



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

PAULA CATALINA HOYOS VÁSQUEZ

**CINÉTICA DE INIBIÇÃO POR PRODUTO E SUBSTRATO DA HIDRÓLISE
DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Campinas

2017

PAULA CATALINA HOYOS VÁSQUEZ

**CINÉTICA DE INIBIÇÃO POR PRODUTO E SUBSTRATO DA HIDRÓLISE DO
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientador Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Paula Catalina Hoyos Vásquez, e orientada pela Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa.

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES 33003017034P8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

H853c Hoyos Vásquez, Paula Catalina, 1985-
Cinética de inibição por produto e substrato da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar / Paula Catalina Hoyos Vásquez. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Hidrólise enzimática. 2. Celulase. 3. Bagaço de cana. 4. Inibição. 5. Cinética. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cinética de inibição por produto e substrato da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Palavras-chave em inglês:

Enzymatic hydrolysis

Cellulase

Sugarcane bagasse

Inhibition

Kinetics

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Elenise Bannwart de Moraes Torres

Sarita Cândida Rabelo

Data de defesa: 14-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de aprovação

Dissertação de Mestrado por Paula Catalina Hoyos Vásquez e aprovada em 14 de março de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa - Orientador

Dra. Elenise Bannwart de Moraes Torres

Dra. Sarita Cândida Rabelo

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Sonia Vásquez e Hector Hoyos

À minha irmã Ana Tulia

Ao meu marido Helver Álvarez

Agradecimentos

Aos meus pais pois sem eles nada teria sido possível, pelo amor, pela entrega e pelas lições de vida.

Ao meu marido que com seu amor me deu força e coragem para finalizar essa etapa da minha vida.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo seu carinho e palavras de incentivo em momentos difíceis.

À professora Aline pela sua disposição e compromisso na orientação do meu trabalho.

Aos colegas da FEQ, principalmente aos colegas do LEPFE (João, Luiza, Ênio e Daniele) pela ajuda e companherismo nas jornadas de trabalho e fora delas.

Aos meus amigos Brasileiros pelo grande acolhimento e carinho, por me ensinar e permitir conhecer sua cultura.

RESUMO

Este trabalho teve como foco o estudo do mecanismo de inibição por produto no processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com a enzima β -glucosidase de *Aspergillus niger* e o complexo celulolítico Celluclast 1.5L de *Trichoderma reesei*. Os substratos utilizados nos experimentos foram celobiose, bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico (BH) e organossolve (BO). Foi empregado glucono- δ -lactona como inibidor da enzima β -glucosidase presente no complexo celulolítico a fim de evitar a conversão de celobiose em glicose no meio reacional. A concentração de glucono- δ -lactona, assim como o tempo de incubação deste com o coquetel enzimático, foram determinados por meio de um planejamento fatorial 3^2 . Para a determinação da cinética de inibição por produto da enzima β -glucosidase e a Celluclast 1.5L foram feitos ensaios nas seguintes condições: concentração de celobiose (substrato) de 0,5-10 g/L e 0-10 g/L de glicose (inibidor), concentração de bagaço pré-tratado 0,1-8 % m/v (substrato), xilose 0-10 g/L (inibidor) e glicose 0-60 g/L (inibidor), respectivamente. Os experimentos foram executados em pH 4,8, durante 1h, temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm e carga enzimática fixada em 0,0767 CBU/mL para o estudo de inibição por glicose na enzima β -glucosidase e de 50 FPU/mL para o estudo de inibição por glicose e xilose na enzima celulase. No decorrer das hidrólises foram coletadas alíquotas de 1mL do líquido reacional e para a quantificação dos carboidratos liberados a concentração foi determinada em um sistema de CLAE. O estudo de inibição por glicose na β -glucosidase de *Aspergillus niger* (Novozym188) com D(+)-Celobiose como substrato revelou que esta enzima é inibida competitivamente pela glicose. A constante de inibição K_i foi $3,825 \pm 0,889$ g/L, obtida através do ajuste dos dados experimentais. As análises de inibição por produto na enzima celulase de *Trichoderma reesei* com bagaço de cana-de-açúcar mostraram

que a glicose e a xilose reduziram a velocidade inicial de reação sem ocasionar uma redução considerável na velocidade máxima de formação de celobiose, indicando um mecanismo de inibição competitiva, onde a constante de inibição $14,950 \pm 0,737$ e $19,800 \pm 3,143$ g/L para glicose e xilose respectivamente. A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento organossolve catalisada pela enzima celulase exibiu um perfil cinético bastante diferente do perfil clássico de Michaelis Menten. A velocidade de formação de celobiose V_0 apresentou um máximo quando a concentração de celulose foi aproximadamente de 10 g/L, e diminuiu com o aumento da concentração; este comportamento foi atribuído ao efeito sólido.

PALAVRAS-CHAVE: Bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática, inibição por produto, celulase, β -glicosidase.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the mechanism of product inhibition in the enzymatic hydrolysis process of sugarcane bagasse with β -glucosidase enzyme from *Aspergillus niger* and the commercial complex Celluclast 1.5L from *Trichoderma reesei*. The substrates used in the experiments were cellobiose, bagasse sugarcane submitted to hydrothermal pretreatment (HB) and organosolv (OB). It was used glucono- δ -lactone as an inhibitor of β -glucosidase enzyme present in cellulolytic complex in order to avoid conversion of cellobiose into glucose in the reaction medium. The glucono- δ -lactone concentration and incubation time with the enzyme cocktail were determined by a factorial design 3^2 . To determine the kinetics of product inhibition of β -glucosidase enzyme and Celluclast 1.5L tests were performed under the following conditions: cellobiose concentration (substrate) from 0.5 to 10 g / L and 0-10 g / L glucose (inhibitor); pretreated biomass from 0.1 to 8% w / v (substrate), xylose 0-10 g / L (inhibitor) and glucose 0-60 g / L (inhibitor), respectively. The experiments were performed at pH 4.8 for 1 h, 50 ° C, agitated at 150 rpm and enzyme loading set at 0.0767 CBU / mL for the study of inhibition by glucose in β -glucosidase enzyme and 50 FPU / mL for the study of inhibition by glucose and xylose in cellulase enzyme. During the hydrolysis were collected 1ml aliquots of the liquid liquid and concentration of the released carbohydrates was determined on a HPLC system. The glucose inhibition study in *Aspergillus niger* β -glucosidase (Novozym188) with D (+) - Cellobiose as substrate revealed that this enzyme is inhibited by glucose competitively. The inhibition constant K_i was 3.825 ± 0.889 g / L, obtained by adjusting the experimental data. Product inhibition analyzes on *Trichoderma reesei* cellulase enzyme with sugarcane bagasse showed that glucose and xylose reduced the initial rate without causing a considerable reduction in maximum velocity of cellobiose formation, indicating competitive inhibition, where

the inhibition constant it is $14,950 \pm 0,737$ and $19,800 \pm 3,143$ g / L for glucose and xylose respectively. The enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse submitted to organosolve pre-treatment exhibited a kinetic profile quite different from the classic profile of Michaelis Menten. The velocity of cellobiose formation V_o showed a maximum when the cellulose concentration was approximately 10 g/L, and decreased with increasing substrate concentration; this behavior was attributed to effect of solid.

KEYWORD: Sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, product inhibition, cellulase, β -glucosidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura da biomassa lignocelulósica (adaptada de MENON e RAO 2012).	25
Figura 2.2: Estrutura da celulose com unidades repetitivas de anhidrocelobiose. (adaptada de FENGEL e WEGENER 1989).	26
Figura 2.3: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (adaptada de SCHUERC ,1963).	27
Figura 2.4: Estrutura química dos álcoois da lignina (adaptada de FENGEL e WEGENER, 1989).	28
Figura 2.5: Processo de produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar (adaptado de MAITAN-ALFENAS <i>et al.</i> , 2015).	30
Figura 2.6: Esquema simplificado do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (MAITAN-ALFENAS <i>et al.</i> , 2015).	31
Figura 2.7: Principais compostos de valor agregado e produtos de degradação gerados durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos (adaptada de BALAT, 2011).....	34
Figura 2.8: Esquema representativo do mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na hidrólise de materiais lignocelulósicos (adaptada de KHANAL <i>et al.</i> , 2010)	36
Figura 2.9: Esquema das principais vias cinéticas e interações em relação à inibição por produto das enzimas celulolíticas: reações principais (1,2); inibição por produto (3,4,5); inibição por substrato (6,7); transglicosilação (8,9). EG: endoglicosidase, CBH: celobiohidrolase ou exoglicosidase, β G: β -glicosidase (ANDRIĆ <i>et al.</i> , 2010b).	38
Figura 2.10: Curva de progresso de uma reação. Mudança da concentração de substrato (S) ou produto (P) em função do tempo. Adaptada de MARANGONI, (2003).....	43
Figura 2.11: Curva de progresso de uma reação enzimática e estimativa de velocidade inicial (adaptada de MARANGONI, 2003).	44
Figura 2.12: Gráfico de velocidade inicial versus concentração de substrato para uma reação catalisada por enzimas. A velocidade de reação é dependente da concentração de substrato na região de primeira ordem e independente da região de ordem zero adaptada de MARANGONI, (2003).	46
Figura 3.1: Esquema representativo da metodologia experimental realizada no planejamento fatorial 3^2	76

Figura 3.2: Esquema representativo da metodologia experimental da cinética de inibição por produto da enzima celulase da <i>Trichoderma reesei</i>	78
Figura 4.1: Determinação da velocidade inicial de reação mediante regressão linear para os experimentos realizados ($R^2=0,95$).....	84
Figura 4.2: Perfil cinético da hidrólise de celobiose sem adição de glicose (controle), 0,0767 CBU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança.....	86
Figura 4.3: Perfil cinético da hidrólise de celobiose com adição de 5 g/L de glicose , 0,0767 CBU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prims 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança.....	87
Figura 4.4: Perfil cinético da hidrólise de celobiose com adição de 10 g/L de glicose, 0,0767 CBU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prims 6.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança.....	88
Figura 4.5: Gráfico Lineweaver-Burk para a hidrólise de D-(+)-Celobiose com adição de diferentes concentrações de glicose como inibidor da enzima β -glicosidase.	91
Figura 4.6: Gráfico da fração de inibição para a hidrólise D-(+)-Celobiose com adição de concentrações diferentes de glicose como inibidor da enzima β -glicosidase	91
Figura 4.7: Perfil de cinético de hidrólise de BH sem adição de glicose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4.8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 60 min de reação. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prims 6.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites	

superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança.....	95
Figura 4.8: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 5 g/L de glicose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4.8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 60 min de reação. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prims 6.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança.....	96
Figura 4.9: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 20 g/L de glicose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 60 min de reação. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança.....	97
Figura 4.10: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 60 g/L de glicose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4.8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona 60 min de reação. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0.....	98
Figura 4.11: Gráfico Lineweaver-Burk para a hidrólise BH com adição de diferentes concentrações de glicose como inibidor da enzima celulase.....	99
Figura 4.12: Gráfico da fração de inibição para a hidrólise de BH com adição de concentrações diferentes de glicose como inibidor da enzima celulase.	100
Figura 4.13: Perfil de cinético de hidrólise de BH sem adição de xilose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 60 min de reação. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0 com um intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental.....	103
Figura 4.14: Perfil cinético de hidrólise de BH com adição de 2,5 g/L de xilose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4.8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 60 min de reação. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta	

ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0 com um intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental.....	104
Figura 4.15: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 5 g/L de xilose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4.8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prims 6.0 com um intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental.....	105
Figura 4.16: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 10 g/L de xilose, 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 30 min de reação. a) Gráfico de Lineweaver-Burk. Equação da reta ajustada no software Origin 8.0. e b) Gráfico de Michaelis-Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prims 6.0 com um intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental.....	106
Figura 4.17: Gráfico Lineweaver-Burk para a hidrólise BH com adição de diferentes concentrações de xilose como inibidor da enzima celulase.	107
Figura 4.18: Perfil cinético Michaeliano da hidrólise de BH com adição de xilose em concentrações de 2.5, 5 e 10 g/L.	107
Figura 4.19: Gráfico da fração de inibição para a hidrólise de BH com adição de concentrações diferentes de xilose como inibidor da enzima celulase.	110
Figura 4.20: Perfil cinético apresentado pela adição de glicose no início da hidrólise enzimática de BO, com 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4.8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 30 min de reação.....	114
Figura 4.21: Perfil cinético apresentado pela adição xilose no início da hidrólise enzimática de BO, com 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona.	117
Figura 4.22: Perfil cinético da hidrólise de bagaço a) BH , b) BO, com adição de 5 g/L de celobiose comparado com o respectivo controle, nos ensaios realizados com 8% (m/v) de sólidos a 50°C, pH de 4,8, 150 rpm, e 0,05 FPU/mL durante 60 minutos de reação.	119

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Resumo dos principais mecanismos de inibição nas reações enzimáticas. (S) substrato, (E) enzima, (P) produto e (I) inibidor (adaptada de FULLBROOK (1996)).	40
Tabela 3.1: Tipos de amostras necessarias para a determinação da atividade da Celluclast 1.5 L de <i>Trichoderma reesei</i> .	68
Tabela 3.2: Tipos de amostras necessarias para a determinação da atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus Niger</i> .	71
Tabela 3.3: Concentrações de substrato (celbiose) e inibidor (glicose) no estudo de inibição por produto da enzima β -glicosidase.	74
Tabela 3.4: Planejamento fatorial 3^2 para definir a concentração de glucono- δ -lactona e tempo de incubação na reação.	75
Tabela 3.5: Concentrações de substrato (bagaço de cana de açúcar) e inibidor (celbiose, glicose e xilose) no estudo de inibição por produto da enzima celulase.	78
Tabela 4.1: Composição química da biomassa empregada nas análises.	80
Tabela 4.2: Resultados obtidos no planejamento fatorial 3^2 para inibir seletivamente a enzima β -glicosidase.	82
Tabela 4.3: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por glicose da enzima β -glicosidase na hidrólise de D-(+)-celbiose.	85
Tabela 4.4: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por glicose da enzima β -glicosidase na hidrólise de D-(+)-celbiose.	92
Tabela 4.5: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por glicose da enzima celulase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico.	99
Tabela 4.6: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por xilose da enzima celulase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico (ajuste de inibição competitiva para concentrações de celulose entre 0 e 10 g/L).	109
Tabela 4.7: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por xilose da enzima celulase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico (ajuste para concentrações de BH entre 10 e 48 g/L de celulose sem inibição).	111

NOMENCLATURA

CBU: unidades de celbiose

CHB: celobiohidrolase

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DNS: ácido dinitrosalicílico

EG: endoglicanase

FPU: unidades de papel filtro

rpm: rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBJETIVOS	24
1.1.1	Objetivo geral	24
1.1.2	Objetivos Específicos	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	25
2.1.1	Celulose	26
2.1.2	Hemiceluloses	26
2.1.3	Lignina	27
2.1.4	Constituintes menores	28
2.1.5	Bagaço de cana-de-açúcar	29
2.2	PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	29
2.2.1	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	30
2.2.1.1	Pré-tratamento hidrotérmico	32
2.2.1.2	Pré-tratamento organossolve	33
2.2.2	Hidrólise da biomassa lignocelulósica	33
2.2.2.1	Hidrólise enzimática	34
2.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	35
2.3.1	O complexo celulolítico <i>Trichoderma reesei</i>	37
2.3.2	Inibição das enzimas celulolíticas	37
2.3.2.1	Tipos de inibição enzimática	39
2.3.2.2	Cinética de inibição das reações enzimáticas	41
2.3.2.1	Curvas de progresso e determinação de velocidade inicial	41
2.3.2.2	Modelo de catálise em estado estacionário: Michaelis-Menten	44

2.3.2.3 Métodos de determinação dos parâmetros cinéticos da equação de velocidade.....	48
2.4 TRABALHOS PUBLICADOS SOBRE A INIBIÇÃO EM ENZIMAS CELULOLÍTICAS	53
2.4.1 Inibição da enzima β -glicosidase por glicose	54
2.4.2 Inibição da enzima celulase por glicose	55
2.4.3 Inibição da enzima celulase por celobiose	58
2.4.4 Problemas experimentais da hidrólise enzimática de materiais celulósicos em relação à compreensão da inibição por produto	62
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
3.1 SUBSTRATO	65
3.2 PREPARO DO TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO	65
3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	66
3.3.1 Preparo da solução DNS (ácidodinitro-3,5-salicílico)	66
3.3.2 Determinação da atividade enzimática da Celluclast 1.5 L de <i>Trichoderma reesei</i>	67
Tabela 3-1 Tipos de amostras necessarias para a determinação da atividade da Celluclast 1.5 L de <i>Trichoderma reesei</i>	68
Cálculo da atividade da Celluclast em FPU/mL	69
3.3.3 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase.....	70
Tabela 3-2 Tipos de amostras necessarias para a determinação da atividade da β -glicosidase de <i>Aspergillus Niger</i>	71
Cálculo da atividade da Novozyme em CBU/mL	72
3.3.4 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidasena Celluclast 1.5 L	73
3.4 CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA B-GLICOSIDASE POR GLICOSE.....	73
3.5 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMA B-GLICOSIDASE POR GLUCONO- Δ -LACTONA NO COMPLEXO CELULASE	75

3.6	CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CELULASE POR CELOBIOSE, GLICOSE E XILOSE 77	
3.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR CLAE (CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA).....	79
4	ANÁLISE DE RESULTADOS.....	80
4.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SUBSTRATO.....	80
4.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS CELULASE E B-GLICOSIDASE	81
4.3	INIBIÇÃO DA ENZIMA B-GLICOSIDASE POR GLUCONO- Δ -LACTONA	82
4.4	CÁLCULO DAS VELOCIDADES INICIAIS USADAS NOS ESTUDOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	84
4.5	CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA B-GLICOSIDASE POR GLICOSE.....	85
4.6	CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CELULASE POR GLICOSE, XILOSE E CELOBIOSE 93	
4.6.1	Inibição da enzima celulase na hidrólise de bagaço submetido a pré- tratamento hidrotérmico (BH) como substrato.....	94
4.6.1.1	Inibição por glicose.....	94
4.6.1.2	Inibição por xilose.....	102
4.6.2	Inibição da enzima celulase na hidrólise de bagaço submetido a pré- tratamento organossolve (BO) como substrato	113
4.6.2.1	Inibição por glicose.....	114
4.6.3	Inibição por xilose.....	116
4.6.4	Inibição por celobiose.....	118
5	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ...	120
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	APÊNDICE I	133

DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO PARA A CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA B-GLICOSIDASE POR GLICOSE COM D-(+)-CELOBIOSE COMO SUBSTRATO.....	133
APÊNDICE II-A.....	138
DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO PARA A CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CELULASE POR GLICOSE COM BH COMO SUBSTRATO.....	138
APÊNDICE II-B.....	144
DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO PARA A CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CELULASE POR XILOSE COM BH COMO SUBSTRATO.....	144
APÊNDICE III-A.....	149
DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO PARA A CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CELULASE POR GLICOSE COM BO COMO SUBSTRATO	149
APÊNDICE III-B.....	155
DETERMINAÇÃO DAS VELOCIDADES INICIAIS DE REAÇÃO PARA A CINÉTICA DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CELULASE POR XILOSE COM BO COMO SUBSTRATO	155

1 Introdução

A crescente demanda energética vem ocasionando problemas sociais e ambientais devido à mudança climática, ao ritmo acelerado de consumo e à volatilidade dos preços do petróleo; surgindo a necessidade de aumentar a produção de energias renováveis e sustentáveis de alta qualidade, baixo consumo energético e baixo impacto ambiental. Desta forma, os biocombustíveis de segunda geração aparecem como solução, devido ao impacto ambiental positivo sem destruir áreas de alta biodiversidade, desmatamento ou degradação do solo.

