ao final do cultivo, 72 h, o fermentado bruto foi centrifugado a 6600 g (Centrifuge Sorvall RC 6+, Thermo Scientific, EUA) por 20 min, para a separação da biomassa celular e o bagaço residual. A fase líquida foi filtrada com papel Whatman nº1, a fim de se garantir a clarificação do sobrenadante da cultura, aliquotada em volumes de 2 L em frascos de plásticos e estocada em freezer a -20°C para posterior utilização nos experimentos de precipitação.

Para os ensaios de precipitação, eram retirados volumes de 15 mL, os quais eram centrifugados previamente (4800 g por 10 min em centrífuga 5408R da Eppendorf, Alemanha). Alíquotas de 0,5 mL do fermentado foram retidas para a caracterização por meio de medidas do teor de proteínas e das atividades enzimáticas.

3.1.2. Reagentes químicos diversos

Para a preparação das soluções tampão e de substratos foram utilizados: ácido cítrico anidro, citrato de sódio dihidratado, carbonato de sódio e D-glicose anidra da Labsynth (Brasil); carboximetilcelulose de sódio, p-nitrofenol cristalino (p-NP), p-4-nitrofenil- β -D-glicopiranoside (p-NPG), D-(+)-xilose da Sigma Aldrich (EUA) e xilana de madeira de bétula 95588 da Fluka-Sigma (EUA). Para a preparação do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi utilizado: ácido dinitro-3,5-salicílico, fenol, hidróxido de sódio, meta-bissulfito de sódio e tartarato de sódio e potássio tetrahidratado da Sigma Aldrich (EUA). Os reagentes utilizados na eletroforese SDS-PAGE foram os seguintes: Bis-N,N-metileno-Bis-acrilamida, bis-acrilamida, TRIS-HCl, temed, TRIS-glicina, dodecil sulfato

de sódio (SDS), metanol, glicina, metanol, ácido acético, azul comassie R250, glicerol, isopropanol, nitrato de prata, formaldeído 38% (v/v), tiosulfato de sódio, acetato de sódio, carbonato de sódio (todos da Sigma Aldrich, EUA), e o marcador molecular PageRuler Protein Ladder de 170 a 10 kDa da Thermo Scientific (EUA).

3.1.3. Equipamentos

Durante os ensaios, o pH das soluções foi medido através de pHmetro modelo 827 da Metrohm (Suécia). Para a determinação da concentração de proteína e atividades enzimáticas, as medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Evolution 60S da Thermo Scientific (EUA). A remoção de etanol foi realizada através de centrifuga de vácuo Centrивap da Labconco (EUA). Durante os ensaios de precipitação a temperatura foi mantida constante por banhos TE-2000 com precisão de 0,1°C da Tecnal (Brasil). Para a manutenção da temperatura nos ensaios enzimáticos realizados em placa de 96 poços foi utilizado um termociclador tipo Nexus da Eppendorf (Alemanha).

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína total em solução foi determinada através do método proposto por Bradford (1976), com albumina de soro bovino (Sigma, EUA) como proteína padrão. O método consiste na adição de 500 µL da amostra diluída com água e 500 µL de reagente (Pierce Coomassie Plus Protein Assay Reagent, EUA). Após homogeneização manual e 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância da solução é medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. O branco de reação é feito com água filtrada, destilada e deionizada.

Para a quantificação de proteína total utilizando placa de 96 poços foi necessário diluir o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, EUA) em uma proporção 1:4 em água. Os volumes de reação utilizados para essa escala são: 10 µL de amostra para 200 µL do reagente diluído.

A absorção de luz pelo etanol presente nos sobrenadantes apresenta incompatibilidade com o reagente de Bradford utilizado e interfere nos resultados obtidos para concentrações de etanol maiores do que 10% (v/v), no entanto, as diluições que foram apresentadas dentro

dos valores estabelecidos na curva padrão corresponderam a concentrações de etanol adequadas, permitindo assim descartar qualquer interferência.

3.2.2. Ensaio de atividade de β -glicosidase

A determinação da atividade de β -glicosidase foi realizada adicionando 80 μ L do substrato cromogênico p-NPG 1 mmol/L a 20 μ L de amostra para os poços de uma placa de 96 poços inserida em gelo a fim de prevenir reação durante a preparação. A quantificação do p-nitrofenol (p-NP) liberado após hidrólise nas condições de reação (pH 4,8 durante 10 minutos a 50°C utilizando termociclador) foi realizada adicionando 100 μ L de carbonato de sódio 1 mol/L e medindo a absorbância a 400 nm para uma alíquota de 100 μ L em placa para leitura de 96 poços. Mediante a curva padrão de p-NP foram calculadas as atividades respectivas para os ensaios realizados em triplicata. Uma unidade de atividade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ mol de p-NP por minuto (BERGHEM et al., 1974, WOOD et al., 1988 e CHAUVE et al., 2010).

3.2.3. Ensaio de atividade de endoglucanase e xilanase

Para quantificar a concentração de açúcar redutor total liberado nos protocolos destas atividades enzimáticas foi utilizado o teste colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959) e curva padrão correspondente a cada protocolo, glicose para endoglucanase e xilose para xilanase.

A atividade xilanásica foi determinada usando solução 0,5% de xilana como substrato e a atividade endoglucanásica foi determinada usando solução 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Os volumes usados nas reações com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foram os seguintes: 50 μ L de substrato, 40 μ L de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 e 10 μ L de amostra. Após as soluções serem incubadas em placa de 96 poços no termociclador a 50°C por 10 minutos, a reação foi parada adicionando 100 μ L de reagente DNS, inclusive no branco, e estas soluções foram incubadas a seguir a 99°C por 5 minutos. Cada teste foi realizado em triplicata. Para a quantificação espectrofotométrica dos açúcares redutores solúveis foram transferidos 100 μ L da solução em placa de 96 poços para uma placa de leitura de 96 poços e em seguida foi medida a absorbância a 540 nm.

O cálculo da unidade de atividade enzimática (UA) está baseado na quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de produto (açúcar redutor) por minuto a 50°C (MANDELS et al., 1976), seguindo a equação 1:

$$Atividade = \frac{(C[açúcar] \times V[reação] \times FD)}{(T[reação] \times V[enzima])} \quad (1)$$

onde:

Atividade: atividade enzimática em unidades internacionais ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$);

C[açúcar]: concentração de açúcar ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$);

V[reação]: volume total da reação (mL);

FD: fator de diluição;

T[reação]: tempo de reação (min);

V[enzima]: volume total da enzima (mL).

A mistura usada para zerar o espectrofotômetro era preparada substituindo o volume de amostra (10 μL) pela solução tampão. Além das misturas de referência para zerar o espectrofotômetro e das misturas reacionais de teste, durante as reações de hidrólise foi necessário fazer misturas controle, os quais consistiram em (i) enzima sem substrato e (ii) substrato sem enzima e devem ser incubados todos juntos. Os valores de absorbância das misturas controle eram subtraídos dos valores das absorbâncias correspondentes para cada mistura teste de hidrólise.

A atividade específica para cada enzima estudada foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e massa de proteína em miligramas, sendo as unidades $\text{UA} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas.

3.2.4. Ensaio de atividade de celulase

O protocolo usado para a medida de atividade celulósica foi uma adaptação de diferentes métodos (ADNEY et al., 1996, GHOSE, 1987, MILLER, 1959 e WOOD et al., 1988) com uma redução de escala de trabalho de 10 vezes. O sinergismo do complexo glicosil hidrolítico foi realizado incubando-se 50 μL de amostra com três discos (total de aproximadamente 5 mg) de papel filtro Whatman n°1 obtidos por furador de papel de

escritório e 100 µL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 em tubos de ensaio. A reação enzima-substrato foi iniciada a 50°C. Após 60 minutos, a reação foi terminada por adição de 300 µL do reagente DNS e posterior incubação em banho de água a 95°C por 5 minutos. A reação colorimétrica foi interrompida introduzindo os tubos em gelo fundente e imediatamente foram agregados 2,0 mL de água. As absorbâncias das soluções foram medidas a 540 nm. Os testes foram feitos em triplicata e para cada amostra foram testadas duas diluições diferentes.

Foram utilizadas no mínimo duas diluições da enzima de forma que esta liberasse mais de 2 mg de glicose em uma das diluições e um pouco menos de 2 mg de glicose na diluição restante. Foi necessário realizar ensaios até obter os valores citados.

O seguinte procedimento foi usado para o cálculo das unidades de atividade pelo papel de filtro:

- a. Traduzir as absorbâncias obtidas das duas diluições utilizadas em concentrações de glicose usando a curva de calibração e associá-las com a concentração de enzima: inversa do fator de diluição.
- b. Estimar a concentração de enzima que teria liberado exatamente 2 mg de glicose traçando um gráfico semilog de concentração de enzima vs. concentração de glicose liberada.
- c. Calcular unidade da FPAse (FPU) baseada na unidade internacional (UI):

$$FPA = \frac{0,2}{(0,18016 \times 0,05 \times 60 \times C[enzima])} \mu mol. min^{-1} = \frac{0,37}{C[enzima]} FPU. mL^{-1} \quad (2)$$

C[enzima] é a concentração da enzima original do teste de hidrólise calculada por interpolação utilizando a equação da reta obtida no item a.

3.2.5. Análise de proteína por eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em equipamento Mini-Protein III da BioRad (EUA) sob condições desnaturantes utilizando gel de poliacrilamida a 12%. O composto usado para efetuar a dissociação de todas as proteínas presentes na amostra foi o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). Inicialmente 20 µL de amostra foram aquecidos em

torno de 95°C durante 5 minutos, na presença de 10 µL tampão de desnaturação contendo SDS em excesso. Assim, nestas condições o SDS ligou-se aos polipeptídios segundo uma razão de massas, 1,4 g de SDS por grama de polipeptídio (LAEMMLI, 1970). A seguir, a eletroforese neste estudo dividiu-se em 3 etapas:

- a. Preparação do gel separador e do gel empilhador;
- b. Corrida eletroforética a 120 V para alíquotas de 18 µL de amostra previamente preparadas e 5 µL de marcador molecular;
- c. Coloração com azul de Coomassie R250 a 0,2% (m/v) ou nitrato de prata de acordo ao protocolo proposto por Morrissey (1981) e descoloração do gel.

3.3. Métodos experimentais

3.3.1 Ensaios cinéticos para determinar o tempo de equilíbrio da precipitação com etanol

Volumes constantes (0,8 mL) do fermentado clarificado foram distribuídos em tubos tipo Eppendorf de 2 mL e mantidos a 5°C em um banho de água. A seguir, foi adicionado gota a gota etanol absoluto frio (5°C) aos tubos até atingir 60% de etanol. Após homogeneização por inversão, as soluções permaneceram no banho em estado estático e foram retiradas em diferentes tempos. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 9000 g e 5°C por 10 minutos. Os precipitados foram separados e dissolvidos em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8. A concentração de proteína total foi determinada no sobrenadante e na solução resultante aplicando o método de Bradford (1976) adaptado a menor escala. Todas as precipitações foram realizadas em duplicata.

3.3.2. Determinação da faixa de concentração de etanol efetiva para precipitação de proteínas

O procedimento experimental foi similar ao item 3.3.1, porém, o tempo de precipitação foi fixado para 6 horas e as concentrações de etanol variaram entre 33,3% a 80% (v/v). A variação da concentração de etanol foi realizada aumentando o volume de etanol para uma alíquota de 800 µL do fermentado centrifugado. O efeito da concentração de etanol nas

precipitações foi medido através da quantificação de proteínas totais aplicando o método de Bradford.

3.3.3. Efeito do etanol nos ensaios enzimáticos

Para conhecer a influência do etanol em cada um dos protocolos mencionados foram feitas diferentes diluições de etanol em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8. A seguir, um volume fixo do coquetel enzimático comercial de *T. reesei* (Acellerase 1500, Danisco US Inc, Genencor Division, EUA) foi diluído nas soluções diluentes com diferentes concentrações de etanol entre 1% a 50%. Após o preparo destas diluições enzimáticas com variação da concentração de etanol, foram realizados os protocolos já mencionados para determinar as atividades enzimáticas correspondentes, além das atividades de um controle sem etanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.4. Precipitação das enzimas de interesse em função da temperatura, do pH inicial do fermentado e da concentração de etanol

A avaliação do etanol como agente precipitante de glicosil hidrolases foi realizada mediante ensaios de precipitação similares aos mencionados no item 3.3.1, porém fixando o tempo de precipitação para 6 horas e testando diferentes parâmetros primordiais na precipitação com solventes orgânicos: concentração do agente precipitante, temperatura e pH do fermentado.

Foram utilizados os métodos analíticos já mencionados para avaliar o efeito do processo de precipitação nas recuperações das atividades das enzimas de interesse através da determinação dos balanços de massa (método de Bradford) e os balanços de atividade (atividades de xilanase, endoglucanase, β -glicosidase e FPAse). Para os testes enzimáticos foi necessária a remoção do etanol dos sobrenadantes. A remoção do etanol foi realizada por evaporação através de uma centrífuga de vácuo a 35°C durante uma hora.