Esta proposta de produção de biocombustíveis a partir de recursos renováveis tem gerado dúvidas sobre a sua viabilidade, portanto, a pesquisa mundial empenha-se no estudo e desenvolvimento de tecnologias que ofereçam soluções a esses inconvenientes. Graças às condições naturais, o baixo custo de produção e maior rendimento em litros por hectare de cana-de-açúcar plantada, o Brasil destaca-se no cenário mundial por ser o maior exportador e o segundo produtor de etanol de primeira geração depois dos EUA. Devido a isso, a cana-de-açúcar e seus coprodutos (bagaço e palha) têm sido o foco das principais pesquisas para produção de etanol de segunda geração (MILANEZ *et al.*, 2015).

O uso de biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, para a produção de biocombustíveis, oferece grandes vantagens, uma vez que permite o aumento da oferta de álcool sem aumentar a área de cana de açúcar plantada, além de ser um material de custo mínimo, pronto para uso (SCHLITTLER, 2006).

O desenvolvimento do processo para a produção de etanol a partir de bagaço de cana de açúcar requer um pré-tratamento, necessário para modificar a matriz lignocelulósica; a hidrólise, na qual os açúcares fermentescíveis são produzidos a partir

de enzimas celulolíticas e a fermentação dos açúcares para produzir o etanol. Embora um progresso significativo já tenha sido feito nas etapas de produção e conversão do bagaço de cana-de-açúcar e redução no custo de equipamentos e das enzimas (MILANEZ *et al.*, 2015), a produção de etanol de segunda geração está em uma fase de adaptação e aprendizado (SIQUEIRA, 2015).

Extensivos esforços estão direcionados ao melhoramento da degradação hidrolítica da biomassa lignocelulósica; os quais compreendem o aprimoramento da tecnologia de pré-tratamento e a produção de enzimas celulolíticas (ZHANG *et al.*, 2006); não obstante, a geração efetiva de um hidrolisado fermentescível a partir da celulose, de forma economicamente viável, é considerada ainda um dos principais desafios da pesquisa a fim de efetuar um processamento rentável do material lignocelulósico para a produção de etanol (HIMMER *et al.*, 2007).

Lamentavelmente, os sistemas de enzimas celulolíticas utilizados atualmente, inclusive as enzimas provenientes de *Trichoderma reesei*, que têm sido amplamente estudadas, são inibidas pelos próprios produtos da sacarificação: celobiose e glicose (GAN *et al.*, 2003), os quais limitam e retardam significativamente a velocidade e conversão das reações hidrolíticas catalisadas por estas enzimas, principalmente em presença de altas concentrações de substrato (ANDRIĆ *et al.*, 2010b). Esta limitação na conversão de materiais lignocelulósicos proporciona um grande incentivo para examinar e analisar detidamente as características e mecanismos de inibição causados por ditos produtos da reação nos sistemas celulolíticos empregados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Vários trabalhos avaliaram experimentalmente o mecanismo de inibição de celulase e β -glicosidase originárias de várias fontes por celobiose e glicose e

concluíram que a inibição era competitiva, não competitiva, incompetitiva, parcialmente competitiva ou mista. Os trabalhos foram feitos em diferentes condições operacionais de pH, temperatura, concentração de substrato, concentração de glicose, tempo de hidrólise e usaram diferentes substratos e enzimas de diferentes fontes em diferentes cargas e com unidades reportadas de diferentes maneiras, o que dificulta bastante a análise dos dados. No entanto, há consenso na literatura de que a inibição afeta fortemente as taxas de hidrólise (ANDRIĆ *et al.*, 2010b).

Apesar dos muitos trabalhos publicados, existem poucos dados de inibição disponíveis para substratos lignocelulósicos reais, sendo que a maioria usa celulose pura (Avicel, Solca Floc, etc) (ANDRIĆ *et al.*, 2010b). Além disso, a avaliação da inibição das celulasas é complicada pela presença de β -glicosidase nos complexos enzimáticos disponíveis. Por outro lado alguns autores, determinaram a velocidade inicial de reação apenas com um único ponto experimental o que pode levar a erros grandes.

O presente trabalho é diretamente relacionado à tese de doutorado de MOREIRA NETO (2016) (Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar). O objetivo é determinar, a partir do uso de vários pontos experimentais, o tipo de inibição que ocorre na hidrólise de bagaço de cana submetido a dois tipos de pré-tratamentos, um deles que não remove a lignina (hidrotérmico) e outro que deslignifica a biomassa (organossolve), assim como os parâmetros cinéticos correspondentes, de forma que estes dados estejam disponíveis para o desenvolvimento do modelo matemático.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho foi estudar a cinética de inibição por produto e por substrato na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado catalisada pelas enzimas celulase de *Trichoderma reesei* e β -glicosidase de *Aspergillus niger* e a influência na velocidade de sacarificação, em presença de diferentes concentrações de substrato.

1.1.2 Objetivos Específicos

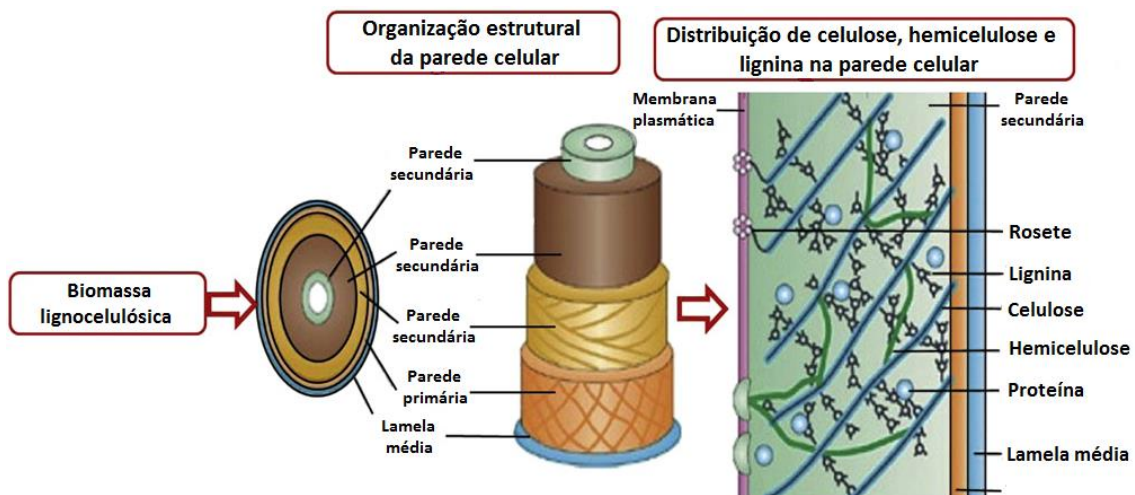
1. Avaliar o efeito e o mecanismo de inibição por produto (glicose) e por substrato (celobiose) sobre a enzima β -glicosidase de *Aspergillus niger*;
2. Avaliar o efeito e o mecanismo de inibição por substrato (celulose) e por produto (celobiose, glicose e xilose) ocasionado na enzima celulase de *Trichoderma reesei* utilizando dois tipos de substrato diferente: bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico e organossolve;
3. Determinar os parâmetros cinéticos para cada caso de inibição específico em hidrólises com diferentes concentrações de sólidos e concentração enzimática fixa.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o recurso renovável mais abundante e a maior fonte de carboidratos do planeta, constituída por celulose (35-50%), hemiceluloses (20-35%), lignina (10-25%) e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos; o conteúdo e a proporção desses componentes variam dependendo do tipo de biomassa (SANTOS *et al.*, 2012). Tais compostos estão acoplados intrinsecamente formando a estrutura da parede celular vegetal, a qual está dividida em parede primária e secundária, compostas principalmente por celulose e hemiceluloses e separadas entre si pela lamela média composta majoritariamente por lignina (MENON e RAO, 2012). Segundo FENGEL e WEGENER (1989), o arranjo concêntrico das camadas da parede celular é causado pelas diferenças na composição química e as diferentes orientações dos elementos estruturais. A distribuição da estrutura dos materiais lignocelulósicos pode ser vista na Figura 2.1.

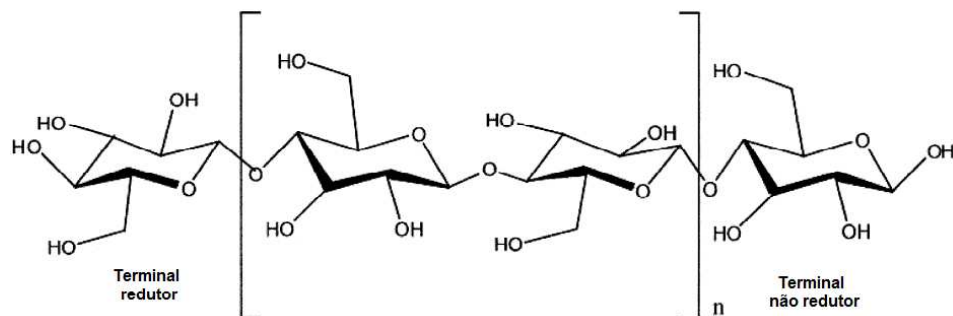
Figura 2.1: Estrutura da biomassa lignocelulósica (adaptada de MENON e RAO 2012).



2.1.1 Celulose

A celulose, o constituinte mais abundante da parede celular dos materiais lignocelulósicos. É um homopolissacarídeo com grau de polimerização de 10. 000 ou superior; composto unicamente por moléculas de D-glicose ligadas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas (JØRGENSEN *et al.*, 2007). Por meio de eliminação de uma molécula de água, duas unidades adjacentes de D-glicose estabelecem uma ligação glicosídica, dando origem à estrutura repetitiva da cadeia de celulose, denominada celobiose (FENGEL e WEGENER 1989), como mostrado na Figura 2.2. A celulose exibe regiões com uma estrutura cristalina (organizada) estabelecida pelas ligações intra e intermoleculares de hidrogênio, resultando na agregação de cadeias em fibrilas elementares cristalinas e regiões com uma estrutura amorfa (desorganizada) (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005); esta estrutura, juntamente com as ligações de hidrogênio intermoleculares, dá à celulose alta resistência à tração, faz com que seja insolúvel na maioria dos solventes e é parcialmente responsável pela resistência da celulose contra a degradação microbiana.

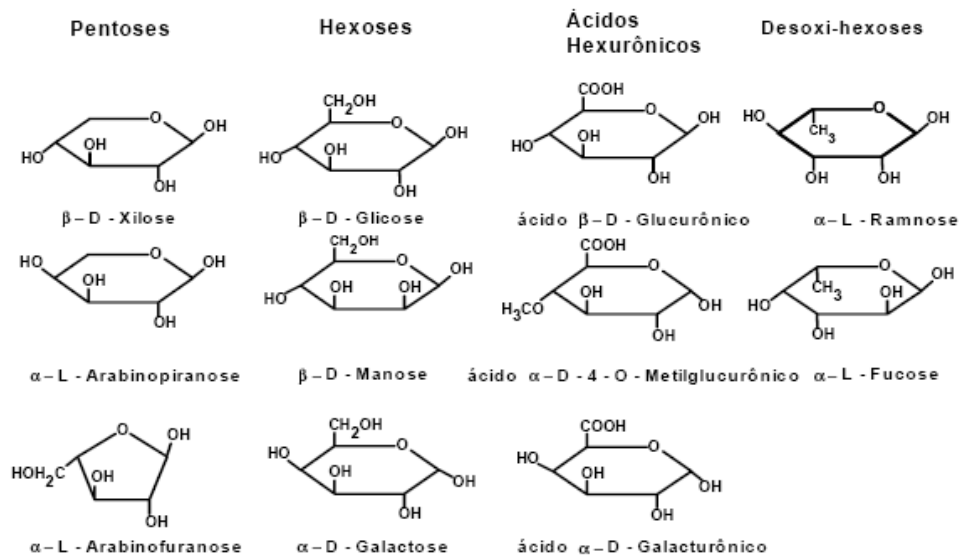
Figura 2.2: Estrutura da celulose com unidades repetitivas de anhidrocelobiose. (adaptada de FENGEL e WEGENER 1989).



2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos com estrutura lineares ramificadas constituídas por várias unidades de açúcares, tais como pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose), ácidos hexurônicos e desoxi-hexoses (ZHANG, e LYND, 2004). Estes carboidratos funcionam como uma ligação entre a lignina e as fibras de celulose, proporcionando a matriz lignocelulósica uma maior rigidez (FENGEL e WEGENER, 1989). Devido à sua natureza amorfa e sua estrutura ramificada, as hemiceluloses são mais susceptíveis ao ataque de agentes químicos do que a celulose (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). A Figura 2-3 ilustra a estrutura dos principais monossacarídeos que formam as hemiceluloses.

Figura 2.3: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (adaptada de SCHUERC ,1963).

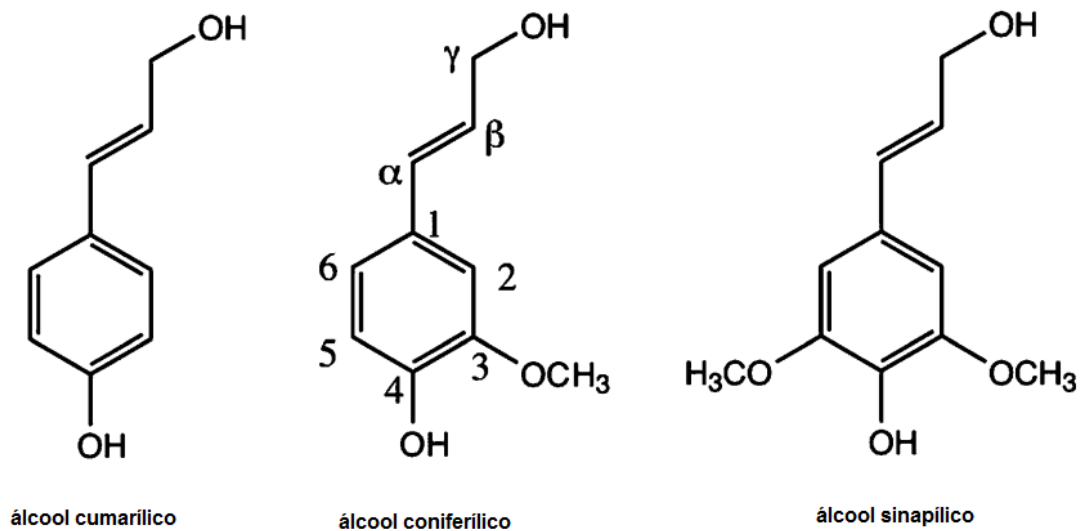


2.1.3 Lignina

É uma macromolécula amorfa com estruturas globulares, constituído por três unidades de fenilpropano diferentes (Figura 2.4) diferenciadas entre si pelas

substituições que exibem no anel aromático (FENGEL e WEGENER, 1989). A composição desses precursores varia de uma espécie para outra dependendo da matriz celulose-hemiceluloses; e, por causa da composição complexa, a estrutura química da lignina até agora não é completamente conhecida. O principal objetivo da lignina é dar à planta suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo (FENGEL e WEGENER, 1989).

Figura 2.4: Estrutura química dos álcoois da lignina (adaptada de FENGEL e WEGENER, 1989).



2.1.4 Constituintes menores

A biomassa lignocelulósica também está constituída por outras substâncias que não fazem parte da parede celular (WONG, 2009), os extrativos e não extrativos. Os

extrativos são compostos orgânicos solúveis em solventes polares e apolares como ceras, gorduras, resinas, ácidos graxos, hidrocarbonetos de alta massa molecular e esteróides, e as substâncias não extrativas são compostos inorgânicos como sais e minerais, como por exemplo potássio, sílica, manganês, sódio, cálcio, entre outros. O conteúdo e a proporção destes componentes variam dependendo da espécie do material lignocelulósico, do clima e condições do solo, representando aproximadamente 5-20% da biomassa (FENGEL e WEGENER, 1989).

2.1.5 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana de açúcar ou “bagaço” como geralmente é chamado, é o maior subproduto celulósico agroindustrial do Brasil (280 Kg de bagaço úmido/ton cana processada), proveniente da indústria do açúcar e álcool, remanescente após a extração do caldo da cana (FENGEL e WEGENER, 1989). A composição química do bagaço varia de acordo com diversos fatores como o tipo de cana, tipo de solo, condições climáticas e técnicas de colheita. Segundo GOUVEIA *et al.* (2009) uma composição típica para o bagaço é de aproximadamente 47,7% de celulose, 8,9% de hemiceluloses e 34,3% de lignina.

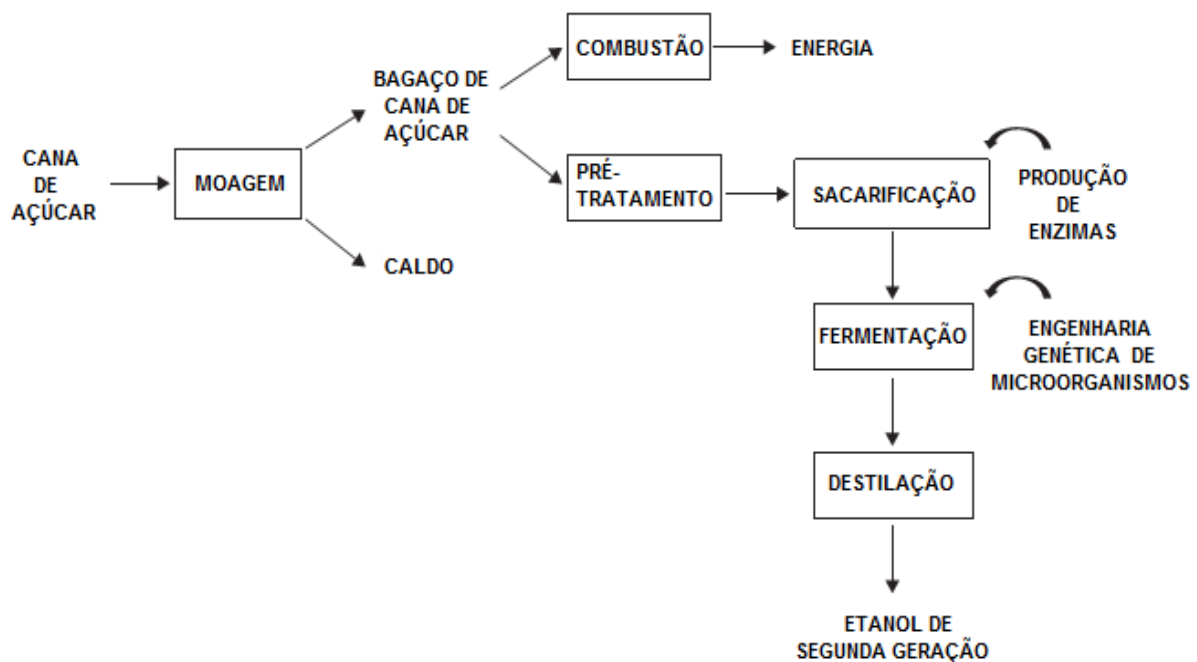
Devido ao grande volume remanescente e às suas características físicas e químicas, o bagaço é um material atraente que pode ser aplicado para usos alternativos como a produção de biocombustíveis tais como o etanol.

2.2 Produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica

O processamento de material lignocelulósico para produzir etanol compreende quatro etapas fundamentais: o pré-tratamento, a hidrólise, fermentação e separação do

produto e/ou purificação (SCHLITTLER, 2006). O pré-tratamento é necessário para modificar a estrutura da biomassa, assim como a sua composição química, de forma que a hidrólise dos carboidratos seja completada com maior rapidez e maior rendimento para produzir açúcares monoméricos que possam ser fermentados pela ação de populações microbianas e, finalmente, recuperar o etanol a partir do caldo de fermentação por meio de destilação (MOSIER, *et al.*, 2005). O processo de produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana de açúcar está representado na Figura 2.5.

Figura 2.5: Processo de produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar (adaptado de MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

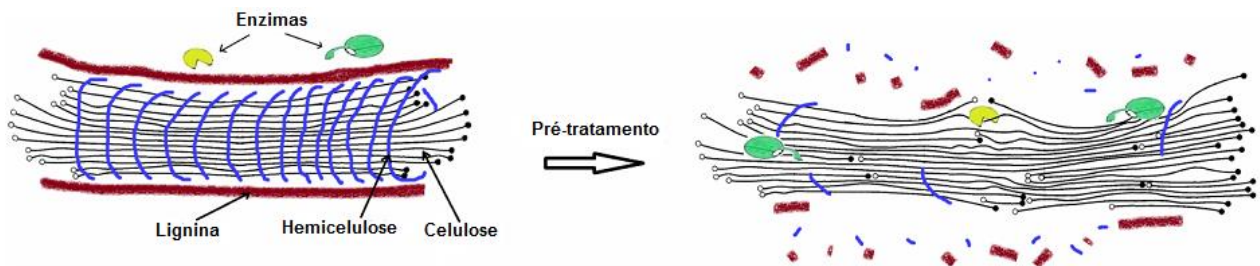


2.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Dado que a biomassa lignocelulósica é naturalmente resistente à desagregação dos seus açúcares, a finalidade do pré-tratamento é reduzir o grau de cristalinidade da

celulose e quebrar a matriz celulose-hemiceluloses-lignina para melhorar a acessibilidade das enzimas durante a etapa de hidrólise. A Figura 2.6 mostra um esquema representativo do pré-tratamento em biomassas lignocelulósicas.

Figura 2.6: Esquema simplificado do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).



Além de ser considerada uma etapa determinante na conversão de bagaço de cana-de-açúcar em etanol, o pré-tratamento representa um dos principais custos econômicos no processo, de fato, tem sido descrito como o segundo mais caro, precedido da hidrólise enzimática (VOLYNETS e DAHMAN, 2011).

Segundo MOSIER *et al.* (2005), numerosos métodos têm sido aplicados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Ainda, nem todos estão desenvolvidos ainda o suficiente para ser viáveis para aplicações em processos de grande escala. Os métodos de pré-tratamento estão agrupados em três categorias principais: pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos, além de múltiplas combinações entre eles (TAHERZADEH e KARIMI, 2007). A escolha do tipo de pré-tratamento não é trivial e deve considerar os padrões de liberação de açúcares e as concentrações de sólidos necessários para cada pré-tratamento, associado com a sua compatibilidade com o processo geral, a matéria-prima, e as enzimas a serem utilizadas (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

As técnicas de pré-tratamento mais estudadas e usadas até o momento são as de pré-tratamento químico, cujo objetivo principal é melhorar a biodegradabilidade da celulose através da remoção de lignina e/ou das hemiceluloses, diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da matriz de celulose (YANG e WYMAN, 2008); ditas técnicas compreendem o uso de agentes químicos como bases, ácidos e solventes orgânicos.

Entre os vários tipos de pré-tratamento existentes, os pré-tratamentos hidrotérmico e organossolve serão abordados com maior detalhe, uma vez que foram as técnicas aplicadas para pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar empregado como substrato das análises desse trabalho.

2.2.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico

No pré-tratamento hidrotérmico também chamado de autocatalítico, a biomassa lignocelulósica é submetida à alta temperatura (160-240 °C) e pressão, para manter a água no estado líquido, com o objetivo de provocar alterações na estrutura da matriz lignocelulósica. Solubiliza principalmente as hemiceluloses, tornando a celulose mais acessível e minimizando a formação de inibidores. É um tratamento que não requer descompressão rápida e não utiliza catalisadores ou agentes químicos (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; MENON e RAO, 2012), sendo por isso um tratamento atraente (TAHERZADEH e KARIMI, 2007). Não é necessária a redução de tamanho da biomassa e exibe baixo custo na construção do reator em virtude do baixo potencial de corrosão (ALVIRA *et al.*, 2010). Estudos têm mostrado que o pré-tratamento hidrotérmico remove até 80% das hemiceluloses e melhora a digestibilidade enzimática de biomassas como palha de milho (MENON e RAO, 2012), bagaço de cana (MOSIER, N. *et al.*, 2005) e palha de trigo (LASER *et al.*, 2002).

2.2.1.2 Pré-tratamento organossolve

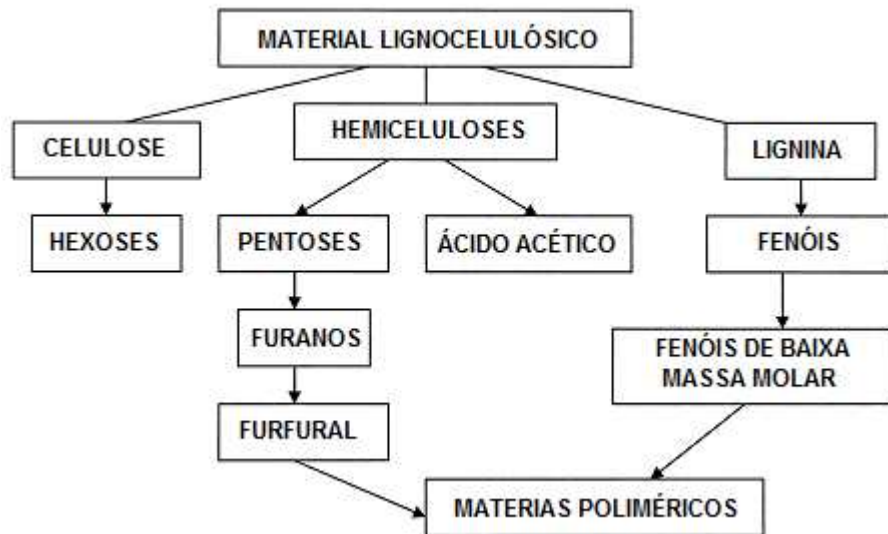
No processo organossolve, os materiais lignocelulósicos são tratados com solventes orgânicos ou soluções aquosas (incluindo metanol, etanol, acetona, etilenoglicol, álcool tetra-hidrofurfurílico, entre outros) a temperaturas entre 100 - 250 °C, a fim de solubilizar a lignina e parte das hemiceluloses, proporcionando celulose apropriada para posterior hidrólise enzimática (PÉREZ *et al.*, 2002). Comparando com outros pré-tratamentos químicos, a principal vantagem do processo organossolve é a recuperação de lignina relativamente pura como um subproduto (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Segundo ZHAO *et al.* (2009), a remoção dos solventes do sistema através de métodos de separação e extração, tais como evaporação e condensação, é necessária, já que estes podem ser inibidores durante a hidrólise enzimática e a fermentação. Além disso, para reduzir custos operacionais, existe a necessidade de reciclo destes. Os solventes mais empregados no processo organossolve são o etanol e o metanol, devido ao baixo custo e fácil recuperação (SUN e CHENG, 2002).

2.2.2 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

Antes da fermentação, os polissacarídeos presentes em materiais lignocelulósicos precisam ser convertidos em açúcares simples, através de um processo chamado hidrólise (ZHAO *et al.*, 2009). A hidrólise está classificada em dois grupos: hidrólise química (hidrólise ácida diluída e concentrada) e hidrólise enzimática (TAHERZADEH e KARIMI, 2007). A partir da hidrólise de biomassa lignocelulósica, podem ser originados numerosos compostos de valor agregado e produtos de degradação, como mostrado na Figura 2.7.

Figura 2.7: Principais compostos de valor agregado e produtos de degradação gerados durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos (adaptada de BALAT, 2011).



2.2.2.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é uma alternativa ambientalmente amigável que envolve o uso de enzimas celulolíticas que transformam a matriz dos materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis (DEMIRBAS, 2007). Embora seja um processo muito lento, visto que é dificultada pelos parâmetros estruturais do substrato (KESHWANI e CHENG, 2009), a hidrólise enzimática é vantajosa em relação à hidrólise química, devido à sua elevada eficiência de conversão, menor formação de subprodutos, uso de condições moderadas e não corrosivas de operação, e aos baixos requerimentos energéticos (PAN *et al.*, 2006).

As reações enzimáticas são afetadas ou influenciadas por numerosos fatores que minimizam o funcionamento das enzimas, portanto estendendo o tempo requerido para

completar a hidrólise, esses fatores estão classificados em dois grupos: os fatores relacionados à enzima e fatores relacionados ao substrato.

Dentre os fatores relacionados às enzimas estão a alta carga enzimática necessária (ANDERSEN, 2007; BON e FERRARA, 2007), os mecanismos de catálise enzimática (KHANAL *et al.*, 2010; SATTLER *et al.*, 1989; ZHANG e LYND, 2004), adsorção (BOUSSAID e SADDLER, 1999; LASER *et al.*, 2002; RABINOVICH *et al.*, 2002; VAN DYK e PLETSCHKE, 2012), inibição por produto final (ANDRIĆ *et al.*, 2010b; HOLTZAPPLE *et al.*, 1990; LYND *et al.*, 2002), desativação mecânica e térmica (BANSAL *et al.*, 2009; KAYA *et al.*, 1994; RABELO, 2010), entre outros.

Os fatores associados ao substrato são: teor de hemiceluloses e lignina (CHANG, e HOLTZAPPLE, 2000; GAN *et al.*, 2003; JØRGENSEN *et al.*, 2007), cristalinidade da celulose (ANDERSEN, 2007; MANSFIELD *et al.*, 1999; ZHANG e LYND, 2004), alterações no grau de polimerização (ALVIRA *et al.*, 2010; CHANG e HOLTZAPPLE, 2000; MANSFIELD *et al.*, 1999) e mudanças na área superficial (FAN e LEE, 1983; SUN e CHENG, 2002; ZHANG e LYND, 2004).

2.3 Hidrólise enzimática

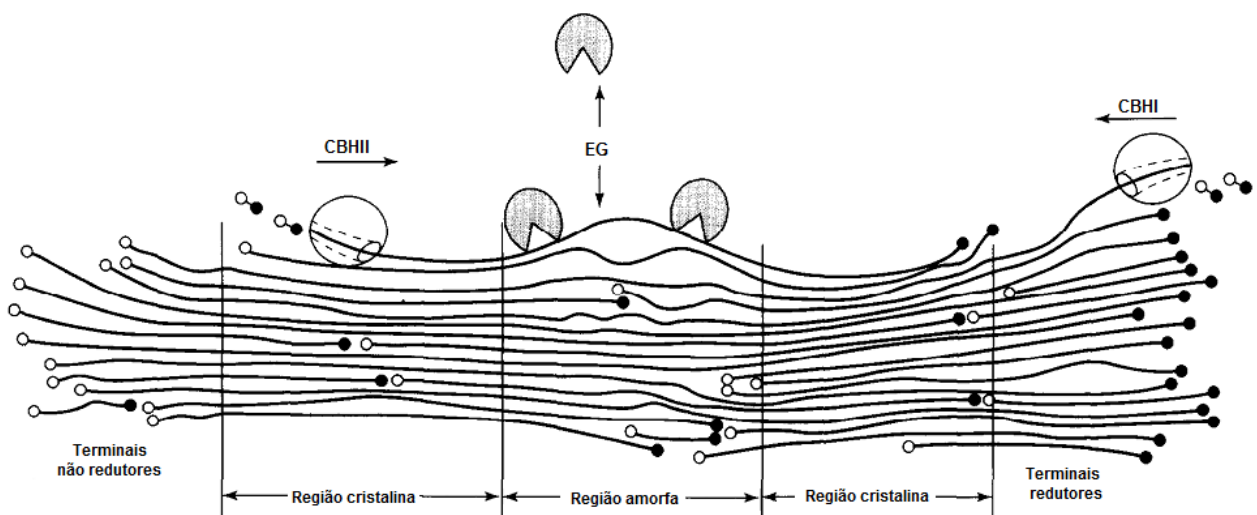
A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é uma reação de várias etapas que ocorre em um sistema heterogêneo, no qual a matriz lignocelulósica é fragmentada através da ação sinérgica de um complexo celulolítico chamado celulase (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

A celulase é um complexo multi-enzimático que consiste em uma mistura de três sistemas de enzimas diferentes: endo- β -1,4-glicosidases (EG), exo- β -1,4-glicosidases ou celobiohidrolases (CHB) e β -1,4-glicosidases (BGL) (ZHANG e LYND, 2004); essas enzimas são produzidas por vários microrganismos, geralmente por bactérias como *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*,

Erwinia, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* (KHANAL *et al.*, 2010) e fungos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium* (SUN e CHENG, 2002).

Inicialmente, a enzima endoglicanase (EG) atua aleatoriamente cortando as ligações β -1,4-glicosídicas acessíveis da região amorfa da celulose, produzindo novos terminais na cadeia e oligômeros cada vez mais curtos, sendo responsável pela diminuição e solubilização dos polissacarídeos (MANI *et al.*, 2002). Posteriormente, as extremidades redutoras ou não redutoras da cadeia de celulose (predominantemente nas regiões cristalinas) e alguns oligômeros são clivados progressivamente pelas exoglicosidases (também chamadas de celobiohidrolases, CBH) para produzir celobiose solúvel e por último, a β -glicosidase completa o processo catalisando a hidrólise de celobiose e oligossacarídeos mais curtos em glicose (LYND *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2006). A Figura 2.8 ilustra a ação dos complexos celulolíticos sobre as diferentes regiões da matriz lignocelulósica.