3.3.5. Cinéticas de precipitação a 5°C em função da concentração de etanol

A fim de conhecer o efeito do tempo de precipitação na manutenção das atividades enzimáticas, foram realizadas cinéticas a 5°C para concentrações de etanol de 60%, 75%,

80%, 85% e 90% (v/v). O procedimento experimental realizado foi o mesmo do item 3.3.1 para um volume final de 1,0 mL. Neste procedimento foi quantificada a massa proteica, a atividade xilanásica e a atividade FPAse apenas da fase precipitado. A fase sobrenadante foi descartada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dos experimentos deste trabalho são apresentados seguindo a seguinte sequência: inicialmente, no item 4.1 são apresentados os resultados da cinética de precipitação das proteínas extracelulares produzidas pelo fungo *T. harzianum* P49P11 durante hidrólise de bagaço de cana. Estes ensaios evidenciaram o tempo necessário para que o sistema entrasse em equilíbrio e as quantidades de proteína precipitada por adição de 60% de etanol a 5°C. Em seguida, no item 4.2, são apresentados os resultados dos ensaios de precipitação a 5°C em função da concentração de etanol, a fim de deduzir a faixa de concentrações de etanol na qual houve uma maior quantidade de proteína na fase sólida.

A seguir, em vista da alta concentração de etanol na fase sobrenadante e por ser uma substância conhecida por interferir com os ensaios de proteína em solução, são apresentados no item 4.3 os resultados do efeito de etanol para cada teste enzimático que deve ser aplicado para determinar os balanços de atividade. No item 4.4 são apresentados os resultados de partição das atividades de celulasas e xilanases de *T. harzianum* P49P11 após precipitação em função da temperatura (5°C, 15°C e 25°C), da concentração de etanol (60%, 75% e 90% v/v) e do pH inicial do fermentado (5,0, 6,5 e 8,0) em termo de balanço de atividades. O item 4.5 é um estudo cinético detalhado da fase precipitado que foi realizado para comparar as recuperações das atividades enzimáticas de diferentes concentrações de etanol. A seguir, o item 4.6 apresenta os resultados da última etapa deste estudo relacionada com a separação e comparação das proteínas características do fermentado de *T. harzianum* e da fase precipitado resultante das condições mais promissórias deste trabalho.

4.1. Estudo cinético da precipitação proteica por adição de etanol

A fim de determinar o tempo de equilíbrio das precipitações com etanol, foram quantificadas proteína total presente nas duas fases geradas após precipitação para quatro tempos de envelhecimento (0, 3, 6 e 16 horas) a 5°C e adicionando 60% de etanol (Figura 4.1).

Após adição do etanol foi observada intensa turvação da mistura evidenciando que a indução da precipitação foi instantânea. Mediante a quantificação de proteína recuperada observou-se que 60% de etanol causou a precipitação de no máximo 56% da carga de proteína utilizada. A recuperação na fase sobrenadante completou o balanço de massa para todos os tempos estudados.

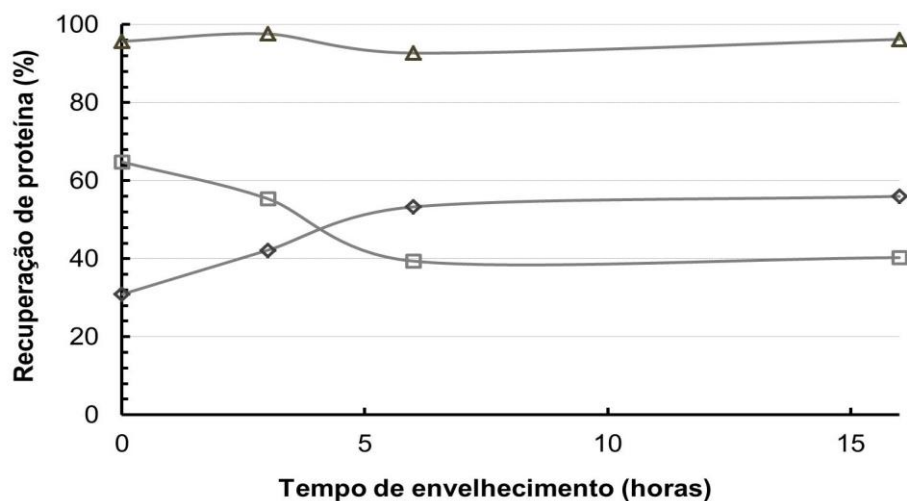


Figura 4.1. Cinética de precipitação do fermentado de *T. harzianum* P49P11 a 5 °C com 60% de etanol. □: Sobrenadante; ◇ precipitado; Δ: recuperação total. Massa inicial de proteína: 510 µg em 800 µL de fermentado.

A recuperação de proteína no precipitado aumentou com o aumento da quantidade de etanol adicionada ao fermentado, enquanto a quantidade de proteína na fase sobrenadante diminuiu. A quantificação da precipitação foi satisfatória em termos dos balanços de massa para todos os ensaios. Houve um aumento significativo da recuperação de proteína no precipitado para concentrações de etanol entre 50 a 66% (v/v) de etanol.

O tempo é um fator importante no aumento da quantidade de proteína recuperada na fase sólida, indicando que a eficiência máxima de precipitação é conseguida quando o sistema atinge o equilíbrio. A quantidade de proteína recuperada por precipitação nesse estudo (53,3% e 56,0% para 6 e 16 horas, respectivamente), mostraram que 6 h é um tempo adequado para alcançar o equilíbrio na formação de uma fase sólida proteica por efeito da adição de 60% de etanol ao fermentado de *Trichoderma harzianum* P49P11 a 5°C, uma vez que estes dois valores estão bem próximos e o erro experimental é de 1,8%.

A partir deste estudo cinético, o tempo de 6 horas foi estabelecido como o tempo de envelhecimento dos experimentos de precipitação seguintes.

4.2. Determinação da faixa de concentração de etanol efetiva para precipitar as proteínas

Ensaio preliminares de precipitação variando a quantidade de etanol adicionado foram realizados com o intuito de definir uma faixa de concentração de alta eficiência de formação da fase sólida proteica, a ser estudada em detalhe subsequentemente. A faixa de concentrações de etanol estudada preliminarmente situou-se entre 33,3% v/v e 80,0% v/v (Figura 4.2).

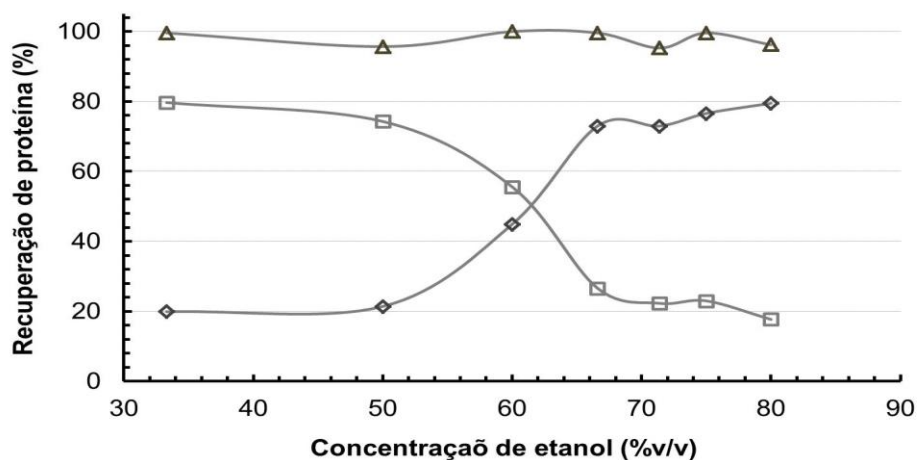


Figura 4.2. Precipitação de proteínas do fermentado de *T. harzianum* P49P11 com etanol a 5°C e tempo de envelhecimento de 6 h. Δ: Recuperação total; ◊: precipitado; ◻: sobrenadante. Massa de proteína inicial: 778 µg.

A precipitação aumentou com o aumento da quantidade de etanol, enquanto a quantidade de proteína na fase sobrenadante diminuiu. A quantificação da precipitação foi satisfatória em termos dos balanços de massa para todos os ensaios. Comparando as quantidades de proteína precipitada em função das diferentes concentrações de etanol estudadas, o aumento da precipitação alcançou taxas maiores na mudança da concentração de etanol de 50% para 60% e posteriormente na mudança de concentração de 60% para 66,6%. Os aumentos na quantidade de proteína precipitada foram de 23,5% e 28,1%, respectivamente.

4.3. Efeito de etanol nos ensaios enzimáticos

O aumento da concentração de etanol durante as precipitações de proteínas pode apresentar principalmente dois efeitos: aumento da quantidade e tipo de proteínas precipitadas, possível desnaturação e interferência na medida da atividade enzimática.

Assim, antes de analisar o efeito do etanol na precipitação das proteínas de interesse, foi necessário conhecer seu efeito nos procedimentos de laboratório escolhidos para determinar as atividades enzimáticas, isto com o objetivo de reduzir o erro das medidas e deste modo controlar a quantidade de etanol tolerada para cada protocolo experimental utilizado.

Deste modo, as concentrações de etanol em solução foram variadas para se investigar a quantidade limite de etanol na qual a medida da atividade enzimática é independente para cada método analítico utilizado.

4.3.1. Efeito da presença de etanol na atividade de β -glicosidase

Analisando os dados da Tabela 4.3.1 pode-se dizer que para concentrações de etanol iguais ou maiores que 13% (v/v) a presença do etanol diminuiu a atividade enzimática em mais da 10% da atividade relativa e deste modo o protocolo para determinar a atividade de β -glicosidase deve ser aplicado após remoção do etanol ou com amostras diluídas adequadamente.

Tabela 4.3.1. Efeito do etanol na atividade de β -glicosidase sobre p-NPG.

% Etanol (v/v)	0	1,0	2,0	4,8	9,1	13	17	33	50
Atividade* (U/mL)	28	27	27	26	28	25	24	23	23
Atividade relativa ** (%)	100	96,4	96,4	92,9	100	89,3	85,7	82,1	82,1

*Desvio padrão de 2,0 U/mL para N=6. **Atividade relativa ao ensaio sem etanol.

4.3.2. Efeito da presença de etanol na atividade de endoglucanase

Concluiu-se através dos resultados expostos na Tabela 4.3.2 que o método analítico utilizado para medir atividade de endoglucanase também é afetado notavelmente para concentrações de etanol iguais ou maiores do que 13% (v/v). O desvio padrão para o método analítico de endoglucanase foi o maior comparado com os outros protocolos reproduzidos, sendo causado provavelmente pela alta viscosidade do substrato CMC.

Tabela 4.3.2. Efeito do etanol na atividade de endoglucanase sobre CMC.

% Etanol (v/v)	0	1,0	2,0	4,8	9,1	13	17
Atividade* (U/mL)	244	245	243	239	229	225	221
Atividade relativa** (%)	100	100	99,6	97,5	93,9	92,2	90,6

*Desvio padrão de 21 U/mL para N=6. **Atividade relativa ao ensaio sem etanol.

4.3.3. Efeito da presença de etanol na atividade de xilanase

Observando os resultados mostrados na Tabela 4.3.3, o método analítico utilizado para determinar a atividade xilanásica apresentou valores menores para concentrações crescentes de etanol. Isto evidenciou mais uma vez que o etanol interfere nos ensaios enzimáticos. Pode-se considerar que o etanol não interfere no ensaio enzimático da xilanase para concentrações iguais ou menores que 9,1% (v/v).

Tabela 4.3.3. Efeito do etanol na atividade de xilanase sobre xilana de bétula.

% Etanol (v/v)	0	1,0	2,0	4,8	9,1	13	17	33	50
Atividade* (U/mL)	371	356	358	362	365	351	348	315	308
Atividade relativa** (%)	100	96,0	96,5	97,6	98,4	94,6	93,8	84,0	83,0

*Desvio padrão de 15 U/mL para N=6. **Atividade relativa ao ensaio sem etanol.

4.3.4. Efeito da presença de etanol na atividade FPase

Os resultados da influência de etanol na atividade de FPase, mostrados na Tabela 4.3.4, indicaram uma queda da atividade a partir de 13% de etanol (v/v). Devido ao uso comum do reagente DNS na maioria dos protocolos e por se tratar de um sinergismo entre enzimas, era prevista a semelhança entre os resultados dos itens anteriores da influência do etanol para as atividades celulósicas individuais e a atividade celulósica total (FPase).

Mediante os resultados obtidos, foi tomada a decisão de remover o etanol da fase sobrenadante após precipitação como etapa prévia a fim de avaliar a partição de glicosil hidrolases por precipitação por etanol, já que o etanol perturba a atividade das enzimas geralmente a través de interações hidrofóbicas (TIMASHEFF, 1970) e, uma simples diluição das fases sobrenadantes resultaria em atividades muito baixas, não detectáveis pelos métodos aqui utilizados. A remoção do etanol foi realizada então sob vácuo a 35°C.

Tabela 4.3.4. Efeito do etanol na atividade de celulase sobre papel de filtro

% Etanol (v/v)	0	1,0	2,0	4,8	9,1	13	17
Atividade* (U/mL)	56,9	57,8	57,6	57,4	56,9	52,9	35,4
Atividade relativa **(%)	100	101	101	101	100	93,0	62,2

*Desvio padrão de 6,0 U/mL para N=6. **Atividade relativa ao ensaio sem etanol.

Especificamente, os túneis ou fendas do domínio catalítico das celulasas contêm resíduos hidrofóbicos e polares que interagem com as cadeias dos carboidratos. Estudos revelaram que uma vez são alterados os resíduos hidrofóbicos nos túneis do domínio catalítico de celulasas a digestão de celulose não era possível (CHUNDAWAR et al., 2011).

Neste caso, a presença de etanol pode ter ocasionado deslocalização de cargas eletrônicas de resíduos peptídicos das celulasas, uma vez que estudos cristalográficos (raios X) e mutagênicos revelaram que o deslocamento das moléculas de água ocasionada por adição de álcool às proteínas estabelece ligações entre o álcool e resíduos hidrofóbicos das proteínas ou simplesmente perturbam a estrutura iônica de peptídeos, que consequentemente pode interferir a função catalítica das enzimas, principalmente por perda de flexibilidade molecular (DWYER e BRADLEY, 2000).

4.4. Estudo de precipitação de proteínas e da partição das atividades enzimáticas do fermentado de *Trichoderma harzianum* P49P11 por adição de etanol

Estudos de precipitação com etanol foram realizados utilizando-se o método OFAT (“one-factor-at-a-time”) para as variáveis pH, temperatura e concentração de etanol. Os valores de pH testados foram 5,0 (pH da fermentação), 6,5 e 8,0, cobrindo uma faixa que vai de pH levemente ácido a levemente básico. A temperatura variou de 5°C (temperatura relativamente baixa para minimizar a desnaturação proteica) a 25°C (temperatura próxima a ambiente, industrialmente interessante por minimizar gastos com aquecimento e resfriamento).

Foram avaliadas as recuperações das atividades de xilanase, endoglucanase, β -glicosidase e FPase particionadas para a fase precipitado e para a fase sobrenadante e determinaram-se os balanços de massa proteica correspondentes.

As concentrações de etanol foram escolhidas após análise do estudo 4.2, o qual revelou que a quantidade de proteína recuperada mediante as precipitações com etanol a 5°C pode ser aumentada até 3,4 vezes através do aumento da concentração de etanol de 50% a 71,4%. Neste estudo preliminar observou-se que para quantidades maiores que 70% de etanol não houve um aumento significativo da quantidade de proteína precipitada. No entanto, achou-se apropriado testar precipitações com maiores concentrações de etanol a fim de determinar se alguma enzima hidrolítica permanece na fase sobrenadante, pois pode ser que existam enzimas em concentrações muito baixas para afetar a recuperação de massa, mas com atividade relativamente significativa. Deste modo, as concentrações de etanol estudadas foram 60%, 75% e 90% (v/v).

Os resultados deste estudo em termos de recuperação de atividade da fase precipitado são apresentados como figuras e em termos de balanço de atividade são apresentados como tabelas, exceto para a recuperação de FPase para a qual só são apresentados os resultados na fase precipitado porque a atividade FPase na fase sobrenadante foi desprezível.

4.4.1. Estudo de precipitação de proteína

A Tabela 4.4.1 apresenta os resultados de todas as precipitações realizadas. A Figura 4.4.1 evidenciou uma menor quantidade de proteína precipitada nos fermentados com pH 8,0 a 15°C e 25°C, principalmente com 75% e 90% de etanol. Deste modo, o aumento de

pH do fermentado não favoreceu a precipitação em termos da quantidade de proteína precipitada.

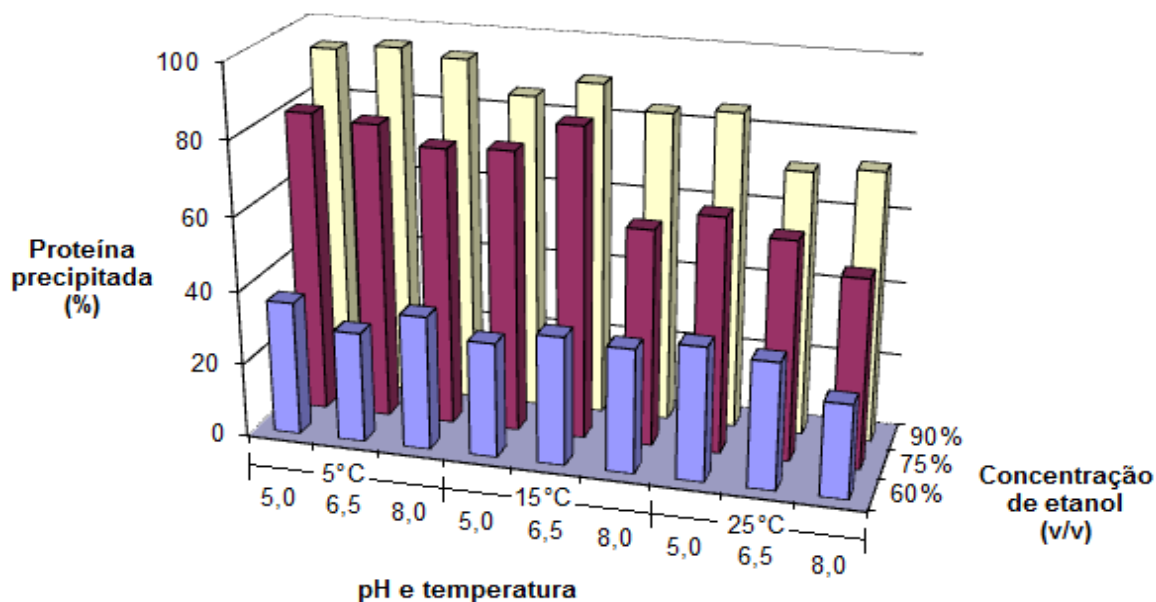


Figura 4.4.1. Perfil de precipitação com etanol das proteínas do fermentado em função da concentração de etanol, o pH do fermentado e a temperaturas das precipitações.

Baseados nos balanços de massa proteica reportados na Tabela 4.4.1, vê-se que foi possível recuperar completamente a proteína solúvel inicial, exceto nas precipitações com 60% de etanol e nas precipitações realizadas a 25°C. Este fato indica uma maior solubilidade das proteínas a temperaturas mais altas, não sendo o comportamento de solubilidade retrógrada, comum em proteínas, dominante neste caso (Christopher et al., 1998).

4.4.2. Estudo de precipitação de xilanase

A Figura 4.4.2 mostra as atividades de xilanase para cada fase precipitado em função das condições utilizadas durante a precipitação. Este perfil de recuperação da xilanase caracterizou-se por alta recuperação de atividade nos precipitados formados com 90% de etanol em todas as temperaturas e valores de pH testados.

Tabela 4.4.1. Balanços de massa proteica das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante as 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol. A concentração proteica média do fermentado clarificado foi 1,08 mg/mL.

pH do fermentado	Temperatura (°C)	% Etanol (v/v)	Massa proteica da fase precipitado (%)	Massa proteica da fase sobrenadante (%)	Recuperação total (%)
5,0	5	60	36,4	57,6	94,0
		75	81,7	15,1	96,8
		90	94,2	10,6	105
	15	60	31,2	73,3	104
		75	76,1	10,6	86,7
		90	85,5	13,7	99,2
	25	60	36,3	48,7	85,0
		75	63,7	20,6	84,3
		90	85,2	13,5	98,7
	5	60	30,0	60,0	90,0
		75	80,1	19,1	99,2
		90	95,7	6,50	102
6,5	15	60	34,9	53,8	88,7
		75	84,0	16,5	100
		90	90,1	10,8	101
	25	60	34,4	51,4	85,8
		75	59,3	34,8	94,1
		90	71,4	21,5	92,9
	5	60	36,4	44,3	80,7
		75	75,2	23,9	99,1
		90	93,9	6,70	101
8,0	15	60	33,7	50,7	84,4
		75	58,7	46,6	105
		90	83,7	12,8	96,5
	25	60	25,4	48,7	74,1
		75	51,2	43,4	94,6
		90	73,0	27,3	100

Mesmo assim, nos dados dos balanços de atividade reportados na Tabela 4.4.2 observou-se escassa atividade na fase solúvel para todos os ensaios de precipitação, podendo ter ocorrido desnaturação durante o processo de remoção do etanol a 35°C, uma vez que na fase precipitado parece não ter acontecido desnaturação já que conforme foi aumentada a concentração de etanol aumentou a atividade de xilanase desta fase.

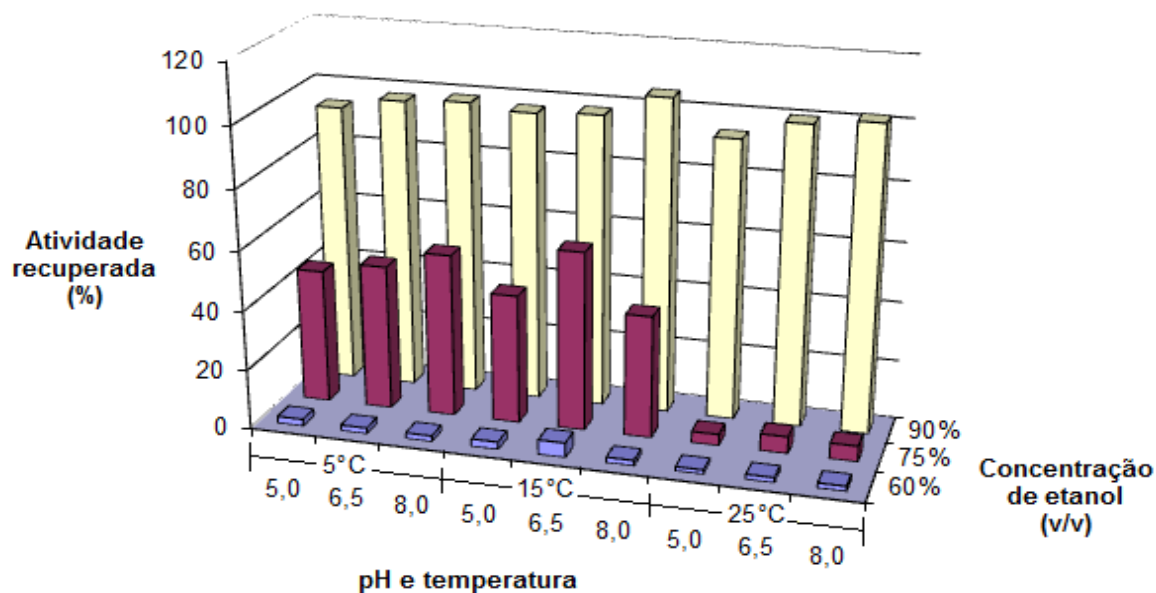


Figura 4.4.2. Perfil de recuperação da atividade de xilanase por precipitação com etanol.

Por estudos realizados por Tan et al., 1985 e Wong et al., (1986) sabe-se que o pI das principais xilanases de *T. harzianum* são 9,4, 9,5 e 8,5 para xilanases de 20, 29 e 22 kDa, respectivamente. Estudos estimaram que as xilanases de *T. harzianum* representam aproximadamente 25% do total de proteína extracelular e têm uma relação três vezes mais alta de atividade comparada com a FPAse na preparação em bruto (SERPA et al., 2012; TAN et al., 1985).

Paralelamente, Tan et al., (1985) e Wong et al., (1986) verificaram que a xilanase menor é responsável pela maior parte da atividade xilanásica, medida pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). No fermentado deste estudo, os valores de pI das xilanases são muito próximos sendo em torno de 9,0, podendo explicar a pouca variabilidade no perfil de recuperação deste complexo em função do pH de precipitação.

Tabela 4.4.2. Balanços de atividade de xilanase das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante as 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol. A atividade inicial do fermentado clarificado foi 41,7 U/mL.

pH do fermentado	Temperatura (°C)	Concentração de etanol (v/v)	Atividade da fase precipitado (%)	Atividade da fase sobrenadante (%)	Recuperação total de atividade (%)
5,0	5	60	2,30	3,50	5,80
		75	45,0	3,90	48,9
		90	93,6	6,40	100
	15	60	2,50	5,40	7,90
		75	43,3	1,10	44,4
		90	96,8	1,40	98,2
	25	60	1,40	3,60	5,00
		75	3,80	3,10	6,90
		90	93,6	1,20	94,8
6,5	5	60	1,90	8,00	9,90
		75	48,7	10,7	59,4
		90	97,4	2,60	100
	15	60	4,90	7,30	12,2
		75	60,0	2,40	62,4
		90	97,8	3,20	101
	25	60	1,70	3,20	4,90
		75	5,70	0,90	6,60
		90	102	2,30	104
8,0	5	60	1,90	4,20	6,10
		75	54,7	2,80	57,5
		90	98,6	1,40	100
	15	60	1,80	5,50	7,30
		75	41,0	3,70	44,7
		90	105	6,0	111
	25	60	1,70	2,60	4,30
		75	5,26	0,60	5,86
		90	102	10,0	112

4.4.3. Estudo de precipitação de endoglucanase

O perfil de recuperação da atividade de endoglucanase por precipitação com etanol (Figura 4.4.3) mostrou-se afetado principalmente pelo pH do fermentado, exceto para os precipitados formados com 90% de etanol, uma vez que houve recuperação praticamente completa independente do pH e a temperatura. As recuperações com 60% estiveram na faixa de 7,2% a pH 8,0 e 33,5% a pH 5,0. As recuperações obtidas com 75% situaram-se entre 17% a pH 8,0 e 75,8% a pH 5,0, enquanto a menor recuperação com 90% foi de 86,9% também a pH 8,0.