Figura 2.8: Esquema representativo do mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na hidrólise de materiais lignocelulósicos (adaptada de KHANAL *et al.*, 2010)



2.3.1 O complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*

Os estudos realizados nas enzimas celulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei* tem fornecido grande parte do conhecimento sobre a hidrólise enzimática de celulose (TEERI, 1997). Esse complexo enzimático tem sido estudado principalmente na degradação de materiais lignocelulósicos, visando a produção de etanol. As enzimas secretadas por *Trichoderma reesei* compreendem cinco endoglicosidases diferentes, dois tipos de exoglicosidases, assim como várias xilanases e pelo menos uma enzima β -xilosidase, e também contém atividade da β -glicosidase, embora grande parte desta enzima encontre-se fixada aos micélios e não seja recuperada durante a produção industrial de celulase (ANDRIĆ *et al.*, 2010b). Por isso, recomenda-se a suplementação exógena de β -glicosidase para aumentar a atividade da mesma na hidrólise enzimática. Geralmente, essa suplementação é realizada pela adição de uma preparação de enzima β -glicosidase de *Aspergillus niger* (ANDRIĆ *et al.*, 2010a; JØRGENSEN *et al.*, 2007; ROSGAARD *et al.*, 2007).

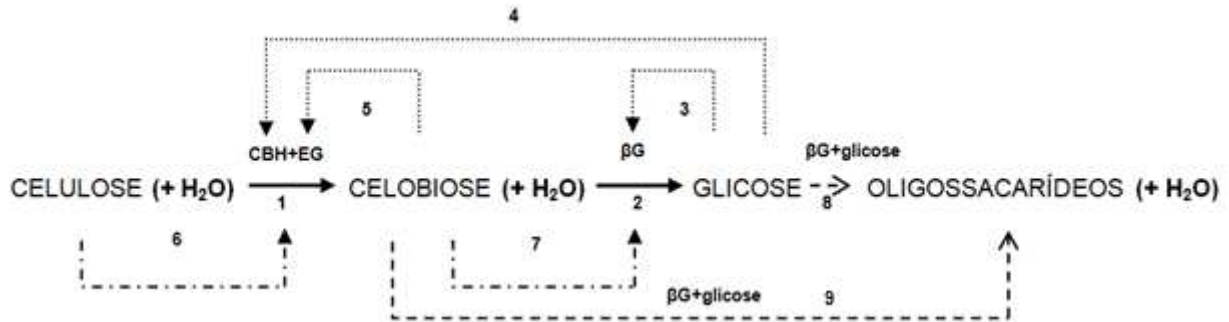
2.3.2 Inibição das enzimas celulolíticas

A hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é inibida pelo substrato e pelos próprios produtos da reação, o que diminui significativamente a velocidade de reação, representando um impedimento para alcançar uma eficiente degradação da celulose e altos rendimentos de glicose no processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (GAN *et al.*, 2003; GUSAKOV, A. V. *et al.*, 1987; XIAO *et al.*, 2004).

A atividade enzimática das celulases de *Trichoderma reesei* e β -glicosidase de *Aspergillus niger* são inibidas pelos produtos da reação hidrolítica de substratos lignocelulósicos: celobiose e glicose. A celobiose, produto da ação da exoglicosidase (CHB) e parcialmente da endoglicanase (EG), inibe diretamente ambas as enzimas CBH e EG (ANDRIĆ *et al.*, 2010a) (Figura 2.9 trajetória 5), e a glicose inibe a atividade enzimática da β -glicosidase (BG), o que resulta em acúmulo de celobiose, causando inibição indireta nas enzimas exo e endoglicosidases (DEKKER, 1986; GRUNO *et al.*, 2004; HOLTZAPPLE, *et al.*, 1990) (Figura 2.9 trajetória 4). Por outro lado, a celulose e a celobiose provocam inibição por substrato sobre a atividade das enzimas endoglicosidases e celobiohidrolases, e β -glicosidases, respectivamente (VÄLJAMÄE *et al.*, 2001) (Figura 2.9 trajetórias 6 e 7).

Em alguns casos, a enzima β -glicosidase catalisa uma reação inversa em que as moléculas de glicose ou celobiose, através de transglicosilação, podem produzir diferentes oligossacarídeos (ANDRIĆ *et al.*, 2010a) (Figura 2.9 trajetórias 8 e 9).

Figura 2.9: Esquema das principais vias cinéticas e interações em relação à inibição por produto das enzimas celulolíticas: reações principais (1,2); inibição por produto (3,4,5); inibição por substrato (6,7); transglicosilação (8,9). EG: endoglicosidase, CBH: celobiohidrolase ou exoglicosidase, β G: β -glicosidase (ANDRIĆ *et al.*, 2010b).



2.3.2.1 Tipos de inibição enzimática

Em alguns casos, o substrato ou o produto das reações enzimáticas, quando presentes em concentrações suficientemente elevadas, podem agir como um inibidor. Esta ação inibitória sobre a enzima pode ser reversível e irreversível (ANDRÍĆ *et al.*, 2010a).

A inibição reversível pode ser de vários tipos:

- a *inibição competitiva*, na qual o substrato (S) e o inibidor (I) competem pela ligação ao mesmo sítio ativo da enzima;
- a *inibição acompetitiva*, na qual o inibidor (I) liga-se ao complexo enzima/substrato (ES) em um local diferente do sítio ativo;
- a *inibição mista*, na qual o inibidor (I) interage com a enzima livre e com o complexo ES em um local diferente do sítio ativo; a ligação do inibidor (I) ou do substrato (S) afeta a afinidade de ligação da enzima pelo outro e vice-versa,
- a *inibição não-competitiva* é um caso especial da inibição mista, na qual o inibidor (I) liga-se ao mesmo tempo tanto à enzima (E) quanto ao complexo

ES em um local diferente ao sítio ativo. O inibidor (I) pode também se ligar à enzima quando o substrato não está ligado,

A inibição por substrato é o resultado da interação entre o complexo enzima-substrato (ES) e o substrato (MARANGONI, 2003); em outras palavras, duas moléculas de substrato (S) se ligam ao local ativo da enzima para formar um complexo (ESS) não produtivo (ANDRIĆ *et al.*, 2010b), o qual sugere que a alta concentração de substrato inibe sua própria conversão na reação enzimática. Na Tabela 2.1 observa-se um resumo dos mecanismos dos tipos de inibição mais comuns.

Segundo ANDRIĆ *et al.* (2010b); FULLBROOK (1996) e MARANGONI (2003), considerando regimes de inibição simples e uma cinética clássica de Michaelis-Menten, têm sido propostos pelo menos oito tipos de inibição reversível para celulasas: (i) competitiva, (ii) acompetitiva, (iii) não-competitiva, (iv) mista, (v) parcial, (vi) por substrato, (vii) por produto e (viii) alostérica.

Tabela 2.1: Resumo dos principais mecanismos de inibição nas reações enzimáticas. (S) substrato, (E) enzima, (P) produto e (I) inibidor (adaptada de FULLBROOK (1996)).

Tipo de inibição	Mecanismo
Nenhuma	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$
Competitiva	$E + I \rightleftharpoons EI$
Acompetitiva	$ES + I \rightleftharpoons ESI$
Mista/não competitiva	$E + I \rightleftharpoons EI$
	$ES + I \rightleftharpoons ESI$
	$EI + S \rightleftharpoons ESI$

Substrato

 $ES + S \rightleftharpoons SES$

2.3.2.2 Cinética de inibição das reações enzimáticas

A cinética de reações catalisadas por enzimas estuda principalmente a velocidade de reação e permite esclarecer o mecanismo de reação da enzima, o efeito causado pela variação das condições da reação sobre dita velocidade, e de que maneira a atividade enzimática pode ser ativada ou inibida por certas moléculas.

Interpretar e entender a cinética de inibição da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é importante para o melhoramento da velocidade e rendimento da reação. O custo do processo de produção de glicose pode ser reduzido, maximizando o desempenho das enzimas e eliminando ou aliviando as fontes de inibição. A previsão e estimativa precisam de parâmetros cinéticos como a velocidade de reação. Também é útil na otimização de projeto dos reatores, nos quais o processo é realizado (ANDRIĆ *et al.*, 2010b). Portanto, a descrição da cinética e a ação das enzimas celulolíticas em substratos insolúveis e lignocelulósicos é o objeto de muitas pesquisas e numerosos modelos e mecanismos têm sido propostos (AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; GAN *et al.*, 2003; MIAO *et al.*, 2012; ZHANG e LYND, 2004), os quais geralmente estão baseados no modelo cinético de Michaelis-Menten ou modificações deste (KADAM *et al.*, 2004).

2.3.2.1 Curvas de progresso e determinação de velocidade inicial

Para determinar velocidades de reação, é preciso construir curvas de progresso, as quais ilustram as mudanças de substrato ou do produto em função do tempo, nas quais a velocidade de reação corresponde à inclinação instantânea da curva (Figura

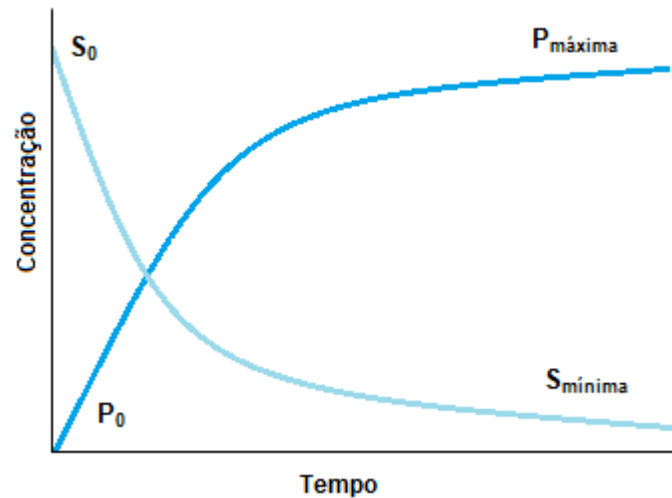
2.10). Contudo, a velocidade de reação (a inclinação ou coeficiente angular da curva) diminui no decorrer do tempo devido a causas como (ANDRIĆ *et al.*, 2010b):

1. A enzima torna-se instável no transcurso da reação;
2. O grau de saturação da enzima pelo substrato decresce à medida que o substrato é consumido;
3. A reação inversa se torna mais eminente conforme o produto se acumula;
4. Os produtos da reação inibem a atividade da enzima.

Devido às razões mencionadas, as curvas de progresso de reações catalisadas por enzimas não se ajustam a modelos de reações químicas homogêneas e, portanto, é necessária uma abordagem diferente, como o uso de velocidades iniciais como medida em vez das velocidades de reação (MARANGONI, 2003).

Para o desenvolvimento do método de velocidades iniciais, as seguintes considerações durante a fase inicial de uma reação enzimática são feitas: a conversão de substrato em produto é pequena, pelo qual pode ser considerada constante e igual à concentração de substrato inicial ($[S_0] \approx [S_i]$). Da mesma forma, muito pouco produto é

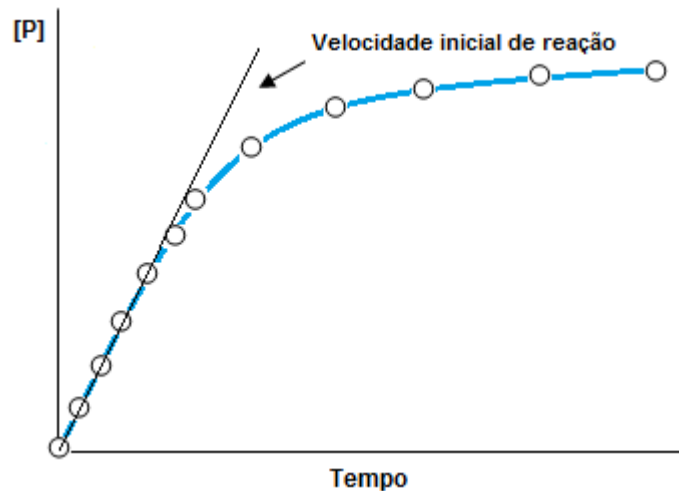
Figura 2.10: Curva de progresso de uma reação. Mudança da concentração de substrato (S) ou produto (P) em função do tempo. Adaptada de MARANGONI, (2003).



acumulado ($[P_t] \approx 0$) e portanto, a reação inversa e qualquer possível efeito inibidor sobre a atividade da enzima podem ser desprezados. Além disso, considera-se que a enzima permanece estável durante o começo da reação.

A fim de obter a velocidade inicial de uma reação, uma tangente à curva de progresso é construída tão próxima quanto possível da sua origem, na qual o coeficiente angular (velocidade inicial) é obtido através de regressão linear, como se ilustra na Figura 2.11. Essa taxa ou velocidade de reação medida é representativa para uma determinada concentração de substrato $[S_0]$, principalmente a baixos valores de concentração, nos quais as velocidades de reação são de primeira ordem com respeito a $[S_0]$. Na prática, uma conversão entre 5 a 10% do substrato pode ser tolerada durante o tempo de realização dos ensaios para medir $[P]$ com a finalidade de determinar a velocidade inicial de reação, já que os erros causados pela variação experimental podem exceder qualquer erro sistemático provocado pelo grau de consumo de $[S_0]$ durante o período do ensaio (MARANGONI, 2003).

Figura 2.11: Curva de progresso de uma reação enzimática e estimativa de velocidade inicial (adaptada de MARANGONI, 2003).



2.3.2.2 Modelo de catálise em estado estacionário: Michaelis-Menten

As reações enzimáticas usualmente são modeladas como um processo de duas etapas: o substrato (S) se liga à enzima (E) formando um complexo enzima-substrato (ES), seguido por uma separação irreversível do complexo enzima-substrato para liberar a enzima e produto (P) (MARANGONI, 2003):



O mecanismo de Michaelis-Menten descreve a dependência da velocidade inicial de reações catalisadas por enzimas conforme a concentração de substrato a partir da seguinte expressão:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

Sendo:

K_m : constante de dissociação do complexo ES, corresponde à concentração na qual a velocidade de reação é a metade da V_{max} . É uma medida da afinidade da enzima pelo substrato; assim, quanto menor for o seu valor, maior a afinidade. Depende do tipo de substrato e condições do sistema de estudo como pH, temperatura, polaridade entre outros.

V_{max} : Velocidade máxima, representa a velocidade máxima atingível, ou seja é a velocidade na qual a concentração total de enzima está presente na forma de complexo ES.

Este modelo em estado estacionário considera as seguintes suposições:

4. Uma vez que a ligação entre a enzima e o substrato ocorre, a concentração do complexo ES permanece constante no tempo e desta forma assume-se aproximação de estado estacionário.
5. A concentração do substrato permanece constante durante o curso da reação ($[S_0] \approx [S_t]$). Isto em parte é devido ao fato de que as velocidades iniciais são usadas e que $[S_0] \gg [E_T]$.
6. A conversão de produto em substrato é desprezível, uma vez que pouco produto foi acumulado durante o tempo da reação.

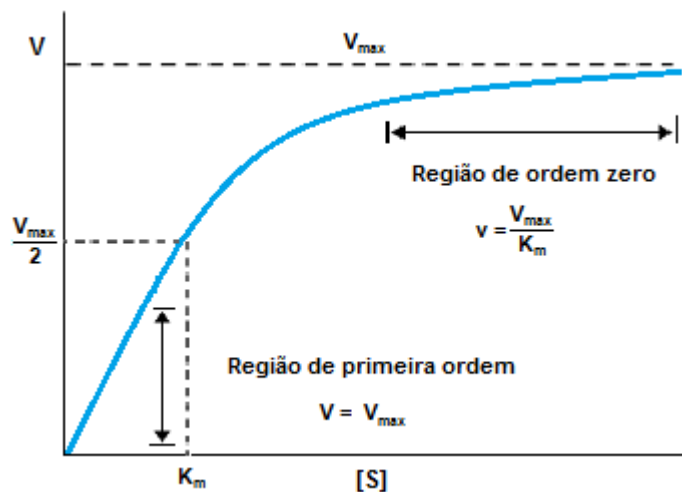
A curva que representa a relação da velocidade com respeito ao substrato possui a forma de uma hipérbole retangular como mostra a Figura 2.11. Em baixas concentrações de substrato, a velocidade ou taxa de reação é proporcional à concentração do substrato; nessa região a reação enzimática é de primeira ordem com respeito à concentração do substrato (Figura 2.11). Nesse caso, no qual $[S] \ll K_m$, a Equação (2.2) será reduzida a:

$$v = \frac{V_{\max}}{K_m} \quad (2.3)$$

Em altas concentrações de substrato a velocidade de reação permanece aproximadamente constante e insensível às mudanças da concentração de substrato. Nessa região a reação enzimática é de ordem zero com respeito ao substrato (ver figura 2-11). Para este caso, no qual $[S] \gg K_m$, a equação (2-3) será reduzida a:

$$V = V_{\max} \quad (2-4)$$

Figura 2.12: Gráfico de velocidade inicial versus concentração de substrato para uma reação catalisada por enzimas. A velocidade de reação é dependente da concentração de substrato na região de primeira ordem e independente da região de ordem zero adaptada de MARANGONI, (2003).



A equação de velocidade inicial de Michaelis-Menten pode ser modificada para incluir a inibição por produto e/ou substrato. Neste caso, os parâmetros cinéticos (K_m e

V_{max}) são afetados de forma específica dependendo do tipo de inibição. As Tabelas 2.2 e 2.3 mostram o efeito dos tipos de inibição na equação de velocidade de Michaelis-Menten e nos parâmetros cinéticos, respectivamente.

Tabela 2.2: Efeito dos tipos de inibição na equação de velocidade de Michaelis-Menten. K_i : constante de dissociação do complexo EI e K'_i constante de dissociação do complexo enzima-substrato inibidor. K_i é uma medida da afinidade da enzima pelo inibidor, desta forma, **quanto menor for o seu valor maior a afinidade** (adaptada de MARANGONI (2003)).

Tipo de inibição	Equação de velocidade	K_m aparente	V_{max} aparente
Nenhuma	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$	K_m	V_{max}
Competitiva	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$	$K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$	V_{max}
Acompetitiva	$v = \left(\frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}\right) \frac{K_i}{K_i + [S]}$	$\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$	$\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$
Mista	$v = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right) [S]}$	$K_m \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}$	$\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}$
Não-competitiva	$v = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) (K_m + [S])}$	K_m	$\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$

Tabela 2.3: Resumo do efeito de inibidores reversíveis nos parâmetros cinéticos V_{\max} e K_m . α e β estão definidas como $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$ e $\beta = 1 + \frac{[I]}{\delta K_i}$ sendo $\delta=1$ e $\beta=\alpha$ para um inibidor não-competitivo. Adaptada de GARRETT e GRISHAM, (1995).