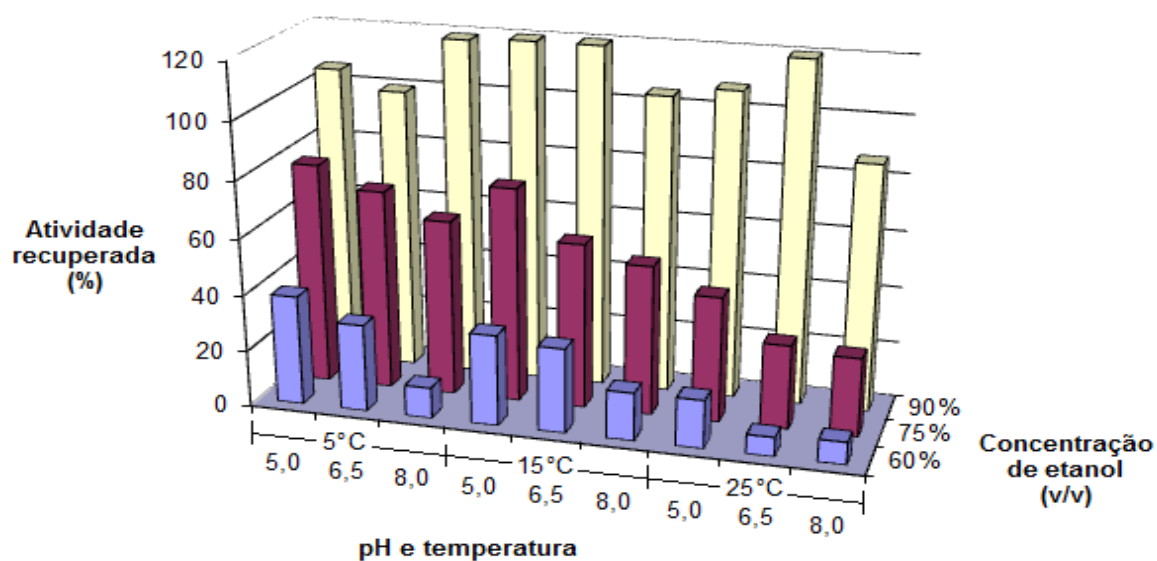


Figura 4.4.3. Perfil de recuperação da atividade de endoglucanase por precipitação com etanol.

Além disso, de acordo aos balanços de atividade mostrados na Tabela 4.4.3, os balanços de atividade da endoglucanase foram satisfatórios após precipitações com 60% e 75% de etanol a pH 5,0. Enquanto, para temperaturas maiores houve diminuições de atividade à medida que foi aumentado o valor de pH.

Tabela 4.4.3. Balanços de atividade de endoglucanase das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol. A atividade inicial do fermentado clarificado foi 34 U/mL.

pH do fermentado	Temperatura (°C)	Concentração de etanol (v/v)	Atividade da fase precipitado (%)	Atividade da fase sobrenadante (%)	Recuperação total de atividade (%)
5,0	5	60	33,5	65,7	99,2
		75	72,4	28,6	101
		90	106	11,0	116
	15	60	31,0	59,9	90,9
		75	75,8	30,0	106
		90	108	11,0	118
	25	60	17,2	49,9	67,1
		75	44,4	23,0	67,4
		90	108	12,0	120
6,5	5	60	19,9	59,9	79,8
		75	58,8	15,3	74,1
		90	99,6	10,4	110
	15	60	32,2	61,5	93,7
		75	52,9	17,0	69,9
		90	124	12,0	136
	25	60	6,90	34,5	41,4
		75	25,5	19,5	45,0
		90	122	11,0	133
8,0	5	60	10,9	27,7	38,6
		75	37,7	17,6	55,3
		90	99,0	10,0	109
	15	60	17,0	36,4	53,4
		75	25,7	28,4	54,1
		90	104	0,10	104
	25	60	7,20	30,1	37,3
		75	17,0	13,8	30,8
		90	86,9	16,0	103

4.4.4. Estudo de precipitação de β -glicosidase

A Figura 4.4.4 mostra as atividades de β -glicosidase que caracterizaram os precipitados em função das condições de precipitação. Observou-se neste caso que as atividades recuperadas com 60% de etanol estiveram influenciadas exclusivamente pela temperatura, sendo recuperada em torno de 15% de atividade a 5°C, 30% a 15°C e 20% a 25°C.

Observou-se recuperações de atividade praticamente completas com 90% (v/v) de etanol, independente da temperatura de precipitação, exceto para pH 8,0 que levou a menores valores de recuperação. Para 60 e 70% (v/v) de etanol não se observou nenhuma tendência bem definida, exceto recuperações mais baixas a 25°C.

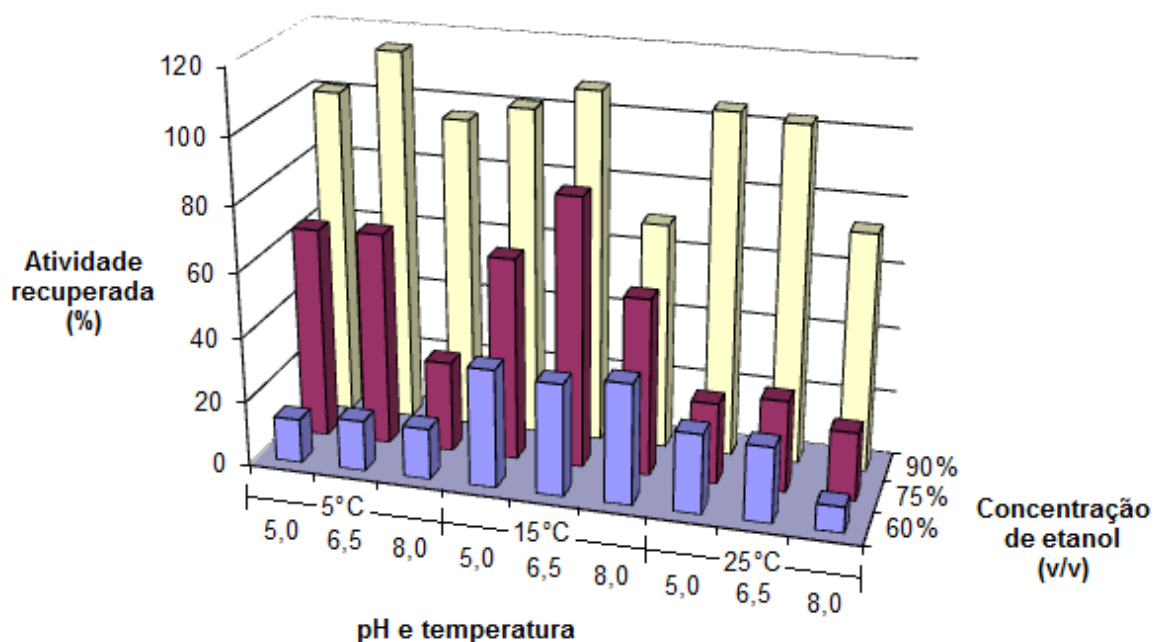


Figura 4.4.4. Perfil de recuperação da atividade de β -glicosidase por precipitação com etanol.

Em termos de balanço de atividade, na Tabela 4.4.4 pode-se observar que apenas as fases sobrenadantes resultantes da adição de 60% de etanol apresentaram alta atividade, permitindo assim maior recuperação da atividade total do que as concentrações maiores de etanol.

Tabela 4.4.4. Balanços de atividade de β -glicosidase das precipitações com etanol em função do pH do fermentado, a temperatura durante as 6 horas de precipitação e a concentrações de etanol. A atividade inicial do fermentado clarificado foi 0,45 U/mL.

pH do fermentado	Temperatura (°C)	Concentração de etanol (v/v)	Atividade da fase precipitado (%)	Atividade da fase sobrenadante (%)	Recuperação total de atividade (%)
5,0	5	60	17,8	60,9	78,7
		75	65,2	1,00	66,2
		90	110	2,10	112
	15	60	30,0	63,7	93,7
		75	62,4	1,30	63,7
		90	101	0,10	101
	25	60	24,5	59,6	84,1
		75	25,0	4,60	29,6
		90	105	1,00	106
6,5	5	60	15,6	59,1	74,7
		75	65,8	17,0	82,8
		90	115	9,00	124
	15	60	34,6	64,7	99,3
		75	79,4	0,90	80,3
		90	108	0,10	108
	25	60	24,5	59,1	83,6
		75	28,2	4,40	32,6
		90	103	1,00	104
8,0	5	60	15,7	58,0	73,7
		75	27,9	5,60	33,5
		90	110	9,00	119
	15	60	31,7	55,1	86,8
		75	28,4	2,30	30,7
		90	69,7	7,90	77,6
	25	60	14,7	54,0	68,7
		75	21,0	3,80	24,8
		90	73,0	3,30	76,3

4.4.5. Estudo de precipitação de FPAse

Além da partição por precipitação com etanol de enzimas celulolíticas específicas, foi traçado também o perfil de recuperação da atividade do complexo celulolítico ou FPAse, o qual envolve atividades de diversas enzimas, sendo as principais as β -glicosidases, endoglucanases e exoglucanases. A Figura 4.4.5 evidencia a alta influência do pH na recuperação das celulasas durante as precipitações. Com 60% de etanol a recuperação das atividades cooperativas do complexo celulolítico foram desprezíveis para todos os valores de pH e temperatura testados, enquanto com 75% de etanol a recuperação da atividade na fase precipitado foi em torno de 60% para pH 5,0 e apresentou diminuições conforme o aumento de pH do fermentado.

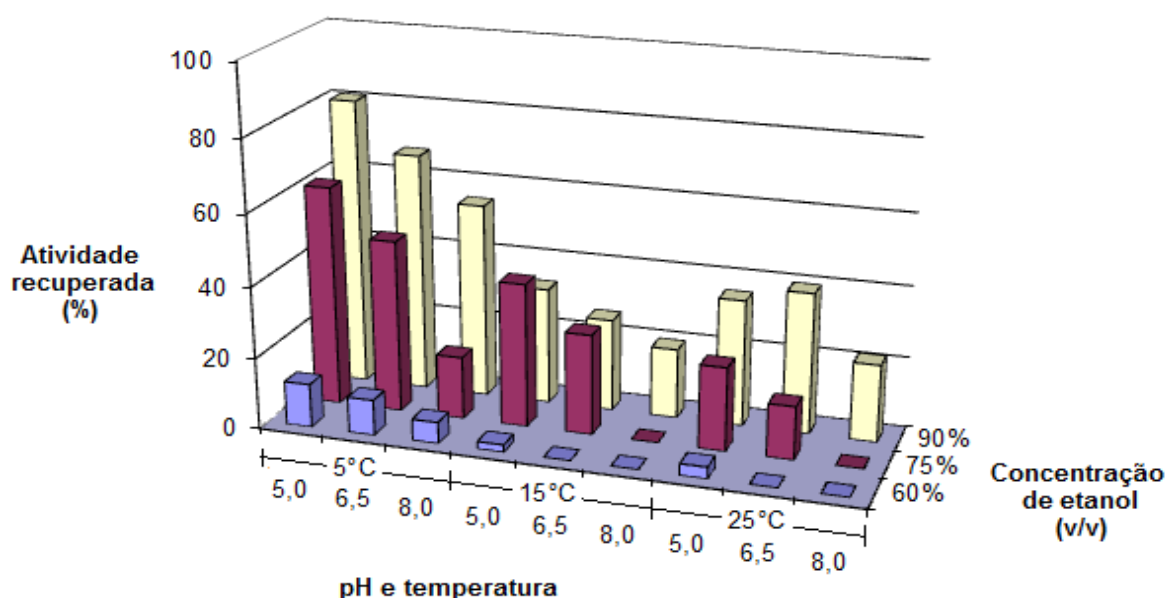


Figura 4.4.5. Perfil de recuperação da atividade FPAse por precipitação com etanol. A atividade inicial do fermentado clarificado foi 2,74 FPU/mL.

Com 90% de etanol as atividades recuperadas de FPAse aumentaram ao redor de 20% a 5°C e 25°C em comparação com as atividades recuperadas com 75% de etanol. A determinação das atividades na fase solúvel não foi detectada utilizando o método do tubo de ensaio com papel de filtro como substrato.

Analisando os perfis de recuperação das celulasas (Figuras 4.4.3 e 4.4.4), o aumento do valor de pH no fermentado diminuiu a atividade FPAse recuperada por precipitação. Isto ocorreu possivelmente devido à repulsão entre moléculas de proteína carregadas

positivamente, atenuando assim a velocidade do processo de precipitação por solventes orgânicos. Neste estudo já relatou-se este efeito negativo do aumento de pH, especialmente da endoglucanase. Os valores reportados de pI das endoglucanases produzidas pelo gênero *Trichoderma* estão entre 5,10 e 6,20. Deste modo, para aumento de valores de pH 6,50 e 8,0 as moléculas de endoglucanase aumentam gradativamente sua carga positiva (SASHI et al., 2012; THRANE et al., 1997).

Paralelamente, analisando o aumento da temperatura durante o processo de agregação proteica, neste estudo observou-se que as atividades recuperadas para todas as enzimas de interesse foram menores nas precipitações a 25°C, resultados que se mostraram de acordo com o efeito esperado em precipitação de proteína com etanol: desnaturação por solventes orgânicos aumenta com o aumento da temperatura. No entanto, as precipitações realizadas a 25°C com 90% de etanol (v/v) não apresentaram recuperações menores de 90% quando comparadas com precipitações realizadas a temperaturas menores, exceto para a atividade de FPase na qual houve diminuição nas recuperações a 15°C e a 25°C. Uma explicação para este fato pode ser uma cinética de nucleação muito rápida, pois a concentração de etanol sendo muito elevada se traduz, conseqüentemente, em uma supersaturação das proteínas também alta, que sabidamente resulta em alta taxa de nucleação. Esta cinética muito rápida remove quase que instantaneamente a enzima da fase líquida evitando, assim, a interação enzima-etanol que tem potencial de causar desnaturação proteica (SCHUBERT e FINN, 1981; YOSHIKAWA et al., 2012).

No entanto, a atividade recuperada de FPase foi muito afetada a 15°C e 25°C. Sabe-se que os complexos enzimáticos tendem a se desativar facilmente pela presença de solventes orgânicos devido a mudanças conformacionais não específicas da estrutura nativa (EIJISINK et al., 2004) e também houve um aumento da solubilidade proteica conforme o aumento de temperatura (ver Tabela 4.4.1 de balanços de massa).

Sabe-se por estudos anteriores que o fortalecimento das interações proteína-etanol pode levar a desnaturação irreversível e, a fim de conhecer em detalhe o efeito cinético na manutenção das atividades enzimáticas da fase precipitado é apresentado o seguinte estudo cinético através da aplicação das condições que apresentaram maiores recuperações.

4.5. Estudo cinético da precipitação proteica do fermentado de *T. harzianum* a 5°C em função da concentração de etanol

Mediante o estudo anterior foi possível conhecer as condições que propiciaram alta manutenção das atividades das enzimas de interesse. No entanto, apesar de que as condições mais favoráveis permitiram a recuperação completa de atividade de xilanase, apenas 80% de atividade FPAse inicial foi recuperada, mesmo tendo-se precipitado aproximadamente 96% da proteína do fermentado. Deste modo foram realizados novos estudos cinéticos a fim de avaliar se o complexo celulolítico é desativado em função do tempo. Para tal fixou-se duas variáveis que propiciaram altas recuperações nas precipitações anteriores—temperatura de 5°C e pH 5,0- e variou-se a concentração de etanol de 60% a 90% (v/v).

A variação da massa proteica característica para cada precipitado em função do tempo e a concentração de etanol pode ser observada na Figura 4.5.1. O comportamento das diferentes concentrações de etanol é similar: precipitação praticamente instantânea para todas as concentrações de etanol.

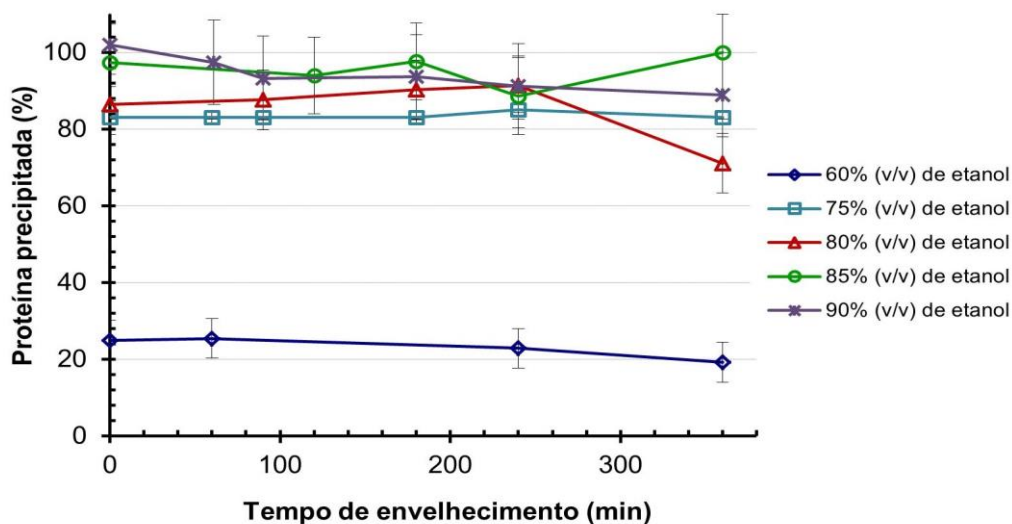


Figura 4.5.1. Cinética de precipitação proteica a 5°C e pH 5,0 do fermentado em função da concentração de etanol. Barras de erro são desvio padrão de experimentos em triplicata.

Além disso, tanto 85% como 90% (v/v) de etanol precipitaram mais de 90% da proteína presente no fermentado, enquanto 75% e 80% (v/v) de etanol precipitaram aproximadamente 85% da proteína inicial da alimentação e 60% (v/v) de etanol apenas precipitaram ao redor de 25% da proteína inicial. Não obstante, deve-se saber se uma separação de enzimas está ocorrendo ou se a desativação da atividade do complexo celulolítico pode ser evitada ajustando o tempo de incubação.

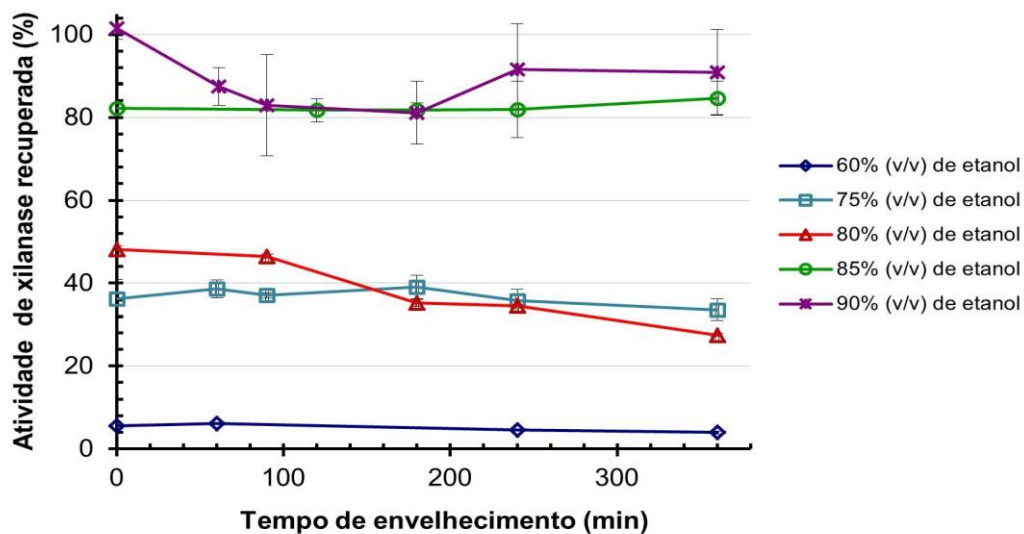


Figura 4.5.2. Cinética de precipitação de xilanase a 5°C e pH 5,0 do fermentado em função da concentração de etanol. Barras de erro são desvio padrão de experimentos em triplicata.

Os resultados mostrados na Figura 4.5.2 indicam que 90% de etanol apresenta recuperação completa da atividade de xilanase quando a separação do precipitado da fase líquida é feita imediatamente após a adição do etanol, enquanto 85% de etanol recupera pouco mais de 80% desta atividade inicial. Menores quantidades de etanol recuperaram menos de 50% da atividade inicial, como já foi mostrado no estudo anterior de precipitação. O comportamento cinético continuou não mostrando variação em termos de atividade, exceto para 90% e 80% de etanol.

No que se refere à atividade FPAse, pode-se observar na Figura 4.5.3 que a sua recuperação no precipitado aumenta conforme aumentou-se a concentração de etanol. Em termos cinéticos, a recuperação de atividade permaneceu praticamente constante para cada

concentração de etanol, exceto para 80% de etanol (v/v) na qual a atividade foi decaindo após 90 minutos de precipitação. Em termos da atividade do complexo celulásico (FPase) as concentrações de etanol 80%, 85% e 90% (v/v) asseguraram uma recuperação da atividade inicial em torno de 70% no tempo zero, e sendo 85% (v/v) a concentração de etanol que permitiu a recuperação máxima de atividade celulásica (75% aproximadamente).

Em termos de atividade específica, o coquetel enzimático inicialmente tinha 16,8 U/mg e 0,233 U/mg de atividade de xilanásica e FPásica, respectivamente. Após precipitação com 90% de etanol a 5°C e pH 5,0 estas atividades específicas das fases precipitadas foram de 17,6 U/mg e 0,080 U/mg, respectivamente.

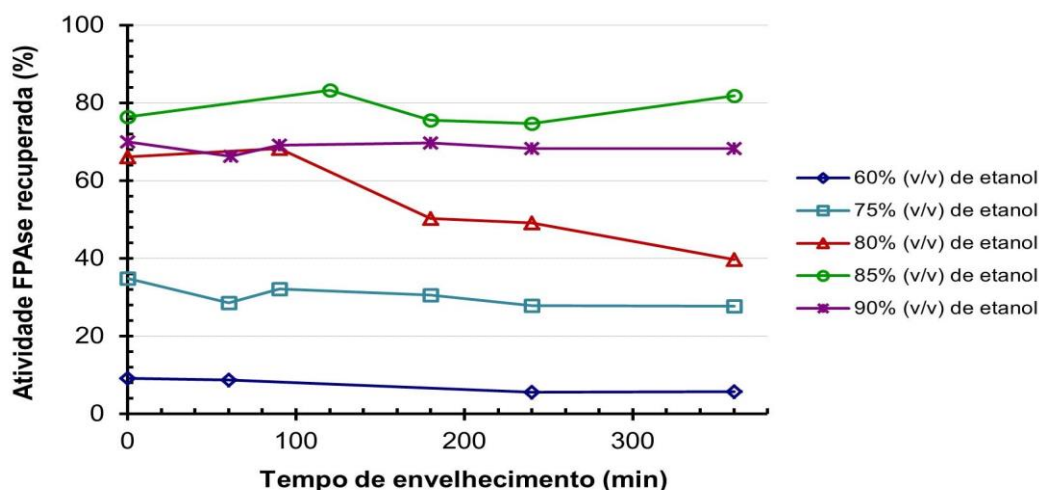


Figura 4.5.3. Cinética de precipitação de FPase a 5°C e pH 5,0 do fermentado em função da concentração de etanol.

Uma vez que a cinética indicou precipitação instantânea, compararam-se, para um tempo zero de envelhecimento, as recuperações de proteínas com as recuperações das duas atividades mais eficientemente precipitadas, a xilanásica e a celulásica (Figura 4.5.4). Conforme aumentou-se a concentração de etanol tanto a recuperação de proteína como das atividades hidrolíticas aumentaram. Com 90% de etanol a recuperação da atividade xilanásica foi de 100%, porém a recuperação da atividade FPase foi menos de 80% da inicial. Paralelamente, observou-se que o alto enriquecimento proteico não permitiu fracionamento das enzimas presentes no fermentado.

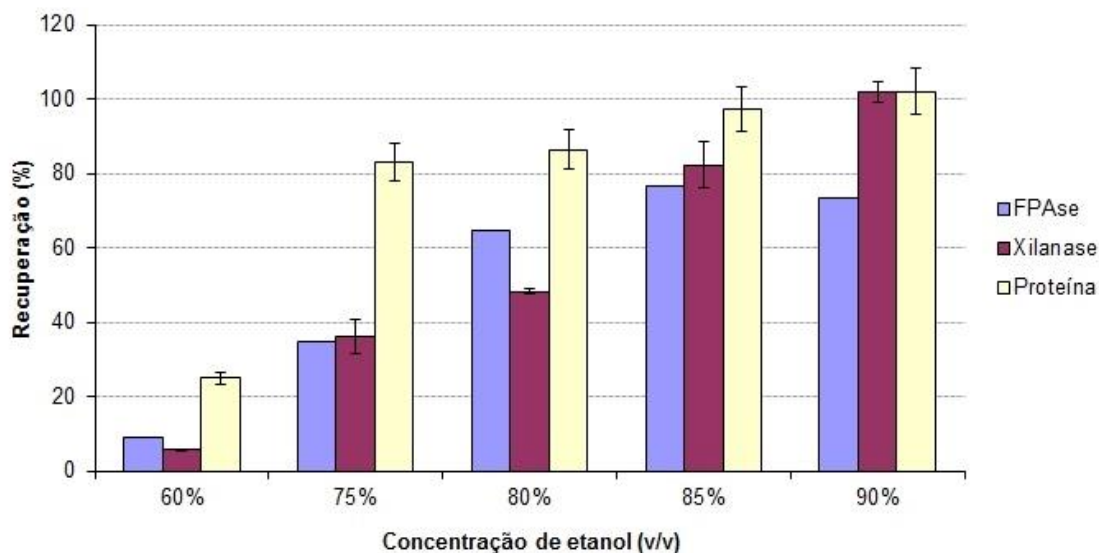


Figura 4.5.4. Efeito da concentração de etanol nas recuperações de proteína, atividade de xilanase e atividade FPase nas precipitações a 5°C e pH 5,0 com separação da fase precipitado imediatamente após adição de etanol. Barras de erro são desvio padrão de experimentos em triplicata.

Apesar da precipitação por etanol ter acontecido em detrimento da atividade catalítica do complexo de celulasas, as recuperações de atividade de xilanasas e celulasas conseguidas com 90% de etanol são altas quando comparados com recuperações de trabalhos anteriores apresentados na Tabela 2.2.

4.6. Análise de proteína por eletroforese SDS-PAGE

O precipitado com maior recuperação de proteína e atividades xilanásica e FPase, foi obtido com 90% (v/v) de etanol a 5°C e pH 5,0. O perfil proteico em amostras de fermentado e de precipitado formado sob estas condições foram analisadas qualitativamente como etapa final deste estudo através de SDS-PAGE.

Antes de dissolver as amostras em tampão de corrida eletroforética, foram realizadas diluições para que as duas amostras de fermentado e concentrado tivessem a mesma quantidade de proteína. Analisando a imagem do gel de poliacrilamida a 12% (Figura 4.6) da fração do fermentado e o precipitado obtido por adição de 90% de etanol, verificou-se que, as proteínas separadas do fermentado e do precipitado coincidiram em sua maioria,

sendo que, em média, o número de bandas proteicas apresentou-se maior entre a faixa de massa molecular 90 kDa e 35 kDa, além de revelar dois sinais expressivos com massa molecular em torno de 20 kDa e 12 kDa. Esta similaridade era esperada uma vez que não houve purificação com a precipitação.

A proteína presente na fase sobrenadante foi considerada nula devido a que não foi detectada mediante eletroforese SDS-PAGE com coloração por nitrato de prata, método geralmente utilizado para corar concentrações de proteína baixas (entre 0,1 e 1,0 mg/mL).