Tipo de inibição	Parâmetro cinético	
	V_{\max}	K_m
Competitiva	Sem efeito $\rightarrow V_{\max}$	Aumenta $\rightarrow \alpha K_m$
Acompetitiva	Decresce $\rightarrow V_{\max}/\alpha$	Decresce $\rightarrow K_m/\alpha$
Mista	Decresce $\rightarrow V_{\max}/\beta$	Aumenta $\rightarrow (\alpha/\beta)K_m$
Não-competitiva	Decresce $\rightarrow V_{\max}/\alpha$	Sem efeito $\rightarrow K_m$

2.3.2.3 Métodos de determinação dos parâmetros cinéticos da equação de velocidade

A equação de velocidade de uma reação enzimática é definida quando seus parâmetros cinéticos são determinados. Por exemplo, a equação de Michaelis-Menten com V_{\max} e K_m genéricos representa uma família de hipérbolos retangulares, mas quando os valores dos parâmetros são determinados, referem-se a uma curva particular definida por V_{\max} e K_m . A estimativa dos parâmetros cinéticos é indispensável para o conhecimento do mecanismo de reação, assim como o entendimento desta, uma vez que os parâmetros têm significados físicos importantes (MARANGONI, 2003). Portanto, é necessário recorrer a métodos que permitam uma estimativa eficaz de ditos

parâmetros cinéticos de reações enzimáticas, como a hidrólise de materiais lignocelulósicos.

As técnicas disponíveis para a abordagem e estudo da cinética de uma reação enzimática fornecem dados experimentais que necessitam uma adequada metodologia de análise para maior aproveitamento. Os métodos para a determinação de parâmetros cinéticos estão divididos em três grupos:

- *Método analítico:* consiste na determinação dos parâmetros a partir de dois pares de medidas experimentais (v_1 e S_1) e (v_2 e S_2), dado que a equação de Michaelis-Menten tem dois parâmetros e, por conseguinte, bastam dois pontos da curva v versus S para sua determinação. No entanto, as estimativas de V_{\max} e K_m através desse método, são muito imprecisas devido a que os valores de v sempre possuem erros experimentais embutidos, apesar de que os valores de $[S]$ podem ser assumidos isentos de erro.
- *Métodos gráficos:* esses métodos também permitem a estimativa dos parâmetros cinéticos, todavia, em presença de erros experimentais, levam à determinação pouco precisa dos parâmetros. Devido a isso e às facilidades computacionais disponíveis hoje em dia, esses métodos estão entrando em desuso para a determinação de parâmetros. Contudo, alguns ainda são considerados para a identificação dos mecanismos cinéticos. Dentre os métodos gráficos estão:
 - O *método direto*, o qual está baseado na determinação da velocidade máxima mediante extrapolação da curva de velocidade (Figura 2.12) quando $[S]$ tende a infinito e, posteriormente, o K_m é estimado sobre o eixo das abscissas $[S]$, correspondendo à

velocidade igual à metade da V_{\max} . Por causa da dificuldade na determinação do valor assintótico de V_{\max} , além da consideração dos erros experimentais, a estimação de parâmetros através desse método é muito grosseira.

- Os métodos que utilizam transformações de variáveis, linearizando a equação de Michaelis-Menten. Dentre os métodos mais conhecidos estão: o método Lineweaver-Burk, o método Eadie-Hofstee, o método Hanes-Woolf e o método Eadie-Scatchard (PINTO, 2009).

O método gráfico mais utilizado na determinação de parâmetros cinéticos é o de Lineweaver-Burk ou também conhecido como método do duplo recíproco, o qual adota os valores inversos de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten, resultando em uma equação de linha reta, na qual as intercepções com os eixos das ordenadas e abscissas representam $1/V_{\max}$ e $-1/K_m$, respectivamente.

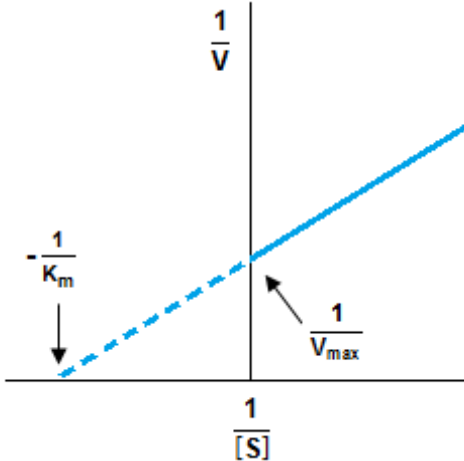
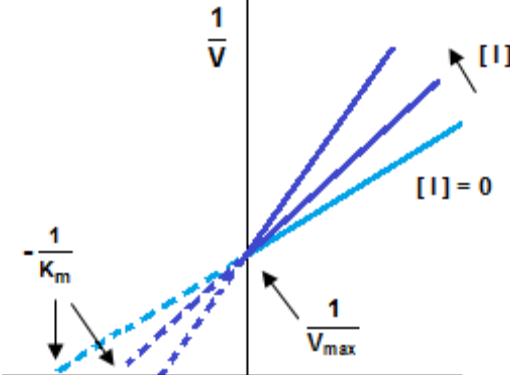
Assim, a relação entre $1/V$ e $1/[S]$ está dada pela seguinte expressão:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.5)$$

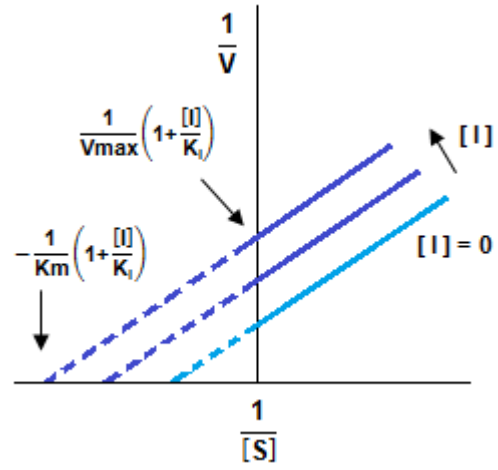
Este método tem a desvantagem de condensar os pontos de alta concentração de substrato em uma pequena região e enfatizar os pontos de menor concentração, que são muitas vezes os menos precisos já que têm a maior percentagem de erro (PINTO, 2009).

Atualmente, o uso mais importante desse método é o auxílio na determinação dos diferentes mecanismos cinéticos de inibição. A Tabela 2.4 mostra um resumo da aparência do gráfico duplo recíproco para cada tipo de inibição.

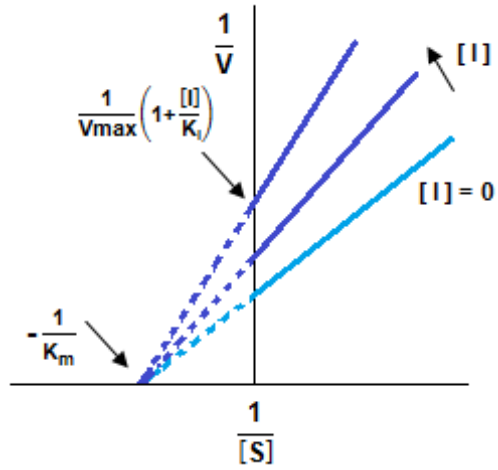
Tabela 2.4: Gráfico duplo recíproco para cada tipo de inibição.

Tipo de inibição	Gráfico Lineweaver-Burk
Nenhuma	 <p>A Lineweaver-Burk plot showing the relationship between the reciprocal of the reaction velocity ($1/V$) on the y-axis and the reciprocal of the substrate concentration ($1/[S]$) on the x-axis. A single straight line is plotted, intersecting the y-axis at $1/V_{max}$ and the x-axis at $-1/K_m$. The line is solid blue, with a dashed blue extension to the x-axis.</p>
Competitiva	 <p>A Lineweaver-Burk plot showing the relationship between $1/V$ on the y-axis and $1/[S]$ on the x-axis. Multiple lines are plotted, all intersecting at a single point on the y-axis at $1/V_{max}$. The lines are solid blue, with dashed blue extensions to the x-axis. The lines are labeled with increasing inhibitor concentration $[I]$ from the bottom-left to the top-right. The line closest to the x-axis is labeled $[I] = 0$. The x-axis intercepts move further to the left as $[I]$ increases.</p>

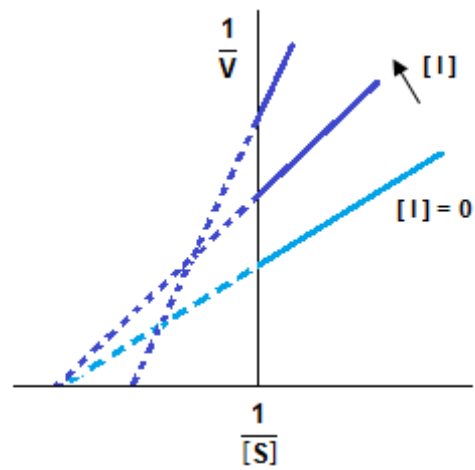
Acompetitiva



Não-competitiva



Mista



Além de não serem muito precisos, quando aplicados a equações com mais de dois parâmetros cinéticos (por exemplo, as equações de velocidade em presença de inibidor), os métodos gráficos possuem a desvantagem de não permitir uma estimativa dos parâmetros cinéticos, considerando todos os dados experimentais simultaneamente, isto é, não ajustam o modelo como um todo (LINEWEAVER e BURK, 1934).

- *Métodos de otimização*: são técnicas matemáticas que procuram encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados experimentais, usualmente através de análises de regressão, a fim de analisar e inferir a relação existente entre uma variável dependente ou variável resposta (neste caso, a velocidade de reação V) com as ou a variável independente (concentração de substrato $[S]$ e de inibidor $[I]$, quando for o caso). Atualmente, existem programas computacionais que utilizam essas técnicas, alguns dos quais foram desenvolvidos especialmente para estudos de cinética enzimática, permitindo obter estimativas mais exatas e precisas dos parâmetros cinéticos (PINTO, 2009).

2.4 Trabalhos publicados sobre a inibição em enzimas celulolíticas

Ao analisar os dados disponíveis na literatura sobre inibição por produto exercidos pela glicose e celobiose em hidrólise de materiais lignocelulósicos catalisados por sistemas enzimáticos procedentes de fungos, os mecanismos de inibição que mais têm

sido propostos são a inibição competitiva e não competitiva, e em alguns casos, incompetitiva, em conformidade com a cinética de Michaelis-Menten. Os estudos de inibição nas enzimas celulolíticas têm-se focado em: a) determinação dos mecanismos e constantes de inibição em reações com conversão mínima (entre 5 -10%), a fim de medir velocidades iniciais de reação e em reações de conversão completa e/ou b) análise do efeito inibitório da suplementação do produto (celobiose ou glicose, dependendo do caso de estudo) durante reações de conversão completa.

Contudo, a comparação quantitativa dos efeitos causados pela inibição da celobiose e glicose em enzimas celulolíticas não é simples, visto que os estudos realizados empregam condições experimentais muito diferentes e, além disso, os resultados são reportados em uma ampla variedade de unidades (PINTO, 2009).

2.4.1 Inibição da enzima β -glicosidase por glicose

A inibição causada pela glicose em β -glicosidases de origem fúngica tem sido descrita principalmente através do mecanismo de inibição competitiva, todavia outros tipos de inibição, como a inibição incompetitiva e a inibição mista têm sido propostos (Tabela 2.5).

Segundo ANDRIĆ *et al.* (2010a) e ANDRIĆ *et al.* (2010b), a inibição competitiva exercida pela glicose na β -glicosidase pode, de fato, ser o mecanismo de inibição mais plausível à exceção de alguns casos (Tabela 2.5), dado que a celobiose, além de ser um substrato solúvel, tem sua hidrólise catalisada pela enzima β -glicosidase através de um ataque simples (direto) em comparação com a ação complexa das endoglicanases e celobiohidrolases sobre substratos celulósicos insolúveis e heterogêneos.

Os valores da constante de inibição K_i reportados para a inibição por glicose na atividade enzimática da β -glicosidase variam entre 0,1 a 0,8 g/L e não possuem diferenças muito específicas em relação à fonte da enzima. A atividade da β -

glicosidase de *Trichoderma reesei* tende a ser mais suscetível à inibição pela glicose que a atividade das β -glicosidases de *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*. Entretanto, como a atividade presente no complexo celulase ou no suplemento externo de β -glicosidase pode variar amplamente, esta tendência não está estabelecida (GROUS *et al.*, 1985).

2.4.2 Inibição da enzima celulase por glicose

Os diferentes estudos realizados, conforme mostra a Tabela 2.5, demonstram que a inibição causada pela glicose na enzima celulase varia consideravelmente (valores de K_i entre 0,1-319 g/L) dependendo das condições do estudo, isto é, diferentes tipos de substrato em diferentes concentrações, diferentes razões enzima/substrato, diferentes concentrações de glicose, assim como diferentes condições experimentais. Como pode ser observado nas Tabelas 2.5 e 2.6, as celulases de *Trichoderma viride* parecem mais susceptíveis à inibição por glicose do que as celulases de *Trichoderma reesei*, apesar de que inferências definitivas não podem ser feitas devido aos fatores anteriormente mencionados (ANDRIĆ *et al.*, 2010b).

Tabela 2.5: Resumo das constantes de inibição por glicose e mecanismos de inibição em enzimas celulase e β -glucosidases (os dados para celulose são para os casos sem adição de β -glucosidase). CMC: carboximetilcelulose; pNP β G: p-nitrofenil- β -D-glucósido (adaptada de ANDRIĆ *et al.* (2010b)).

Fonte da enzima	Ki (g/L)	Substrato	Tipo de inibição	Referência
Celulase				
<i>T. reesei</i>	53	α -Celulose	Não-competitiva	ANDRIĆ <i>et al.</i> , (2010b)*
<i>T. reesei</i>	319	Celulose tingida	Não-competitiva	PHILIPPIDIS <i>et al.</i> , (1993)*
<i>T. reesei</i>	6	Solca Floc	Competitiva	HOLTZAPPLE <i>et al.</i> , (1990)*
<i>T. reesei</i>	-	Solca Floc	Acompetitiva	ASENJO (1983)*
<i>T. reesei</i>	12	α -Celulose	Não-competitiva	FAN e LEE (1983)
<i>T. viride</i>	>93	Celulose	Não-competitiva	OH <i>et al.</i> , (2000)*
<i>T. viride</i>	0,09-0,13	Algodão têxtil / polpa sulfatada	Acompetitiva	GUSAKOV <i>et al.</i> , (1992)*
<i>T. viride</i>	0,6	Algodão têxtil / polpa sulfatada	Competitiva	BELTRAME <i>et al.</i> , (1984)*
<i>T. longibrachiatum</i>	13	Celulose	Competitiva	BELTRAME <i>et al.</i> , (1984)*
<i>Trichoderma</i>	69	-	Não-competitiva	GUSAKOV <i>et al.</i> , (1985)*
<i>A. Niger</i>	-	CMC	Não-competitiva	TOLAN e FOODY (1999)*
<i>Thermomonospora</i>	146	Celulose tingida	Não-competitiva	AL-ZUHAIR <i>et al.</i> , (2007)*
				HOLTZAPPLE, M. T. <i>et al.</i> (1984)
N/A	-	Celulose	Competitiva	MOSIER <i>et al.</i> , (1999)*
N/A	-	Oligômeros insolúveis	Competitiva	MOSIER <i>et al.</i> , (1999)*
N/A	0,1	Palha de milho	Competitiva	MOSIER <i>et al.</i> , (1999)*
β -glicosidase				
<i>T. reesei</i>	0,6	Celbiose	Competitiva	KADAM <i>et al.</i> , (2004)*
<i>T. reesei</i>	0,1	Celbiose	Competitiva	PHILIPPIDIS <i>et al.</i> , (1993)*

<i>T. reesei</i>	0,07	Celbiose	Mista	ASENJO, (1983)*
<i>T. reesei</i>	0,05-6	Celbiose	Competitiva	WALD <i>et al.</i> , (1984)
<i>T. viride</i>	0,2-0,8	Celbiose	Mista	GROUS <i>et al.</i> , (1985)*
<i>T. viride</i>	0,4	Celbiose	Competitiva	GONG <i>et al.</i> , (1977)*
<i>T. viride</i>	0,4	Celbiose	Não-competitiva	GUSAKO <i>et al.</i> , (1992)*
<i>T. longibrachiatum</i>	0,06	-	Competitiva	HONG <i>et al.</i> , (1981)*
<i>T. harzianum</i>	0,2-0,3	pNPβG	Competitiva	TOLAN e FOODY, (1999)*
			Parcialmente competitiva	YUN <i>et al.</i> , (2001)*
<i>A. niger</i>	0,5	pNPβG	Competitiva	DEKKER, (1986)*
<i>A. niger</i>	0,4	pNPβG	Competitiva	NOBLE <i>et al.</i> , (1990)*
<i>A. niger</i>	0,6	Celbiose	Competitiva	BELTRAME <i>et al.</i> , (1984)*
<i>A. niger</i>	0,3	Celbiose	Não-competitiva	OH <i>et al.</i> , (2000)*
<i>A. niger</i>	0,24	-	Competitiva	TOLAN e FOODY, (1999)*
<i>A. niger</i>	0,1-0,5	Celbiose	Competitiva	GROUS <i>et al.</i> , (1985)*
<i>A. niger</i>	0,004-0,3	Celbiose	Mista	ALFANI <i>et al.</i> , (1990)*
<i>A. Foetidus</i>	0,3	Celbiose	-	GUSAKOV, A. V. <i>et al.</i> , (1992)*
<i>A. Foetidus</i>	94	pNPβG	-	DECKER <i>et al.</i> , (2000)*
5 Aspergillus strains	0,2-1,7	pNPβG	-	DECKER <i>et al.</i> , (2000)*
<i>Candida peltata</i>	252	pNPβG	Competitiva	SAHA e BOTHAST, (1996)*
Várias fontes	2,6-4	Celbiose	Não-competitiva	NOBLE <i>et al.</i> , (1990)*
	0,1-5	Celbiose	Competitiva	NOBLE <i>et al.</i> , (1990)*
Microbial enzymes	0,1-1,4	-	Competitiva	SAHA e BOTHAST, (1996)*
Microbial enzymes	0,1-2,5	-	-	YUN <i>et al.</i> , (2001)*
N/A	1,3	Celbiose	Competitiva	FAN e LEE, (1983)*
N/A	0,2	Celbiose	Competitiva	FAN e LEE, (1983)*
N/A	3,9	Palha de milho	Competitiva	KADAM <i>et al.</i> , (2004)
N/A	-	Celbiose	Competitiva	MOSIER <i>et al.</i> , (1999)*
N/A	-	Celbiose	Não-competitiva	

*apud (MOSIER *et al.*, 1999)

Segundo ANDRIĆ *et al.* (2010b), a inibição nas celulasas é difícil de avaliar devido à atividade presente de β -glicosidase e à eficiência na conversão de celulose em glicose dos complexos celulolíticos, entre outros fatores.