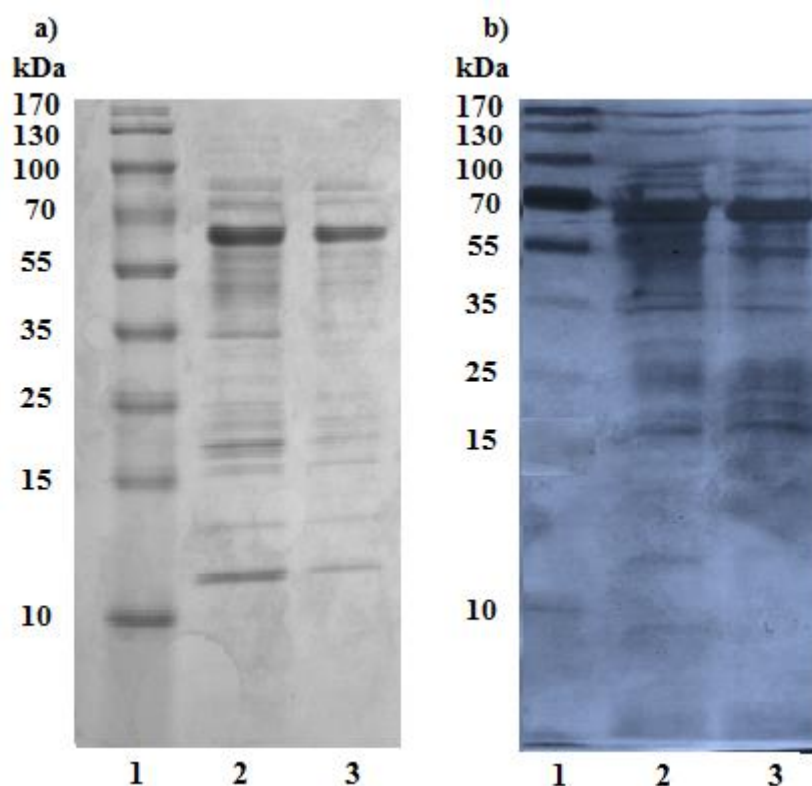


Figura 4.6. Eletroforese SDS-PAGE do fermentado de *T. harzianum* P49P11 e precipitado formado a 5°C, pH 5,0 e 90% (v/v) de etanol. a) Gel com coloração com azul de Coomassie e concentração proteica 0,2 mg/mL. b) Gel com coloração com nitrato de prata e concentração proteica 0,1 mg/mL. (1) Marcador de massa molecular (kDa); (2) fermentado; (3) precipitado.

Através de estudos precedentes é possível identificar algumas das bandas proteicas observadas, pois se sabe que as β -glicosidasas são as enzimas do complexo celulásico com maior massa molecular situada entre 85 e 75 kDa, sendo provável então que as primeiras

duas bandas protéicas de maior massa molecular correspondam a enzimas deste tipo. A banda proteica mais densa em torno de 60 kDa está entre a massa molecular das endoglucanases situada entre 78 kDa e 48 kDa (LIMA, 2010). Massas moleculares menores a 30 kDa têm sido observadas durante as purificações de xilanases e neste estudo pode-se visualizar bandas proteicas em torno de 20 kDa e 12 kDa que se ajustam a este tipo de enzimas (TAN et al., 1985), além de considerar a existência das exoglucanases e outras proteínas extracelulares e de polipeptídios de baixa massa molecular.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

Com base nos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste estudo, pode-se concluir principalmente que a adição de 90% de etanol ao fermentado de *T. harzianum* a 5°C leva a precipitação instantânea e completa das proteínas, garantindo a recuperação completa da atividade xilanásica inicial, enquanto apenas 80% da atividade celulásica do fermentado foi recuperada sob estas condições de precipitação. Assim, conclui-se que o etanol se mostrou um agente concentrador de bom potencial para a indústria de etanol 2G, principalmente se associarmos sua característica de produto da própria biorrefinaria, de ser um produto facilmente reciclável por destilação e possibilitar uma ótima recuperação de xilanase com recuperação substancial de celulases.

A fixação de uma faixa de concentrações de etanol, na qual foi obtida uma alta eficiência da precipitação entre 60% e 90% (v/v), foi determinada para o desenvolvimento da metodologia experimental das precipitações.

Aumentos nos valores de pH e temperatura afetaram principalmente a manutenção das atividades do complexo de celulases. A atividade xilanásica não apresentou diminuições nos precipitados obtidos com 90% de etanol nas faixas de temperatura e pH testadas, e nenhum dos precipitados formados com 60% de etanol mostrou atividade xilanásica maior do que 5% e os precipitados formados com 75% de etanol somente apresentaram recuperações menores de 40% quando foram incubados a 25°C.

À medida que foi aumentado o valor de pH do fermentado houve uma queda da atividade do complexo de celulases principalmente devido à diminuições da atividade da enzima endoglucanase.

O aumento de temperatura durante as precipitações afetou negativamente tanto à atividade de endoglucanase quanto a atividade de β -glicosidase.

A atividade da β -glicosidase na fase sobrenadante foi considerável (61%) somente para precipitações realizadas com 60% de etanol a 5°C, enquanto a atividade da endoglucanase na fase sobrenadante permitiu completar os balanços de atividade com todas as concentrações de etanol testadas a 5°C e 15°C em pH 5,0.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Testar precipitações com éteres de celulose (exemplo, hidroxipropilmetilcelulose) ou algum outro co-precipitante derivado da celulose e insolúvel em altas concentrações de etanol. Um co-precipitante derivado da celulose pode interagir com o domínio de ligação à celulose destas enzimas devido à similaridade estrutural, reduzindo, assim, os câmbios na conformação das enzimas após precipitação e reduzindo também a concentração de etanol para uma alta recuperação.

Avaliar a estabilidade térmica dos precipitados proteicos obtidos neste estudo.

Testar a hidrólise de bagaço de cana usando os precipitados enzimáticos deste estudo e comparar com a hidrólise realizada a partir do coquetel enzimático de *T. harzianum* P49P11 não processado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADNEY, B., BAKER, J. Measurement of cellulose activities. Chemical analysis and testing task laboratory analytical procedure. National Renewable Energy Laboratory (NREL), LAP-006, 1996.
- AGARWAL, R. GUPTA, M.N. Sequential precipitation with reversible soluble-insoluble polymers as a bioseparation strategy: Purification of β -glucosidase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Protein Expression and Purification*, 7, p. 294-298, 1996.
- ARCHER, D. B., WOOD, D. A. Fungal exoenzymes. Em: Gow, N. A. R., Gadd, M. G. Ed. The growing fungus. Chapman & Hall, p. 473, 1994.
- AVELINO, S., AZZONI, A. R., ROSA, P. V., MIRANDA, E. A., SANTANDA, C. C. Recovery of cellulase by HPMC-salt precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 77-79, 1999.
- BADGER, P. C. Em Trends in new crops and new uses, J. Whipkey, Ed. ASHS. Press: Alexandria, 2002.
- BARTA, Z., KOVACS, K., RECZEY, K., ZACCHI, G. Process design and economics of on-site cellulase production on various carbon sources in a softwood-based ethanol plant. *Enzyme Research* (2010), doi:10.4061/2010/734182
- BELL, D. J., HOARE, M., DUNNILL, P. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. Downstream Processing, Fiechter, A., Springer-Verlag, Berlin, p. 1-59, 1983.
- BERGHEM, L. E. R., PETTERSSON, L. G. Mechanism of enzymatic cellulose degradation - Isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry*, 46, 295-305, 1974.
- BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15, p. 583-620, 1997.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid, sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, p. 248-254, 1976.
- CANILHA, L., CHANDEL, A., MILESSI, T. S. S., ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C., FELIPE, M.G.A., SILVA, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2012), doi:10.1155/2012/989572.

- CARPITA, N., GIBEAUT, D. Structural models of primary cell walls in flowering plants> consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3, p. 1-30, 1993.
- CASTRO, A. M., PEDRO, K. C., CRUZ, J. C., FERREIRA, M. C., LEITE, S. G., PEREIRA, N. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 (7), p. 2111- 2122, 2010.
- CHAUVE, M., MATHI, H., HUC, D., CASANAVE, D., MONOT, F., FERREIRA, N.L. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*. 3 (3), 2010.
- CHRISTOPHER, G. K., PHIPPS, A. G., GRAY, R. J., Temperature-dependent solubility of selected proteins. *Journal of Crystal Growth*, 191 (4), p. 820-826, 1998.
- COLUSSI, F., SERPA, V., DELABONA, P. S., MANZINE, L. R., VOLTATÓDIO, M. L., ALVES, R., MELLO, B. L., PEREIRA, JR. N., FARINAS, C. S., GOLUBEV, A. M., SANTOS, M. A., POLIKARPOV, I. Purification, biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, p. 808-817, 2011.
- CORTEZ, E.V., PESSÔa, Jr. A. Xylanase and b-xylosidase separation by fractional precipitation. *Process Biochemistry*, 35, 277, 1999.
- CHUNDAWAR, S. P., BEACKMAN, G. T., HIMMEL. M. E., DALE. B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review in Chemical Biomolecular Engineering*, vol. 2, p. 121-145, 2011.
- CUTLER, P. Protein Purification Protocols, 2^a ed., Humana Press, Totowa, New Jersey, p. 101-124, 2004.
- CHYLENSKI, P., FELBY, CLAUS., HAVEN, M., GAMA, MIGUEL., SELIG, M. J., Precipitation of *Trichoderma reesei* commercial cellulose preparations under standard enzymatic hydrolysis conditions for lignocelluloses. *Biotechnology Letters*, 34, p. 1475-1482, 2012.
- DALAL, S., SHARMA, A., GUPTA, M.N. A multipurpose immobilized biocatalyst with peptinase, xylanase and cellulose activities. *Chemistry Central Journal*, 16, p. 1-5, 2007.
- DELABONA, P. FARINAS, C. SILVA, M. AZZONI, S. PRADELLA. J. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase -production. *Bioresource Technology*, 107, p. 517-521, 2012.
- DIVNE, C., STAHLBERG, J., REINIKAINEN, T.RUOHONEN, L., PETTERSSON, G., KNOWLES, J., TEERI, T., JONES, T. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolases I from *Trichoderma reesei*, vol, 265, 22, p. 524-528, 1994.
- DWYER, D. S., BRADLEY, R. J. Chemical properties of alcohols and their protein binding sites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, p. 265-275, 2000.
- EHSANI, N., NYSTRÖM, M., OJAMO, H., SIIKA-AHO, M. Separation of enzymes produced by ; *Trichoderma reesie* with hydrophobic ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 31, 3, p. 253-263, 1996.

- EIJSINK, V. G. H., BJOR, A., GASEIDNES, S., SIREVAG, R., SYNSTAD, B., van der BURG, B., VRIEND, G. Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology*, 113, p. 105-120, 2004.
- FARINAS, C.S., SCARPELINI, L.M., MIRANDA, E.A., BERTUCCI, V. Evaluation of operational parameters on the precipitation of *Aspergillus niger* produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, p. 17-26, 2011.
- GERBER, P. J., HEITMANN, J.A., JOYCE, T.W., BUCHERT, J., SIIKA-AHO, M. Adsorption of hemicellulases onto bleached kraft fibers. *Journal of Biotechnology*, 67, p. 67-75, 1999.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Applied Chemistry*, 59, p. 257-268, 1987.
- GÍRIO, F.M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L.C., MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101, p. 4775-4800, 2010.
- GOLUNSKI, S., ASTOLFI, V., CARNIEL, N., OLIVEIRA, D., LUCCIO, M. D., MAZUTTI, M., TREICHEL, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*, 78, p. 261-265, 2011.
- HENRISSAT, B. DRIGUEZS, H. VIET, C. SCHÜLEIN, M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nature Biotechnology*, 3, p. 722-726, 1985.
- HERPÖE, G., MARGEOT, A., DOLLA, A., JAN, G., MOLLÉ, D., LIGNON, S., MATHIS, H., SIGOILLOT, J., MONOT, F., ASTHER, M. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnology Biofuels*, 1, 18, 2008.
- HERSKOVITS, T., GADEGBEKU, B., JAILLET, H. On the structural stability and solvent denaturation of proteins: I. Denaturation by the alcohols and glycols. *Journal of Biological Chemistry*, 245 (10), p.2588-2598, 1970.
- HOWARD, R. L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENSBURG, E. L., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), p. 601-619, 2003.
- INOUE, H., TIMASHEFF, S. N. Preferential and absolute interactions of solvent components with proteins in mixed solvent systems. *Biopolymers*, 11(4), p. 737-743, 1972.
- JABBAR, A., RASHID, M.H., JAVED, M.R., PERVEEN, R. MALANA, M.A. Kinetics and thermodynamics of a novel endoglucanase (CMCase) from *Gymnoascus citrine* produced under solid-state condition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 515, 2008.
- JUHÁSZ, T., SZENGYEL, Z., RÉCZEY, K., SIIKA-AHO, M., VIIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40, p. 3519-3525, 2005.
- KARMAKAR, M., RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, 6, p. 41-53, 2011.
- KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., JULSON, J. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated in high shear bioreactor. ASABE Annual international meeting. Paper No. 084114, Rhode Island, June 29-July 2, 2008.