Apesar de que numerosos estudos de inibição têm sido efetuados com diferentes substratos celulósicos “puros”, existem poucos trabalhos nos quais se avalia a inibição em celulasas em substratos lignocelulósicos pré-tratados à exceção dos realizados por GUSAKOV *et al.* (1992), ANDRIĆ *et al.* (2010a) e KADAM *et al.* (2004).

2.4.3 Inibição da enzima celulase por celobiose

A maioria dos estudos de inibição por glicose em celulase também analisaram a inibição causada pela celobiose em diferentes sistemas celulolíticos, relatando que atua mediante mecanismos de inibição competitiva, mista e não competitiva, com valores da constante de inibição K_i variando entre 0,01 e 54 g/L, como mostra a Tabela 2-7. Segundo WALD *et al.* (1984), nos dados disponíveis na literatura não existe uma tendência que indique que o efeito de inibição dependa do tipo de substrato hidrolisado e a ampla variação nos resultados obtidos pode também estar relacionada com as diferenças nos modelos empregados para a estimação dos parâmetros.

A fim de avaliar a inibição por celobiose nas enzimas celulolíticas com presença de β -glicosidase, alguns trabalhos sugerem a supressão da atividade desta enzima mediante inibidores seletivos como glucono- δ -lactona, *nojimiricyn*, entre outros, para evitar a formação de glicose (ANDRIĆ *et al.*, 2010b; DEKKER, 1986; HOLTZAPPLE *et al.*, 1990).

Tabela 2.6: Resumo dos estudos que analisam o efeito da adição de glicose na hidrólise de materiais celulósicos e lignocelulósicos (adaptada de GUSAKOV *et al.*,1992).

Fonte da enzima	Substrato	So (% m/v)	Glicose adicionada (g/L)	Tempo (h)	Efeito de inibição (%)	Referência
Celulase						
<i>T. reesei</i>	Celulose tingida	0,5	546	0,25	63-66	HOLTZAPPLE <i>et al.</i> (1990)*
<i>T. reesei</i>	α -Celulose	6	20/80	0,02	20/60	PHILIPPIDIS <i>et al.</i> (1993)*
<i>T. reesei</i>	Palha de arroz	10 ^j	20	47	<5-7	WALD <i>et al.</i> (1984)*
<i>T. reesei</i>	<i>Solca Floc</i>	-	30	8	46	ASENJO (1983)*
<i>T. reesei</i>	<i>Solca Floc</i>	5	10/30	8	10/44	LEE E FAN (1983)
<i>T. reesei</i>	Avicel	2/10	20	0,5	55/35	XIAO <i>et al.</i> (2004)*
<i>T. reesei</i>	α -Celulose	9	10/80	-	55/78	OH <i>et al.</i> (2000)*
<i>T. longibrachiatum</i>	Celulose tingida	4	20	1	48/15/0	GUSAKOV <i>et al.</i> (1985)*
<i>Thermomonospora</i>	Celulose tingida	0,1-1	100/200	1	29/58	HOLTZAPPLE <i>et al.</i> (1984b)*
<i>Thermomonospora fusca</i>	<i>Swollen cellulose</i>	2-4	200	4	60	FERCHAK E PYE (1983b)*
<i>Clostridium thermocellum</i>	CMC	0,5	0,03	20	50	MOSOLOVA <i>et al.</i> (1993)*
<i>Penicillium funiculosu</i>	<i>Solca Floc</i>	5	30	8	67	RAO <i>et al.</i> (1989)*
N/A	Palha de milho	10	30/50	168	15/20	KADAM <i>et al.</i> (2004)*
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Swollen cellulose</i>	0,06	50	3	10	JOHNSON <i>et al.</i> (1982)*
<i>Clostridium thermocellum</i>	Avicel microcristalina	0,06	60	18	35	JOHNSON <i>et al.</i> (1982)*
Celulase e β -glicosidase						
<i>T. reesei/ A. Niger</i>	<i>Solca Floc</i>	10	50/100	4-24	23-18/60-37	TJERNELD <i>et al.</i> (1985)*
<i>T. reesei/ A. Niger</i>	Palha de trigo	2	20/40	96	46/62	ANDRIĆ <i>et al.</i> (2010)*
<i>T. reesei/ A. Niger</i>	<i>Sallow</i>	10	25/50	72	16/38	FRENNESON <i>et al.</i> (1985)*

β -glicosidase

<i>T. reesei</i>	Celbiose	1	3/20	0,02	75/95	PHILIPPIDIS <i>et al.</i> (1993)*
<i>A. niger</i>	Celbiose	1	120	0,5	63	DECKER (1986)*
<i>A. niger</i>	Celbiose	1	50/100	6	10/25	DECKER (1986)*
<i>A. niger</i>	Celbiose	2/10	20/100	0,5	47/52	XIAO <i>et al.</i> (2004)*
<i>A. niger</i>	PNPG	0,15	20	0,5	90	XIAO <i>et al.</i> (2004)*
<i>A. niger</i>	Celbiose	1	10/20-45	-	75/100	OH <i>et al.</i> (2000)*
<i>Thermomonospora fusca</i>	PNPG	-	200	-	65	FERCHAK e PYE (1983a)*
<i>Thermomonospora fusca</i>	Celbiose	1	150	4 ^{k,ac}	30	FERCHAK e PYE (1983a)*
<i>Candida peltata</i>	Celbiose	10	60	144 ^{k,bd}	≈0	SAHA e BOTHAST (1996)*
15 cepas de levedura	-	-	300	-	<50	SAHA e BOTHAST (1996)*

*apud ANDRIC *et al.*, (2010b)

Tabela 2.7: Resumo das constantes de inibição por celobiose e mecanismos de inibição em enzimas celulolíticas (adaptada de ANDRIĆ *et al.*, 2010b).

Fonte da enzima	Ki (g/L)	Substrato	Tipo de inibição	Referência
<i>T. reesei</i>	5,9	α -Celulose	Não-competitiva	PHILIPPIDIS <i>et al.</i> , (1993)*
<i>T. reesei</i>	54	Celulose tingida	Não-competitiva	HOLTZAPPLE <i>et al.</i> , (1990)*
<i>T. reesei</i>	-	Solca Floc	Acompetitiva	FAN e LEE (1983)*
<i>T. reesei</i>	6,0	α -Celulose	Não-competitiva	OH <i>et al.</i> , (2000)*
<i>T. reesei</i>	0,05	Palha de arroz	Acompetitiva	WALD <i>et al.</i> , (1984)*
<i>T. reesei</i>	4/10	Celulose amorfa	-	GRUNO <i>et al.</i> , (2004)*
<i>T. reesei</i>	0,5	Celulose bacteriana	Geralmente mista	GRUNO <i>et al.</i> , (2004)*
<i>T. reesei</i>	0,01	Avicel	Competitiva	BEZERRA e DIAS (2004)*
<i>T. reesei</i>	0,02	Avicel	Competitiva	BEZERRA e DIAS (2005)*
<i>T. reesei</i>	0,01	Avicel	Acompetitiva	BEZERRA e DIAS (2005)*
<i>T. reesei</i>	2,3	Solca Floc	Competitiva	ASENJO, (1983)*
<i>T. viride</i>	0,4	Polpa sulfatada	Acompetitiva	BELTRAME <i>et al.</i> , (1984)*
<i>T. viride</i>	1,8	Polpa sulfatada	Competitiva	BELTRAME <i>et al.</i> , (1984)*
<i>T. viride</i>	3,6	Celolignina	Acompetitiva	GUSAKOV <i>et al.</i> , (1992)*
<i>T. viride</i>	1,6	Solca Floc	Não-competitiva	HOWELL e STUCK (1975)*
<i>Trichoderma</i>	3,3	-	Não-competitiva	TOLAN e FOODY (1999)*
<i>T. longibrachiatum</i>	4,2	Celulose	Competitiva	GUSAKOV <i>et al.</i> , (1985)*
<i>A. Niger</i>	-	CMC	Não-competitiva	AL-ZUHAIR <i>et al.</i> , (2007)*
<i>Thermomonospora</i>	11	Celulose tingida	Não-competitiva	HOLTZAPPLE <i>et al.</i> , (1984b)*
N/A	0,02	Palha de milho	Competitiva	KADAM <i>et al.</i> , (2004)*
N/A	-	Celulose	Competitiva	MOSIER <i>et al.</i> , (1999)*

*apud ANDRIĆ *et al.* (2010b).

Dentro dos estudos de inibição por produto nos sistemas celulolíticos existem poucos que analisam a inibição causada pela xilose, a qual também é liberada em reações hidrolíticas de materiais lignocelulósicos, à exceção dos realizados por ANDRIĆ *et al.* (2010b) e MIAO *et al.* (2012), os quais encontraram que celulase é inibida competitivamente pela xilose. Outros trabalhos têm apontado que a celulase também é inibida fortemente por xilo-oligômeros e descreveram que a inibição atua de forma competitiva, sem embargo não determinaram os parâmetros cinéticos (KADAM *et al.*, 2004; QING *et al.*, 2010).

2.4.4 Problemas experimentais da hidrólise enzimática de materiais celulósicos em relação à compreensão da inibição por produto

Segundo ZHANG e VIIKARI (2012), durante a realização de estudos concernentes à análise da inibição por produto em reações hidrolíticas de materiais celulósicos e lignocelulósicos, apresentam-se problemas ou inconvenientes que afetam os resultados obtidos; portanto, espera-se que a identificação e caracterização de esses inconvenientes permitam o aperfeiçoamento dos protocolos experimentais no futuro.

Como descrito a seguir (ANDRIĆ *et al.*, 2010b), os principais problemas estão relacionados com: a) a determinação dos parâmetros de inibição, b) a complexidade da acessibilidade da enzima ao substrato celulósico e c) o mecanismo de ataque dos sistemas multienzimáticos.

- *Estratégia de estudo da inibição por produto*

A dificuldade na medição de velocidade de reação e na interpretação dos dados é um problema muito comum nos estudos de inibição das reações enzimáticas e deve-se principalmente ao fato de que a concentração do inibidor (por exemplo celobiose ou

glicose) muda conforme a reação avança, além de outros fatores como a inativação térmica ou mecânica das enzimas (em hidrólises de conversão completa), os quais também diminuem a velocidade de reação, desse modo dificultando a avaliação por separado desses efeitos com o efeito do inibidor. Em vista disso, os produtos em altas concentrações devem ser adicionados intencionalmente à reação hidrolítica com o propósito de medir o efeito direto na velocidade de reação.

- *Enzimas celulolíticas*

Devido à complexidade dos sistemas enzimáticos celulolíticos, tendo componentes individuais que podem comportar-se de maneira diferente dependendo da origem, composição, multiplicidade, entre outros; os dados disponíveis na literatura não fornecem conclusões claras e definidas acerca dos efeitos da inibição por produto e qual o sistema celulolítico mais resiste à inibição, apesar de muitos estudos em hidrólises de materiais celulósicos terem sido realizados.

- *Inibição por substrato*

A inibição por substrato é um fenômeno que ainda não foi suficientemente descrito na sacarificação de materiais (ligno)celulósicos, o qual diminui a velocidade de reação da hidrólise, além de afetar o estudo de inibição por produto. Esta inibição é um pouco mais complexa, uma vez que abarca a adsorção improdutiva da enzima na celulose e na lignina. A inibição por substrato torna-se importante em concentrações elevadas de substrato, no caso da celulose entre 2 a 6 % (m/v) (ANDRIĆ *et al.*, 2010b) e para celobiose entre 3 e 10 g/L (GROUS *et al.*, 1985; HONG *et al.*, 1981; HUANG e PENNER, 1991).

- *Razão entre a enzima e o substrato (E/S)*

A razão E/S também é um parâmetro muito importante a considerar em estudos de inibição por produto das enzimas celulases (OH *et al.*, 2000). Se E/S é alta, a superfície da celulose pode ser saturada pelas celulases adsorvidas e uma parte das enzimas ainda pode permanecer na mistura de reação. Como consequência, o mecanismo de inibição pode parecer competitivo (pseudo-competitivo), uma vez que a capacidade catalítica das enzimas celulolíticas limita-se devido à escassez de substrato disponível. Por outro lado, em presença de altas concentrações de substrato, ou seja, E/S baixa, e ao mesmo tempo altas concentrações de glicose ou celobiose (adicionados à reação hidrolítica a fim de avaliar efeitos inibitórios), pode-se impossibilitar a adsorção da enzima celulase no substrato. Dito mecanismo pode ser considerado como uma inibição competitiva legítima.

Outro motivo pelo qual a análise e compreensão da inibição por produto das enzimas celulolíticas é dificultada é a inconsistência existente na literatura referente ao uso da terminologia de inibição enzimática. Por exemplo, GUSAKOV e SINITSYN (1992) descreveram a inibição por produto para o mesmo sistema enzimático como inibição incompetitiva. No entanto, no trabalho subsequente de LEE e FAN, (1983) como não-competitiva, e posteriormente FAN e LEE (1983) afirmaram que esse mecanismo proposto pelos autores acima mencionados devia ser catalogado como incompetitivo.

Por outro lado, GUSAKOV e SINITSYN (1992) identificaram a inibição da glicose na enzima β -glicosidase como não-competitiva, mas apresentou a equação de velocidade de reação correspondente para inibição competitiva. Este uso ambíguo e inadequado da terminologia de inibição enzimática leva à confusão e prejudica de certa forma trabalhos futuros que pretendem realizar estudos baseados em conclusões mal feitas ou que não têm sentido.

3 Materiais e Métodos

3.1 Substrato

Os substratos empregados na realização dos experimentos foram D(+)-Celobiose (C7252-500 com pureza > 98%) da Sigma-Aldrich Brasil, Ltda., e bagaço de cana-de-açúcar fornecido pela usina Tarumã do Grupo Raízen, localizada na cidade de Tarumã, Estado de São Paulo, procedente da safra 2011/12, obtido por colheita mecanizada da cana-de-açúcar e provindo da última moenda após extração do caldo. O bagaço de cana foi moído em moinho de facas (Pulverisette 19, Fritsch) e, depois, peneirado com uma peneira de 0,5 mm e posteriormente submetido a dois pré-tratamentos diferentes, hidrotérmico e organossolve. Os pré-tratamentos foram realizados por MOREIRA NETO (2016) adotando as condições estabelecidas por OH *et al.* (2000) e CHRISTOFOLETTI (2010). Ambos os pré-tratamentos e a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura e já pré-tratado foram executados no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE).

3.2 Preparo do tampão citrato de sódio

Para a realização das análises de quantificação de atividade celulolítica e hidrólises enzimáticas foi preparado tampão citrato de sódio 0,05M com pH 4,8 seguindo a procedimento descrito pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory) (DRIEMEIER *et al.*, 2011).

Diluíram-se 210 g de ácido cítrico mono-hidratado com água destilada e volume da solução completado para 1L e o pH foi checado com um pHmetro marca Digimed modelo DM-22, em seguida adicionou-se hidróxido de sódio até

atingir um pH de 4,5, obtendo assim uma solução estoque de tampão citrato 1M. A solução estoque de tampão foi envasada e refrigerada.

Para a obtenção de solução de tampão citrato de sódio 0,05M, 50 mL da solução estoque 1M foram transferidos para um balão volumétrico de 1L e volume aferido com água destilada, o pH foi verificado e quando necessário mais hidróxido de sódio foi adicionado para atingir um pH de 4,8.

3.3 Determinação da Atividade Enzimática

Antes de iniciar as análises foi necessária a quantificação da atividade celulolítica das enzimas. As enzimas utilizadas foram celulase de *Trichoderma reesei*, (Celluclast 1.5L da Novozyme) e β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozyme 188).

3.3.1 Preparo da solução DNS (ácido dinitro-3,5-salicílico)

O preparo da solução DNS foi baseado na metodologia relatada por MILLER (1959) e ADNEY e BAKER (1996). Foram dissolvidos 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 500 mL de água destilada, aproximadamente, e mantidos em agitação com um agitador magnético marca Marconi, modelo MA085 até diluição total dos sólidos; seguidamente 7,6 mL de fenol fundido a 50 °C e 8,3 g de metabissulfito de sódio foram adicionados à mistura, e por último o volume foi aferido para 1L com água destilada em um balão volumétrico. A solução foi guardada em um frasco âmbar para proteger da luz e refrigerada.