- KASAI, N., KONISHI, A., IWAI, K., MAEDA, G.; J. Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (17), 6336, 2006.
- KNUTSEN, J. DAVIS, R. Cellulase retention and sugar removal by membrane ultrafiltration during lignocellulosic biomass hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113, p. 585-599, 2004.
- KUMAR, R. SINGH, S. SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 91 (35), p. 377-391, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature*, 227, p. 680-685, 1970.
- LI, Y.H., YIN, Q.Y., DING, M., ZHAO, F.K., Purification, characterization and molecular cloning of novel endo-beta-1,4-glucanase AC-EG65 from the mollusc *Ampullaria crosseana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry & Molecular Biology*, 153, 149, 2009.
- LIBERATO, M. V., GENEROSO, W. C., MALAGO, JR. W., HENRIQUE-SILVA, F., POPIKARPOV, I. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of endoglucanase III from *Trichoderma harzianum*. *Acta Crystallographic, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68 (3), p. 306-309, 2012.
- LIMA, V A. Produção de celulasas por *Trichoderma harzianum* e aplicação na hidrólise do bagaço de cana de açúcar pré-tratado. Rio de Janeiro: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal de Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado)
- LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy, *Annual Review of Energy and the Environment*, 21, 403-435, 1996.
- LYND, L.R., WEIMER, P., VAN ZYL, W., PRETORIUS, I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, *Microbial Molecular Biology Reviews*, 66, 506, 2002.
- MAEDA, R. N., SERPA, V., ROCHA, V. A. L., MESQUITA, R. A., ANNA, L. M., CASTRO, A. M., DRIEMEIER, C. E., PEREIRA, N., POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, doi:10.1016/j.procbio.2011.01022.
- MANDELS, M. ANDREOTTI, R. ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnology and Bioengineering Symposiums*, p. 21-33, 1976.
- MANDELS, M., WEBBER, J. Production of cellulases. *Advances in Chemical Series*, 95, p. 391-414, 1969.
- MEDEIROS, R. G., SILVA, Jr. F., SALLES, B. C., ESTELLES, R. S., FILHO, E. The performance of fungal xylan-degrading enzyme preparations in elemental chlorine-free bleaching for Eucalyptus pulpl. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, p; 204-206, 2002.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 3 (31), p. 426-428. 1959.

- MISHIMA, D., TATEDA, M., IKE, M., FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification process. *Bioresource Technology*, vol. 6, 97, p. 2166-2172, 2006.
- MORAES, ÂNGELA., PIRES, ELISABETH., CASTILHO, LEDA. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. Roca, São Paulo, p. 295-298, 2008.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity, *Analytical Biochemistry*, 117, p. 307-310, 1981.
- NINAWA, S., KAPPOR, M., KUHAD, R.C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32, *Bioresource Technology*, 99, 1252, 2008.
- NOBUYUKI, R., SERPA, V., LIMA, V. A ., ALVES, R., MELO, L. M., CASTRO, A. M., DRIEMEIER, C. E., PEREIRA, N. Jr., POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, 46 (5), p.1196-1201, 2011.
- PERCIVAL, Y., HIMMEL, M., MIELENZ, J. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24, p. 452-481, 2006.
- PESSÔA, A. Jr., KILIKIAN, B.V. Purificação de Produtos Biotecnológicos, 1ª Ed. Manole, São Paulo, 2005.
- PESSÔA, P. A., HIRATA, G. M., WATANABE, E., MIRANDA, A. E. Downstream processing and product recovery. Reading: Elsevier B.V, 2011. Cap. 2.46: Precipitation and Crystallization, p. 651-663.
- PIOVESAN, B. M. P., ALVAREZ, T. M., DELABONA, P. S., DILLON, A. J. P., SQUINA, F. M., PRADELLA, J. G. C. Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. *BioEnergy Research*, 6 (3), 1052, 2013
- PRATES, E., STANKOVIC, I., SILVEIRA, R., LIBERATO, M., HENRIQUE-SILVA, F., PEREIRA, Jr., POLIKARPOV, I., SKAF, M. X-ray structure and molecular dynamics simulations of endoglucanase 3 from *Trichoderma harzianum*: structural organization and substrat recognition by endoglucanases that lack cellulose binding module, *PLOS ONE*, 8 (3), p. 1-11, 2013.
- PTASINSKI, K. J., PRINS, M. J., PIERIK, A. Exergetic evaluation of biomass gasification. *Energy*, 32, p. 568-574, 2007.
- QI, BENKUN., CHEN, XIANGRONG., YINHUA WAN, YI SU. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresource Technology*, 102, p. 2881-2889, 2011.
- QUEIROZ, J. A., TOMAZ, C. T., CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, 87, p.143-159, 2001.
- RAGAUSSKAS, A. J. WILLIAMS, C. K. DAVISON, B. H. BRITOVSEK, G. CAIRNEY, J. ECKERT, C. A. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 9, 311-484, 2006.
- RAMOS, L. P., SADDLER, J. N. Bioconversion of wood residues: mechanisms involved in pretreating and hydrolyzing lignocellulosic materials. Em Enzymatic conversion of biomass for fuels production. Himmel, M E., Baker, J. O., Overend, R. P. Washington: American chemical society, Symposium series 566, p. 325-341, 1994.

- RENARD, D., LEFEBVRE, J., ROBERT, P., LLAMAS, G., DUFOUR, E. Structural investigation of β -lactoglobulin in water-ethanol solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, p. 35-44, 1999.
- RENSBURG, J., ABOTSI, E., Howard, R., Howard, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(1), p. 602-619, 2003.
- ROBERT, P., LAVENANT, L., RENARD, D. Infrared Two-dimensional correlation and principal component analyses applied to β -lactoglobulin aggregation in water-ethanol solution. *Applied Spectroscopy*, 56 (9), p. 1180-1185, 2002.
- ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., OLIVEIRA, B. R., OLIVARES, E. G., ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugar cane bagasse for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 35, 274-279, 2012.
- ROSEIRO, J.C. CONCEIÇÃO, A.C., AMARAL-COLLAÇO, M.T. Membrane concentration of fungal cellulases. *Bioresource Technology*, 43, p. 155-160, 1993.
- ROUVINEN, J. BERGFORS, T. TEERI, T. KNOWLES, J. JONES, T. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*, *Science*, 249 (4967), p. 380-386, 1990.
- RYU, D. D., MANDELS, MARY. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbiology Technology*, 2, p. 91-102, 1980.
- SAHA, BADAL. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, 39, p. 1871-1876, 2004.
- SASHI, P., YASIN, U. M., BHUYAN, A. K. Unfolding action of alcohols on a highly negatively charged state of cytochrome c. *Biochemistry*, ACS Publication, 51, 3273-3283, 2012.
- SCHMID, KATJA CHRISTINE. Spray drying of protein precipitates and Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90. Faculdade de Química e Farmácia, Universidade Ludwig-Maximilians, 2011. p. 3. Tese (Doutorado em Farmácia, Tecnologia Farmacêutica e Biofarmacêutica).
- SCHUBERT, P. F., FINN, R. K. Alcohol precipitations of proteins: The relationship of denaturation and precipitation of catalase. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 2569-2590, 1981.
- SCOPES, R. K. Proteins and Enzymes. New York: Springer-Verlag, 2002, p. 115-412.
- SERPA, V. I. Produção e caracterização de proteínas do complexo celulolítico de *Trichoderma harzianum* e *T. reesei*, envolvidas na hidrólise enzimática de biomassa. São Carlos: Instituto de Física, USP, 2012, P. 102. Tese de doutorado.
- SHEWALE, J.G. β -Glucosidase: its role in cellulose synthesis and hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biochemistry*, 14, p. 435-444, 1982.
- SIDHU, M. S., KALRA, M. K., SANDHU, D. K. Purification and characterization of cellulolytic enzymes from *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiology*, 31, p. 293-302, 1985.
- SILVA, L., PESSÔA FILHO, P., MIRANDA, E. A. Evaluation of the effect of ammonium carbamate on the stability of proteins. *Journal of Chemistry Technology Biotechnology*, 85, p. 962-967, 2010.

- SILVEIRA, F. P. Q., MELO, I. S., FILHO, E. X. F. Carbohydrate hydrolysing enzyme activity production by solid-state cultures of *Trichoderma harzianum* strains. *Reviews in Biochemistry*, 28, p. 152-156, 1997.
- SUBRAMANIYAN, S., PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular Biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), p. 33-46.
- SUKUMARAN, R., SINGHANIA, R., PANDEY, A. Microbial cellulases – Production, application and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, vol. 64, p. 832-844, 2005.
- SUKUMARAN, R., SINGHANIA, R., MATHEW, G., PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulase saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*. 34 , p. 421-424, 2009.
- TAN, L. U. L. WONG, K. K. Y. & SADDLER, J. N. Functional characteristics of two D-xylanases purified from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbiology Technology*, 7, 431-436, 1985.
- TAN, L. U., YU, E. K., LOUIS-SEIZE, G., SADDLER, J. L. Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulose-free β -1,4-D-xylanase of high specific activity. *Bioengineering*, 30, p. 96-100, 1987.
- TEERI, T., JONES, A., KRAULIS, P., ROUVINEN, J., PENTILLÄ, M., HARKKI, A., NEVALAINEN, H., VANHANEN, S., SALOHEIMO, M. E., KNOWLES, J. *Trichoderma reesei* 73 cellulases: biochemistry, genetics, physiology and applications, Ed. Kubicek et al., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 10, p. 156-167, 1990.
- TENKANEN, M., BUCHERT, J., VIKARI, L. Binding of hemicellulases on isolated polysaccharides substrates. *Enzyme and Microbiology Technology*, 17, p. 499-505, 1995.
- THRANE, C., TRONSMO, A., FUNCK, D. J. Endo-1,3- β -glucanase and cellulose from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 103, p. 331-344, 1997.
- TIMASHEFF, S., Protein-solvent interactions and protein conformation. *Accounts of Chemical Research*, 3(2), p. 62-68, 1970.
- TU, M., CHANDRA, R., SADDLER, J. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology Progress*, 23, p. 398-406, 2007.
- TÖRRÖNEN, A., HARKKI, A., ROUVINEN, J. Three-dimensional structure of endo-1,4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. *The EMBO Journal*, 13 (11), p. 2493-2501, 1994.
- TU, M., CHANDRA, R., SADDLER, J. Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine. *Biotechnology Progress*. 23, p. 1130-1137, 2007.
- RUEGGER, M.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de Fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Review. Brazilian Journal of Botany*. 27 (2), p. 205-211, 2004.
- VAN OSS, C. J. On the mechanism of the cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation. *Journal of Protein Chemistry*. 8 (5), p. 661-668, 1989.

- VIKSO-NIELSEN, A. Recent development in enzymes for biomass hydrolysis. Em: Maj, M., Kirsch, N, editors. First European workshop on biotechnology for lignocelluloses biorefineries, Forest & Landscape Denmark, University of Copenhagen, Copenhagen, March 27-28, 2008.
- VINZANT, T. B., ADNEY, W. S., DECKER, S. R., BAKER, J. O., KINTER, M. T., SHERMAN, N. E., FOX, J. W., HIMMEL, M. E. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulose preparation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 99, p-91-93, 2001.
- WANG, J., LU, Z., SCHIFFER, H., LIU, J., CUI, Z. Purification of cellulase using ultrafiltration. *Journal of Biotechnology*, Special abstracts, 150S, S388, 2010.
- WATANABE, E. O., PESSÔA, F. P., MIRANDA, E. A., MOHAMED, R. S. Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin. *Biochemistry Engineering Journal*, 30 (2), p. 124-129, 2006.
- WONG, K. K. Y. SADDLER, J. M. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. In *Xylans and Xylanases*, ed. J. Visser, G. Beldman, M. A. Kusters-van Someren e A. G. J. Voragen, p. 171-186. Elsevier Science, Amsterdam, 1992.
- WONGANU, B., POOTANAKIT, K., BOONYAPAKRON, K., CHAMPREDA, V., TANAPONGPIPAT, S., EURWILAICHITR, L. Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia Pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 46, 143, 2008.
- WOOD, T. M E MCCRAE, S. I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Advances in Chemistry Series*, 181, p. 181-209, 1979.
- WOOD, T. M., BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities, Em: W. A. Wood and S. T. Kellog Ed. *Methods in enzymology*, 160, Academic Press, San Diego, CA, p. 87-116, 1988.
- WOODWARD, J., WISEMAN, A. Fungal and other β -glucosidases: their properties and applications, *Enzyme and Microbial Technology*, 4, p. 73-79, 1983.
- YAO, S. J., GUAN, Y. X., HE, W. Z., QI, X. M., ZHU, Z. Q. Activities of several enzymes in ethanol + water at elevated pressure of carbon dioxide. *Journal of Chemistry Engineering Data*, 49, p. 1333-1339, 2012.
- YOSHIKAWA, H., HIRANO, A., ARAKAWA, T., SHIRAKI, K. Mechanistic insights into protein precipitation by ethanol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, p. 865-871, 2012.
- ZHANG, Y., HIMMEL M., MIELENZ J. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24, p. 452-481, 2006.
- ZHOU, J., WANG, Y., ZHUANG, Y., ZHANG, S., YIN, P. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T100-14. *Bioresource Technology*, 99, p. 6826-6833, 2008.

APÊNDICE A

A.1. Cinética de precipitação do fermentado de *T. harzianum* P49P11 a 5 °C para 60% v/v de etanol.

Tempo (horas)	0	3	6	16
Massa da proteína (µg)	157,6	215,3	271,8	285,6
no precipitado	(30,9%)	(42,2%)	(53,3%)	(56,0%)
Massa da proteína (µg)	330,5	282,5	201,0	205,3
no sobrenadante	(64,8%)	(55,4%)	(39,4%)	(40,3%)
Recuperação total de proteína (%)*	95,7	97,6	92,7	96,2

*A massa inicial de proteína foi 510 µg.

A.2. Quantificação da proteína total obtida após precipitações do fermentado de *T. harzianum* P49P11 com diferentes concentrações de etanol a 5°C durante 6 h.