Para a quantificação dos açúcares redutores foi necessário o preparo de 250 mL de solução DNS com tartarato de sódio, sendo esta elaborada logo antes das análises para evitar a sua degradação. Assim 171,23mL da solução mãe de DNS foram transferidos para um bequer adicionando 52,40 g de tartarato de sódio e potássio e mantidos sob agitação e aquecimento com agitador magnético marca Marconi, modelo MA-085, até a completa diluição,

após isso o volume foi aferido com água destilada em um balão volumétrico de 250 mL.

3.3.2 Determinação da atividade enzimática da Celluclast 1.5 L de *Trichoderma reesei*

O objetivo desta análise foi a determinação da atividade enzimática do complexo celulolítico Celluclast 1.5L em termos de unidades de papel filtro por volume de enzima não diluída (FPU/mL). A análise foi realizada conforme a metodologia descrita pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL) e BAZÁN, 1993.

A concentração de açúcares redutores liberados na determinação da atividade enzimática foi quantificada de acordo com o método DNS descrito por ADNEY e BAKER, 1996. O método DNS baseia-se na oxidação do grupo aldeído do açúcar redutor a um grupo carboxílico pela ação do o ácido 3,5-dinitrosalicílico, que ao mesmo tempo é reduzido a ácido 3-amino-nitrosalicílico gerando uma coloração avermelhada que é lida através de espectrofotometria infravermelha com um comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959).

A análise da atividade enzimática através do método DNS compreende cinco tipos de amostras: 1) diluições de glicose de concentração conhecida em um intervalo de 0 a 2 mg/mL feitas a partir de uma solução mãe de glicose de 5 mg/mL a fim de construir a curva padrão de glicose, 2) diluições de enzima Celluclast 1.5L em tampão citrato 0,05M foram feitas partindo de uma solução de celulase de diluição 1:20 com a finalidade de determinar a concentração exata de enzima diluída que hidrolisou 50 mg de papel de filtro picado Whatman No.1 produzindo exatamente 2 mg de glicose em uma hora de reação, 3) Controle de enzima para cada diluição de enzima testada sem adição de papel filtro (substrato), 4) Controle de substrato sem adição de enzima e 5) Branco reacional para zerar o espectrofotômetro.

* Os controles de enzima e de substrato foram feitos devido a que em alguns casos parte da concentração de açúcares redutores pode provir da própria enzima celulase e/ou do substrato, já que o coquetel enzimático pode conter açúcares nutrientes, do mesmo modo que os extremos redutores da celulose presente no papel de filtro podem ser quantificados como glicose antes de ocorrer a hidrólise enzimática. Por esta razão, os valores de absorvância dos tubos controles são subtraídos dos valores das absorvâncias obtidas em cada uma das diluições de enzima analisadas.

Tabela 3.1: Tipos de amostras necessarias para a determinação da atividade da Celluclast 1.5 L de *Trichoderma reesei*.

Conteúdo do tubo / Tipo de amostra	Diluição de glicose	Papel filtro Whatman No. 1	Tampão citrato de sódio 0,05 M	Diluição de enzima Celluclast 1.5 L	Volume final contido no tubo
	(mL)	(mg)	(mL)	(mL)	(mL)
Curva padrão	0,5	-	1	--	1,5
Amostra de enzima	-	50	1	0,5	1,5
Controle de enzima	-	-	1	0,5	1,5
Controle de substrato	-	50	1,5	-	1,5
Branco reacional	-	-	1,5	-	1,5

O procedimento para a determinação da atividade enzimática da Celluclast 1.5 L requereu o tratamento idêntico e em paralelo de todas as categorias de tubos preparados como detalhado na Tabela 3.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Primeiramente, todos os tubos foram incubados a 50 °C em um banho ultratermostatizado, marca Marconi, modelo MA-184, com o propósito de

equilibrar o conteúdo na temperatura adequada antes de adicionar as diluições de enzima celulase.

Transcorridos 10 minutos de incubação, 0,5 mL de cada diluição de enzima foram incorporados aos tubos de cada amostra de enzima e aos tubos controle de enzima correspondentes, completando um volume final de reação de 1,5 mL e, seguidamente, os tubos foram tampados e incubados a 50 °C durante 60 minutos.

A fim de parar a reação enzimática, 3,0 mL de DNS preparado segundo a metodologia descrita no item 3.3.1 foram acrescentados a cada amostra imediatamente após o período de incubação. Em seguida os tubos foram fervidos durante 5 minutos, sendo submergidos por último em um banho de gelo para interromper a reação. Os tubos foram invertidos para homogeneizar a solução e quando a polpa de papel remanescente da hidrólise assentou-se, 0,2 mL do líquido de cada amostra foram transferidos para novos tubos e diluídos com 2,5 mL de água destilada. A formação de cor foi determinada medindo a absorvância a 540 nm no espectrofotômetro Femto, modelo 600s.

Cálculo da atividade da Celluclast em FPU/mL

Para o cálculo da atividade da enzima Celluclast, primeiramente foi obtida uma equação da reta que relaciona os valores de concentração absoluta (mg/0,5mL) dos padrões de glicose em função da absorvância lida, em seguida, a concentração de glicose liberada na reação em cada amostra foi quantificada (após subtrair a absorvância dos controles de enzima e de substrato da absorvância das correspondentes diluições da enzima) estimando a quantidade necessária de Celluclast 1.5 que liberou exatamente 2,0 mg de glicose.

A atividade enzimática da Celluclast 1.5L em termos de FPU/mL foi calculada por meio da Equação 3.1 detalhada por (RABELO, 2010)

$$\text{FPU}/\text{mL} = \frac{2,0}{0,18 \cdot 0,5 \cdot 60 \cdot [\text{enzima diluída}]} \mu\text{mol} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (3.1)$$

$$\text{FPU}/\text{mL} = \frac{0,37}{[\text{enzima diluída}]} \quad (3-2)$$

Uma unidade de papel filtro FPU baseia-se na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente (isto é, 2,0/0,18 μmol) da hidrólise de 50 mg de papel filtro em 0,5 mL de enzima celulase diluída durante 60 minutos de reação.

3.3.3 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase

O objetivo desta análise foi a quantificação da atividade enzimática da enzima β -glicosidase de *Aspergillus Niger* expressa em unidades de celobiose por volume de enzima não diluída (CBU/mL). A metodologia desenvolvida foi adaptada de (GHOSE, 1987).

Na análise da atividade enzimática da β -glicosidase a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática foi quantificada por meio do método enzimático GOD-PAP. O método consiste na oxidação da glicose em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima glicose oxidase (GOD), o qual, consecutivamente, na presença de fenol a peroxidase (PAP) produz a coloração rosada da amostra, sendo a sua intensidade lida por meio de espectrofotometria infravermelha.

A análise da atividade enzimática da β -glicosidase mediante o método GOD-PAP envolve cinco tipos de amostras: 1) diluições de glicose de concentração conhecida em um intervalo de 0 a 4 mg/mL a partir de uma solução mãe de glicose de 8 mg/mL a fim de construir a curva padrão, 2) diluições de enzima Novozyme 188 foram feitas em tampão citrato 0,05M partindo de uma solução de β -glicosidase de diluição 1:1000 com o propósito

de determinar a concentração exata de enzima diluída que hidrolisou 1mL de celobiose 15 mM, formando exatamente 1 mg de glicose em uma 30 minutos de reação, 3) Controle para cada diluição da enzima Novozyme 188 analisada sem adição de celobiose (substrato)*, 4) Controle de substrato de celobiose sem adição de β -glicosidase * e 5) Branco reacional para zerar o espectrofotômetro.

*Os controles de substrato e enzima foram realizados já que ocasionalmente as preparações comerciais de glicose oxidase (GOD) contêm pequenas quantidades de β -glicosidase como impureza que poderia hidrolisar a celobiose remanente após a reação enzimática

Todas as amostras foram analisadas de forma idêntica e simultaneamente em triplicata, sendo preparadas conforme mostra a Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Tipos de amostras necessárias para a determinação da atividade da β -glicosidase de *Aspergillus Niger*.

Conteúdo do tubo / Tipo de amostra	Diluição de glicose (mL)	Solução de celobiose 15 mM (mL)	Tampão citrato de sódio 0,05 M (mL)	Diluição de enzima Novozyme 188 (mL)	Volume final contido no tubo (mL)
Curva padrão	2,0	-	1,0	-	2,0
Amostra de enzima	-	1,0	-	1,0	2,0
Controle de enzima	-	-	1,0	1,0	2,0
Controle de substrato	-	1,0	1,0	-	2,0
Branco reacional	-	-	2,0	-	2,0

Após preparadas, as amostras foram incubadas em um banho ultratermostatizado, (marca Marconi, modelo MA-184), a 50°C durante 10 minutos a fim de equilibrar a temperatura no conteúdo dos tubos antes de acrescentar as diluições de β -glicosidase. Passado o tempo de incubação, 1,0 mL de cada diluição de enzima foi adicionado ao tubo de cada amostra de enzima e tubo controle de enzima correspondente completando 2,0 mL de volume final de reação, posteriormente os tubos foram fechados e incubados a 50 °C em um período de 30 minutos.

Ao término da reação, as amostras colocaram-se em um banho de gelo fundente para deter a reação, em seguida 10 μ L de cada amostra foram transferidos para novos tubos e posteriormente 1,0 mL de reagente GOD PAP foi acrescentado para ocasionar a reação colorimétrica. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 37°C como indicado pelo fabricante do reagente GOD PAP. Transcorridos os 10 minutos os tubos submergiram-se em um banho de gelo e cada amostra foi diluída com 2 mL de água destilada e após isso mediu-se a intensidade da cor rosa formada no espectrofotômetro (Femto, modelo 600s) a 505 nm.

Cálculo da atividade da Novozyme em CBU/mL

Para o cálculo da atividade da enzima Novozyme, primeiramente foi obtida da que relaciona a concentração dos padrões de glicose em função da absorbância medida, após, a concentração de glicose liberada na reação em cada amostra foi quantificada (após subtrair a absorbância dos controles de enzima e de substrato da absorbância das correspondentes diluições da enzima) estimando a quantidade necessária de enzima Novozyme que liberou exatamente 1,0 mg de glicose.

Através da Equação 3-3 descrita por GHOSE, 1987 foi determinada a atividade enzimática da Novozyme 188 em termos de CBU/mL.

Uma unidade CBU é baseada na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose equivalente (isto é 0,5/0,18 μmol) da hidrólise de 1,0 mL de Celobiose 15mM em 0,5 mL de enzima β -glicosidase diluída durante 30 minutos de reação.

$$\text{CBU}/\text{mL} = \frac{0,5}{0,18 \cdot 1,0 \cdot 30 \cdot [\text{enzima diluída}]} \mu\text{mol} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (3.3)$$

$$\text{CBU}/\text{mL} = \frac{0,0926}{[\text{enzima diluída}]} \quad (3.4)$$

3.3.4 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase na Celluclast 1.5 L

Este ensaio teve como objetivo analisar a atividade de β -glicosidase presente no coquetel enzimático Celluclast 1.5 L da *Trichoderma reesei*.

Partindo de uma solução mãe 1:20 de Celluclast 1.5L a determinação da atividade e a quantificação da glicose liberada na hidrólise da celobiose foi realizada identicamente à metodologia descrita anteriormente no *item 3.3.3*.

3.4 Cinética de inibição da enzima β -glicosidase por glicose

O estudo cinético de inibição da β -glicosidase de *Aspergillus niger* por glicose foi realizado mediante a hidrólise de celobiose (substrato) com adição de glicose como inibidor.

Todas as reações foram executadas com tampão citrato de sódio 0,05 M com pH de 4,8 e 0,02% de azida sódica como meio reacional, com um volume

total de reação de 100 mL em frascos erlenmeyer de 125 mL e concentração inicial de celobiose (substrato) de 0,5-10 g/L e 0-10 g/L de glicose (inibidor) como mostrado na Tabela 3.3. Baseado no estudo de inibição de β -glicosidase realizado por (GHOSE, 1987) adotou-se a mesma carga enzimática de 0,0767 CBU/mL de solução.

Os erlenmeyers foram vedados e incubados em agitador orbital (Marconi, MA-832) a 50 °C e 150 rpm durante uma hora para condicionamento do meio reacional, passado esse tempo de incubação, adicionou-se a enzima β -glicosidase. No decorrer da reação foram coletadas alíquotas de 1mL do líquido reacional nos tempos de 0, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 min, sendo fervidas durante 5 minutos e imediatamente submergidas em um banho de gelo com o fim de desativar a β -glicosidase. Todas as amostras foram filtradas com filtro de seringa nylon (Analítica) com poros de 0,20 μ m e pré-limpo, transferidas para vials e devidamente etiquetadas. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Tabela 3.3: Concentrações de substrato (celobiose) e inibidor (glicose) no estudo de inibição por produto da enzima β -glicosidase.

Celobiose (substrato) (g/L)	Glicose (inibidor) (g/L)
0,5	
1	
2	0
3	5
4	10
5	
7,5	
10	

3.5 Inibição da atividade enzima β -glicosidase por glucono- δ -lactona no complexo celulase

Esta análise teve como fim inibir seletivamente a atividade de β -glicosidase presente no complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* Celluclast 1.5 L (Novozyme) mantendo a atividade da celulase praticamente íntegra (CALSAVARA *et al.*, 1999) e evitando a conversão de celobiose em glicose durante os estudos de inibição de enzima celulase.

Antes de realizar os estudos de inibição da celulase, foi executado um planejamento fatorial 3^2 a fim de estabelecer a concentração de glucono- δ -lactona e o tempo de incubação desta com o coquetel enzimático necessários para reduzir a atividade da β -glicosidase existente no coquetel enzimático. Na Tabela 3.4 apresentam-se os valores de concentração de glucono- δ -lactona e tempo estudados. A faixa de concentração de glucono- δ -lactona analisada foi baseada no estudo relatado por HOLTZAPPLE *et al.*, (1990), a concentração de celobiose foi fixada em 5 g/L e a carga enzimática em 0,05 FPU/mL conforme utilizada por HOLTZAPPLE *et al.*, (1990).

Tabela 3.4: Planejamento fatorial 3^2 para definir a concentração de glucono- δ -lactona e tempo de incubação na reação.

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Concentração de glucono- δ -lactona(g/L)	1	4	7
Tempo de incubação (h)	1	2,5	4

Todos os experimentos foram conduzidos inicialmente em dois frascos erlenmeyers de 50 mL. Um dos erlenmeyers continha uma solução preparada com tampão citrato 0,05 M pH 4,8 e 0,02 % de azida sódica com o dobro da concentração de glucono- δ -lactona que indica a Tabela 3.4 e o dobro de carga enzimática que corresponde a 0,1 FPU/mL de solução e o outro frasco

contendo a solução de celobiose com duas vezes a concentração estabelecida (5g/L), também preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4.8 e 0,02% de azida sódica. As soluções de glucono- δ -lactona e enzima foram incubadas em um agitador orbital (Marconi MA-832) a 50 °C e 150 rpm de acordo com o tempo designado pelo planejamento de experimentos e as soluções de celobiose foram incubadas durante uma hora em todos os ensaios para que estivesse na temperatura de 50°C por ocasião da adição da enzima. Transcorrido o tempo de incubação misturaram-se os conteúdos dos frasco erlenmeyer, obtendo assim uma solução com concentração de glucono- δ -lactona como mostrado na Tabela 3.4, a concentração de celobiose e a carga de enzima são diminuídas a 5 g/L e 0,05 FPU/mL de solução, respectivamente, completando um volume total de reação de 20 mL. A Figura 3.1 mostra um esquema representativo que resume a metodologia experimental realizada no planejamento fatorial 3². A reação foi conduzida durante uma hora nas mesmas condições de temperatura e agitação e, finalizado esse tempo, amostras de líquido reacional foram coletadas, fervidas e seguidamente submergidas em gelo para desativar a enzima celulase e a glicose liberada foi quantificada através do método GOD-PAP conforme descrito no *item 3.3.3*. Todos os ensaios realizaram-se em duplicata.

Figura 3.1: Esquema representativo da metodologia experimental realizada no planejamento fatorial 3².



3.6 Cinética de inibição da enzima celulase por celobiose, glicose e xilose

As análises de inibição da celulase também foram realizadas em dois frascos erlenmeyers de 125 mL cada um. Um frasco contendo duas vezes a concentração de bagaço de cana pré-tratado em 50 mL de solução preparada com tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 e 0,02 % de ázida sódica com o dobro da concentração de inibidor (celobiose, glicose ou xilose segundo o experimento) como indica a Tabela 3.5 e o outro erlenmeyer continha uma solução de duas vezes a concentração de glucono- δ -lactona determinada pelo planejamento de experimentos descrito no *item 3.5* e 0,1 FPU/mL de solução de celulase; seguidamente os frascos foram incubados a 50 °C e 150 rpm no agitador orbital (Marconi MA-832) e após uma hora (tempo determinado no planejamento fatorial para a inibição por glucono- δ -lactona) os conteúdos dos frascos foram misturados e a solução com concentração de bagaço, inibidor, glucono- δ -lactona e a carga enzimática foram reduzidas à metade da concentração inicial atingindo um volume total de reação de 100 mL. No decorrer da hidrólise alíquotas de 1 mL do líquido reacional foram coletadas nos tempos de 0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos, sendo fervidas durante 5 minutos e transferidas rapidamente para um banho de gelo com o propósito de inativar a enzima celulase. Posteriormente, as amostras foram filtradas com filtro de nylon (Analítica) com poros de 0,20 μ m e pré-limpo, transferidas para vials e etiquetadas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 3.5: Concentrações de substrato (bagaço de cana de açúcar) e inibidor (celobiose, glicose e xilose) no estudo de inibição por produto da enzima celulase.

Concentração de substrato (BH ou BO) (g/L)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de xilose (g/L)	Concentração de celobiose (g/L)
1			
5			
10	0	0	0
20	5	2,5	2,5
40	20	5	5
60	60	10	10
80			

Figura 3.2: Esquema representativo da metodologia experimental da cinética de inibição por produto da enzima celulase da *Trichoderma reesei*.