% Etanol (v/v)	33,3	50,0	60,0	66,6	71,4	75,0	80,0
Massa de proteína (µg) no precipitado*	155 (19,9%)	166 (21,4%)	349 (44,9%)	568 (73,0%)	568 (73,0%)	595 (76,6%)	618 (79,5%)
Massa de proteína (µg) no sobrenadante*	620 (79,7%)	579 (74,3%)	432 (55,6%)	207 (26,6%)	173 (22,3%)	179 (23,0%)	138 (17,7%)
Recuperação total (%)	99,6	95,7	100	99,6	95,3	99,6	96,2

*Massa inicial de proteína: 778 µg.

APÊNDICE B

B.1. Balanços de massa proteica após precipitação com etanol a 5°C em função do pH do fermentado e a concentração de etanol.

pH do fermentado	% Etanol (v/v)	Massa proteica (mg)	Proteína na fase precipitado* (mg)	Proteína na fase sobrenadante* (mg)	Recuperação total (mg)
5,0	60	14,6	36,4% ± 4,9 (5,31)	57,6% ± 3,7 (8,41)	93,8% (13,7)
	75	9,12	81,7% ± 1,1 (7,45)	15,1% ± 2,7 (1,38)	96,8% (8,83)
	90	3,65	94,2% ± 2,4 (3,44)	10,6% ± 4,2 (0,39)	105% (3,83)
6,5	60	12,2	30,0% ± 2,7 (3,66)	60,0% ± 7,4 (7,32)	90,0% (11,0)
	75	9,12	80,1% ± 3,2 (7,30)	19,1% ± 3,3 (1,74)	99,2% (9,04)
	90	3,65	95,7% ± 3,6 (3,49)	6,50% ± 0,5 (0,24)	102% (3,73)
8,0	60	12,2	36,4% ± 2,3 (4,44)	44,3% ± 5,4 (5,40)	80,7% (9,84)
	75	7,61	75,2% ± 1,9 (5,72)	23,9% ± 5,9 (1,82)	99,1% (7,54)
	90	3,04	93,9% ± 1,9 (2,85)	6,70% ± 2,2 (0,20)	101% (3,05)

*Desvio padrão médio = 1,8%.

B.2. Balanços de massa proteica após precipitação com etanol a 15°C em função do pH do fermentado e a concentração de etanol.

pH do fermentado	% Etanol (v/v)	Massa proteica (mg)	Proteína na fase precipitado* (mg)	Proteína na fase sobrenadante* (mg)	Recuperação total (mg)
5,0	60	11,9	31,2% ± 4,7 (3,70)	73,2% ± 1,4 (8,71)	104% (12,4)
	75	7,41	76,1% ± 5,4 (5,64)	10,6% ± 3,3 (0,79)	86,7% (6,43)
	90	2,97	85,5% ± 1,9 (2,54)	13,7% ± 6,1 (0,41)	99,2% (2,95)
6,5	60	11,9	34,9% ± 7,9 (4,15)	53,8% ± 7,3 (6,40)	88,8% (10,6)
	75	7,41	84,0% ± 16 (6,22)	16,5% ± 7,1 (1,22)	100% (7,44)
	90	3,65	90,1% ± 14 (3,29)	10,8% ± 1,8 (0,39)	101% (3,68)
8,0	60	11,6	33,7% ± 10 (3,90)	50,7% ± 1,9 (5,88)	84,3% (9,78)
	75	6,42	58,7% ± 13 (3,77)	46,6% ± 4,6 (2,99)	105% (6,76)
	90	5,14	83,7% ± 1,1 (4,30)	12,8% ± 3,2 (0,66)	96,5% (4,96)

*Desvio padrão médio = 4,6%.

B.3. Balanços de massa proteica após precipitação com etanol a 25°C em função do pH do fermentado e a concentração de etanol.

pH do fermentado	% Etanol (v/v)	Massa proteica (mg)	Proteína na fase precipitado* (mg)	Proteína na fase sobrenadante (mg)*	Recuperação total (mg)
5,0	60	16,4	36,3% ± 4,5 (5,95)	48,7% ± 1,7 (7,99)	85,0% (13,9)
	75	10,2	63,7% ± 1,8 (6,50)	20,6% ± 6,9 (2,10)	84,3% (8,60)
	90	4,09	85,2% ± 2,2 (3,48)	13,5% ± 5,1 (0,55)	98,6% (4,03)
6,5	60	14,6	34,4% ± 1,0 (5,02)	51,4% ± 9,4 (7,50)	85,8% (12,5)
	75	9,11	59,3% ± 4,6 (5,40)	34,8% ± 4,0 (3,17)	94,1% (8,57)
	90	3,65	71,4% ± 2,4 (2,61)	21,5% ± 9,7 (0,78)	93,0% (3,39)
8,0	60	16,4	25,4% ± 1,3 (4,16)	48,7% ± 5,2 (7,98)	74,0% (12,1)
	75	7,61	51,2% ± 4,8 (3,90)	43,4% ± 6,8 (3,30)	94,6% (7,20)
	90	3,04	73,0% ± 10 (2,22)	27,3% ± 2,6 (0,83)	100% (3,05)

*Desvio padrão médio = 2,9%.

B.4. Recuperação da atividade de xilanase por precipitação com etanol a 5°C.

pH do fermentado (Controle de atividade)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade do sobrenadante (%)
5,0 (17,6)	60	0,046	0,009	2,28	3,47
	75	0,501	0,067	45,0	3,90
	90	0,434	0,126	93,6	6,40
6,5 (16,0)	60	0,093	0,025	1,92	7,95
	75	0,668	0,092	48,7	10,7
	90	0,463	0,125	97,4	2,60
8,0 (16,8)	60	0,041	0,009	1,89	4,15
	75	0,492	0,086	54,7	2,80
	90	0,440	0,154	98,6	1,40

*Atividade de xilanase no controle é dada em U/mg.

B.5. Recuperação da atividade de xilanase após precipitação com etanol a 15°C.

pH do fermentado (U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade do sobrenadante (%)
5,0 (17,6)	60	0,046	0,012	2,51	5,41
	75	0,501	0,089	43,3	1,10
	90	0,449	0,177	96,8	1,40
6,5 (16,0)	60	0,093	0,022	4,93	7,27
	75	0,710	0,114	60,0	2,40
	90	0,463	0,141	97,8	3,20
8,0 (16,2)	60	0,041	0,010	1,79	5,48
	75	0,492	0,130	41,0	3,70
	90	0,440	0,102	105	6,00

*Atividade de xilanase no controle.

B.6. Recuperação da atividade de xilanase após precipitação com etanol a 25°C.

pH do fermentado (U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade do sobrenadante (%)
5,0 (15,7)	60	0,030	0,005	1,40	3,60
	75	0,051	0,008	3,78	3,08
	90	0,500	0,144	93,6	1,20
6,5 (16,5)	60	0,033	0,066	1,68	3,03
	75	0,007	0,013	5,68	0,89
	90	0,495	0,190	100	2,30
8,0 (17,1)	60	0,033	0,008	1,68	2,55
	75	0,065	0,017	5,26	0,63
	90	0,560	0,252	102	10,0

*Atividade de xilanase no controle.

B.7. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 5°C em pH do fermentado igual a 5,0.

Hidrolase (U/ml-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade do sobrenadante (%)
β-Glicosidase (0,464-0,031)	60	0,066	0,012	17,8	61,0
	75	0,151	0,020	65,2	1,80
	90	0,102	0,030	110	2,00
Endoglucanase (0,426-0,023)	60	0,114	0,021	33,5	65,7
	75	0,154	0,021	72,4	28,6
	90	0,090	0,026	106	11,0
Celulase** (2,21-0,341)	60	0,597	0,112	12,0	-
	75	2,399	0,322	77,2	-
	90	0,989	0,288	79,6	-

*Atividade de cada celulase no controle.

**Atividade da celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.8. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 5°C em pH do fermentado igual a 6,5.

Hidrolase (U/mL-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade total (%)
β-Glicosidase (0,464-0,031)	60	0,011	0,003	15,6	59,1
	75	0,153	0,021	65,8	17,0
	90	0,108	0,031	115	1,00
Endoglucanase (0,426-0,023)	60	0,070	0,020	19,9	59,8
	75	0,134	0,018	58,8	15,3
	90	0,090	0,026	99,6	10,4
Celulase** (2,78-0,372)	60	0,485	0,133	8,95	-
	75	1,968	0,270	58,0	-
	90	0,821	0,235	60,5	-

*Atividade de cada celulase no controle.

**Atividade da celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.9. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 5°C em pH do fermentado igual a 8,0.

Hidrolase (U/mL-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade do sobrenadante (%)
β-Glicosidase (0,464-0,036)	60	0,058	0,013	15,7	58,0
	75	0,064	0,011	27,9	5,60
	90	0,133	0,047	96,0	0,00
Endoglucanase (0,426-0,028)	60	0,040	0,009	10,9	27,7
	75	0,092	0,016	37,7	17,6
	90	0,084	0,029	99,0	10,0
Celulase** (2,21-0,408)	60	0,292	0,066	5,87	-
	75	0,535	0,093	20,4	-
	90	0,398	0,140	47,0	-

*Atividade de cada hidrolase no controle.

**Atividade da celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.10. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 15°C em pH do fermentado igual a 5,0.

Hidrolase (U/mL-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade total (%)
β-Glicosidase (0,297-0,020)	60	0,088	0,024	30,0	80,0
	75	0,066	0,012	62,4	1,30
	90	0,056	0,022	101	0,10
Endoglucanase (0,426-0,029)	60	0,102	0,028	31,0	63,7
	75	0,264	0,047	75,8	30,0
	90	0,116	0,046	118	11,0
Celulase** (2,12-0,278)	60	0,104	0,028	3,15	-
	75	1,585	0,281	76,9	-
	90	0,899	0,354	54,7	-

*Atividade de cada celulase no controle.

**Atividade de celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.11. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 15°C em pH do fermentado igual a 6,5.

Hidrolase (U/mL-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade total (%)
β-Glicosidase (0,443-0,030)	60	0,083	0,020	34,6	64,7
	75	0,176	0,028	79,4	0,90
	90	0,056	0,017	108	0,08
Endoglucanase (0,426-0,029)	60	0,109	0,026	32,2	61,5
	75	0,338	0,054	52,9	17,0
	90	0,122	0,037	124	12,0
Celulase** (2,01-0,330)	60	0,057	0,014	1,72	-
	75	1,240	0,200	60,2	-
	90	0,280	0,085	34,0	-

*Atividade de cada celulase no controle.

**Atividade de celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.12. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 15°C em pH do fermentado igual 8,0.

Hidrolase (U/mL-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade total (%)
β-Glicosidase (0,443-0,034)	60	0,076	0,019	31,7	55,1
	75	0,088	0,023	54,5	2,30
	90	0,045	0,010	69,7	7,90
Endoglucanase (0,426-0,033)	60	0,058	0,015	17,0	36,4
	75	0,057	0,015	25,7	28,4
	90	0,089	0,021	104	0,00
Celulase** (2,12-0,321)	60	0,038	0,010	1,17	-
	75	0,315	0,084	15,3	-
	90	0,256	0,073	31,0	-

*Atividade de cada celulase no controle.

**Atividade de celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.13. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 25°C em pH do fermentado igual a 5,0.

Hidrolase (U/mL-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade total (%)
β-Glicosidase (0,464-0,023)	60	0,060	0,010	24,5	12,3
	75	0,068	0,010	25,0	4,60
	90	0,098	0,028	105	1,00
Endoglucanase (0,426-0,020)	60	0,043	0,007	17,2	49,9
	75	0,095	0,015	44,4	23,0
	90	0,103	0,030	108	12,0
Celulase** (2,12-0,201)	60	0,148	0,025	2,98	-
	75	0,545	0,084	17,5	-
	90	0,540	0,155	45,0	-

*Atividade de cada hidrolase no controle.

**Atividade de celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.14. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 25°C em pH do fermentado igual a 6,5.

Hidrolase	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade total (%)
β-Glicosidase (0,439-0,024)	60	0,041	0,008	11,7	59,1
	75	0,058	0,011	53,3	4,40
	90	0,095	0,031	103	1,00
Endoglucanase (0,455-0,025)	60	0,017	0,003	6,86	34,5
	75	0,054	0,010	25,5	19,5
	90	0,111	0,036	122	1,00
Celulase** (2,01-0,330)	60	0,044	0,009	0,81	-
	75	0,406	0,078	12,0	-
	90	0,643	0,209	47,4	-

*Atividade de cada hidrolase no controle.

**Atividade de celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.

B.15. Recuperação de enzimas celulolíticas após precipitação com etanol a 25°C em pH do fermentado igual a 8,0.

Hidrolase (U/mL-U/mg)*	% Etanol (v/v)	Atividade do precipitado (U)	Atividade específica recuperada (U/mg)	Atividade recuperada (%)	Atividade total (%)
β-Glicosidase (0,278-0,018)	60	0,033	0,008	14,7	54,0
	75	0,046	0,012	21,0	3,80
	90	0,080	0,036	73,0	3,30
Endoglucanase (0,426-0,028)	60	0,018	0,004	7,23	30,1
	75	0,036	0,009	17,0	13,8
	90	0,074	0,033	86,9	16,1
Celulase** (2,21-0,299)	60	0,074	0,018	1,49	-
	75	0,139	0,036	4,48	-
	90	0,266	0,120	21,4	-

*Atividade de cada hidrolase no controle.

**Atividade de celulase é dada em FPU/mL e FPU/mg.