*indicados pelo planejamento

3.7 Determinação da concentração de carboidratos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Para a quantificação dos carboidratos liberados nas cinéticas de inibição descritas anteriormente, prepararam-se padrões de celobiose, glicose e xilose a fim de determinar uma curva de calibração que relaciona as soluções de concentração conhecida com as áreas correspondentes obtidas após a análise por CLAE. A concentração de açúcares foi determinada em um sistema de CLAE (Infinity HPLC Agilent Technologies modelo 1260). A separação dos açúcares realizou-se a 80°C através da coluna Aminex HPX-87P, usando água ultra-pura desgaseificada como fase móvel, com um fluxo de 0,6 mL/min e seguidamente analisados por um detector de índice de refração a 35 °C durante 20 minutos cada amostra.

4 Análise de Resultados

4.1 Composição química do substrato

A caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura e o submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico e organossolve foi executada no CNPEM | CTBE – Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol pela Dra. Sarita Cândida Rabelo. Os resultados das análises feitas em duplicata apresentam-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição química da biomassa empregada nas análises.

Composição química (%)	Bagaço in natura	Bagaço hidrotérmico	Bagaço organossolve
Extrativos	5,29 ± 0,04	-	-
Cinza	5,34 ± 0,42	6,44 ± 0,06	3,75 ± 0,11
Celulose	40,75 ± 0,04	60,23 ± 0,97	86,66 ± 0,40
Hemiceluloses	28,42 ± 0,64	0,71 ± 0,06	0,41 ± 0,25
Lignina total	21,64 ± 0,11	29,94 ± 0,05	8,24 ± 0,27
Balanço de massa	101,43 ± 0,11	100,28 ± 1,05	100,50 ± 0,49

Na Tabela 4.1 observa-se que os componentes existentes no bagaço foram extrativos (unicamente no bagaço in natura), cinzas, celulose, hemiceluloses e lignina total (solúvel e insolúvel). Em ambos pré-tratamentos, a composição de celulose aumentou consideravelmente, sendo que o teor de celulose passou de 40,75 ± 0,04% no bagaço in natura para 60,23 ± 0,97% após o pré-tratamento hidrotérmico e 86,66 ± 0,40 % após o pré-tratamento organossolve. A composição de hemiceluloses no bagaço teve uma diminuição significativa após os pré-tratamentos, reduzindo-se de 28,42 ± 0,64 % para 0,71± 0,06% e 0,41± 0,25% após o pré-tratamento hidrotérmico e

organossolve, respectivamente; o qual indica uma alta solubilização da fração de hemiceluloses.

Durante o pré-tratamento hidrotérmico o teor de lignina aumentou de $21,64 \pm 0,11\%$ para $29,94 \pm 0,05\%$ e após o pré-tratamento organossolve a percentagem de lignina diminuiu para $8,24 \pm 0,27\%$. Esta alta degradação de lignina se deve principalmente a clivagem de ligações éter e a hidrólise das ligações internas da lignina, assim como as ligações lignina-hemiceluloses (MOREIRA NETO, 2016). A quantidade de lignina descrita na Tabela 4.1 compreende a lignina solúvel e insolúvel (lignina Klason). O conteúdo de extrativos presentes no bagaço in natura foi de $5,29 \pm 0,04\%$. Uma vez que os extrativos são removidos no processo de pré-tratamento, a análise foi realizada unicamente para o bagaço in natura.

A composição do bagaço de cana-de-açúcar reportada neste trabalho está dentro dos valores já descritos na literatura. Devido a fatores como a temperatura, constituição do solo, umidade, variedade, método de plantio, época de colheita, entre outros, os valores obtidos não são fixos para cada análise (ZHAO *et al.*, 2009).

4.2 Atividade enzimática das enzimas celulase e β -glicosidase

A análise de atividade do coquetel enzimático Celluclast 1.5L de *Trichoderma reesei* usado neste trabalho mostrou uma atividade de $78,02 \pm 5,58$ FPU/mL de enzima e $28,01 \pm 2,37$ CBU/mL de enzima baseadas nas metodologias descritas nos *itens 3.3.2 e 3.3.4*, respectivamente. A enzima β -glicosidase de *Aspergillus Niger* apresentou uma atividade de $726,83 \pm 34,09$ CBU/mL de enzima.

4.3 Inibição da enzima β -glicosidase por glucono- δ -lactona

Com a finalidade de inibir a atividade da β -glicosidase presente no complexo celulolítico Celluclast 1.5L empregado para realizar os ensaios de inibição de celulase descritos no *item 3.6*, foi realizado um planejamento fatorial 3^2 no qual se avaliaram a concentração de glucono- δ -lactona e o tempo de incubação desta com a enzima antes de ser adicionada a celobiose. O objetivo é que a inibição das celulasas possa ser avaliada sem a influência da ação da β -glicosidase.

Os resultados do planejamento são apresentados na Tabela 4.2. Um ensaio controle (sem adição de glucono- δ -lactona) sob as mesmas condições de reação foi realizado a fim de estimar o efeito inibidor da glucono- δ -lactona na β -glicosidase.

Tabela 4.2: Resultados obtidos no planejamento fatorial 3^2 para inibir seletivamente a enzima β -glicosidase.

Ensaio	glucono- δ -lactona (g/L)	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xcelobiose (%)
Controle	0	0,0	0,639 \pm 0,16	12,16 \pm 0,16
1	1	1,0	0,048 \pm 0,01	0,91 \pm 0,01
2	1	2,5	0,065 \pm 0,05	1,24 \pm 0,05
3	1	4,0	0,010 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01
4	4	1,0	-	-
5	4	2,5	-	-
6	4	4,0	-	-
7	7	1,0	-	-
8	7	2,5	-	-
9	7	4,0	-	-

A resposta do planejamento foi a conversão de celobiose. Para calcular este valor foi determinada a concentração de glicose liberada depois de 1 hora

de hidrólise da solução contendo celobiose, enzima celulase e glucono- δ -lactona com concentrações detalhadas na metodologia do *item 3.5*. A conversão da celobiose foi quantificada baseada na formação de glicose a partir das equações 4-1 e 4-2.

$$\text{Celobiose}_{\text{hidrolisada}} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \text{Glicose}_{\text{formada}} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \times 0,952 \quad (4-1)$$

$$X_{\text{celobiose}} = \frac{\text{Celobiose}_{\text{hidrolisada}} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}{\text{Celobiose}_{\text{inicial}} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)} \times 100\% \quad (4-2)$$

Os resultados da tabela 4-2 mostram que houve uma redução significativa na conversão de celobiose com a adição de glucono- δ -lactona. Comparando o ensaio controle com o ensaio realizado com 1 g/L glucono- δ -lactona e 4 horas de incubação nota-se que ocorreu uma diminuição da conversão de celobiose de $12,16 \pm 0,016\%$ para $0,19 \pm 0,01\%$, ou seja, ocorreu uma redução da conversão de celobiose de 98,44%, o que comprova que a glucono- δ -lactona tem um efeito altamente inibitório sobre a β -glicosidase, como exposto por HOLTZAPPLE *et al.*, (1990) mostrou que a atividade residual da β -glicosidase foi reduzida a menos de 4% empregando concentrações de glucono- δ -lactona no intervalo de 1-7,5 g/L em uma hidrólise de *Cellulose azure* executada durante 30 minutos.

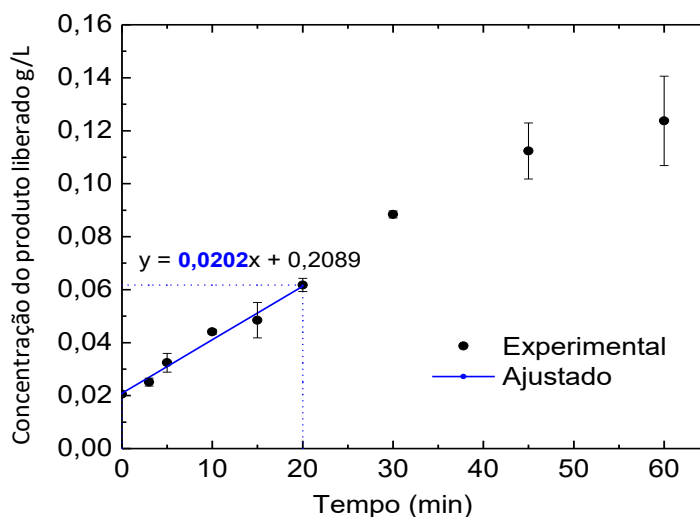
Não foi possível determinar a glicose liberada para as análises com concentração de glucono- δ -lactona acima de 1 g/L, já que a concentração foi inferior à capacidade de quantificação do método GOD-PAP. A concentração de glucono- δ -lactona e o tempo de incubação com a enzima empregada para executar os experimentos de cinética de inibição da celulase por celobiose, glicose e xilose foram definidos a partir dos resultados obtidos no planejamento experimental. Portanto, as análises foram realizadas com 4g/L de glucono- δ -lactona e 1 hora de incubação, visto que nessas condições a conversão de

celobiose é menor do que $0,19 \pm 0,01\%$, o que é um resultado satisfatório para os fins deste trabalho.

4.4 Cálculo das velocidades iniciais usadas nos estudos de cinética enzimática

Em todos os experimentos executados no presente trabalho, como ilustrado no exemplo da Figura 4.1, a determinação da velocidade inicial de reação (coeficiente angular), V_i , feita por meio de regressão linear no software Origin 8.0 usando pelo menos cinco pontos experimentais durante os primeiros 20 minutos de reação e tolerando uma conversão do substrato de no máximo 5% aproximadamente. Os gráficos de regressão linear para todos os experimentos realizados no presente trabalho são apresentados nos anexos.

Figura 4.1: Determinação da velocidade inicial de reação mediante regressão linear para os experimentos realizados ($R^2=0,95$).



4.5 Cinética de inibição da enzima β -glicosidase por glicose

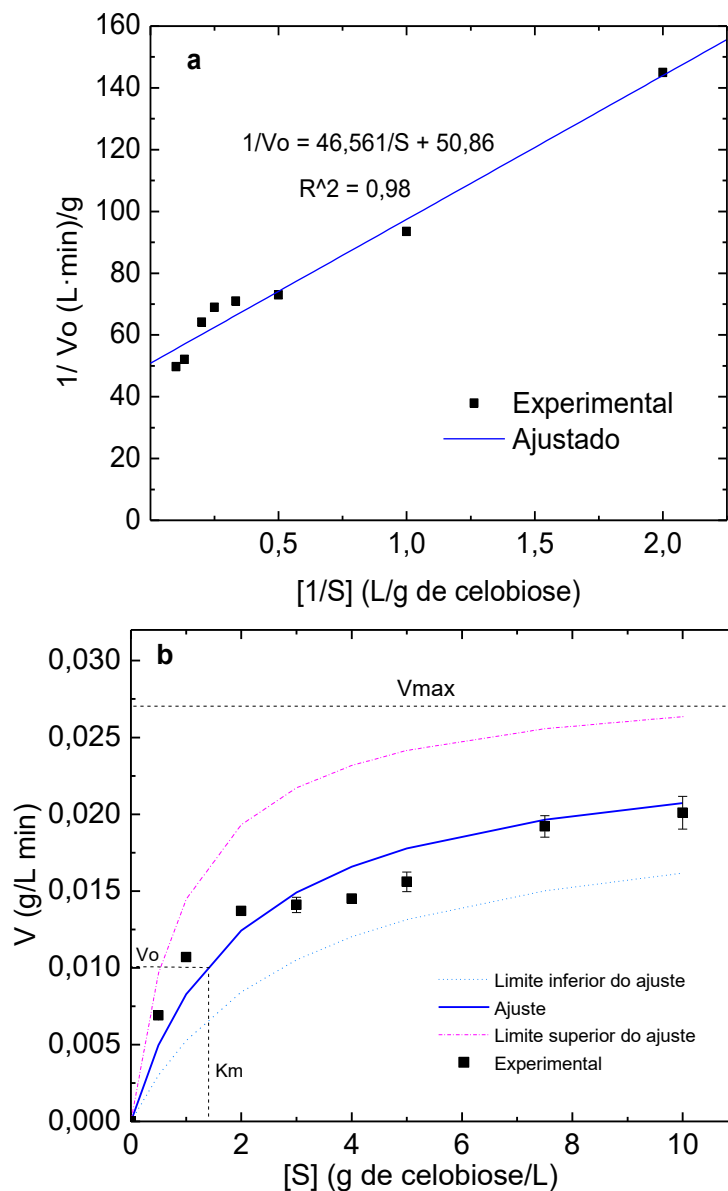
A inibição da enzima β -glicosidase de *Aspergillus niger* causada pela adição de glicose no começo da hidrólise enzimática de D-(+)-Celobiose foi representada através da curva de saturação de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk. As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, apresentadas, mostram o perfil de inibição por produto para cada concentração de glicose estudada.

Na Figura 4.2 são apresentados os gráficos a) duplo recíproco e b) Michaelis- Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança. As análises foram realizadas com 0,0767 CBU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm.

Tabela 4.3: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por glicose da enzima β -glicosidase na hidrólise de D-(+)-celobiose.

Parâmetro	Melhores valores ajustados (g/L)	Intervalo de confiança 95%
K_m	1,997 \pm 0,489	1,004 a 2,989
K_i	3,825 \pm 0,889	1,988 a 5,661
V_{max}	0,019 \pm 0,248	0,021 a 0,029
R^2 (global)	0,947	

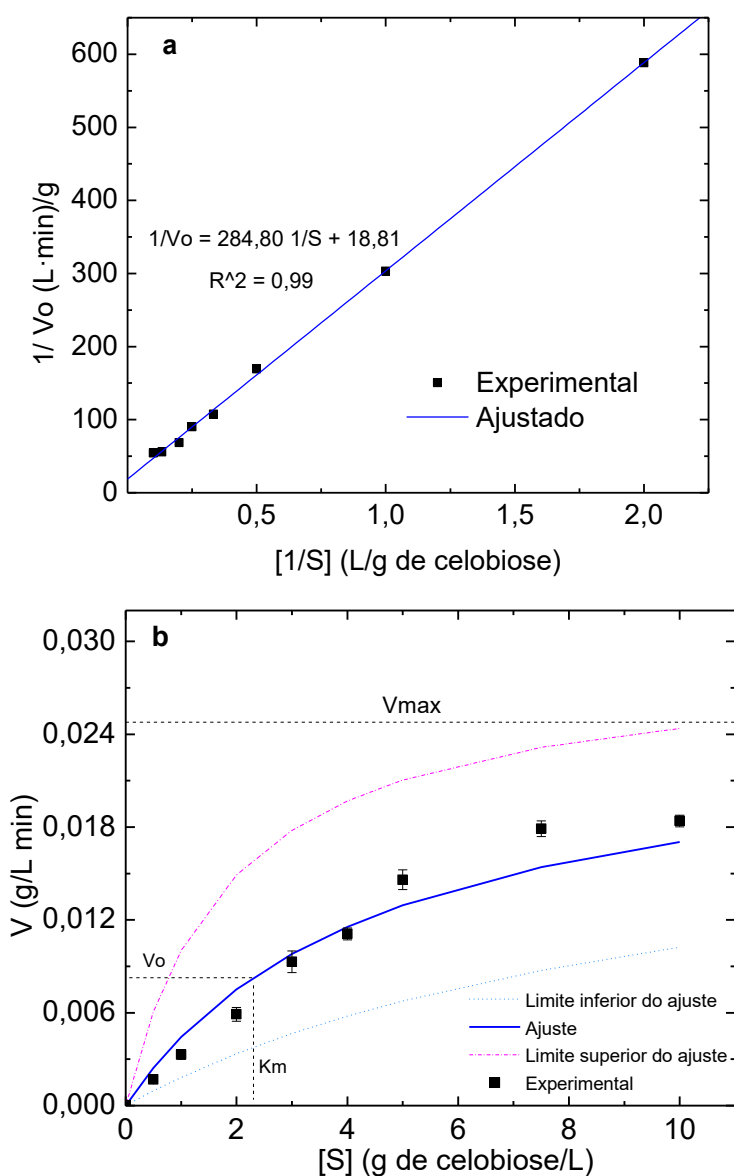
Figura 4.2: Perfil cinético da hidrólise de celobiose sem adição de glicose.



Na Figura 4.3 são apresentados os gráficos a) duplo recíproco e b) Michaelis- Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança.

As análises foram realizadas com 0,0767 CBU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm.

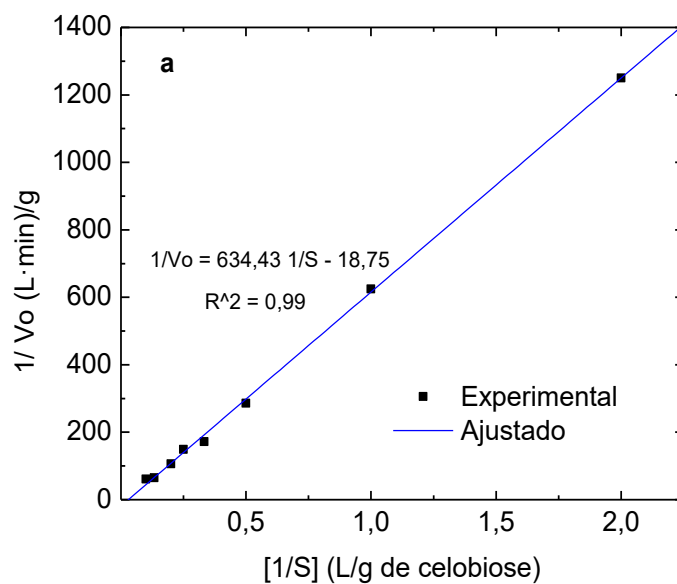
Figura 4.3: Perfil cinético da hidrólise de celobiose com adição de 5 g/L de glicose.

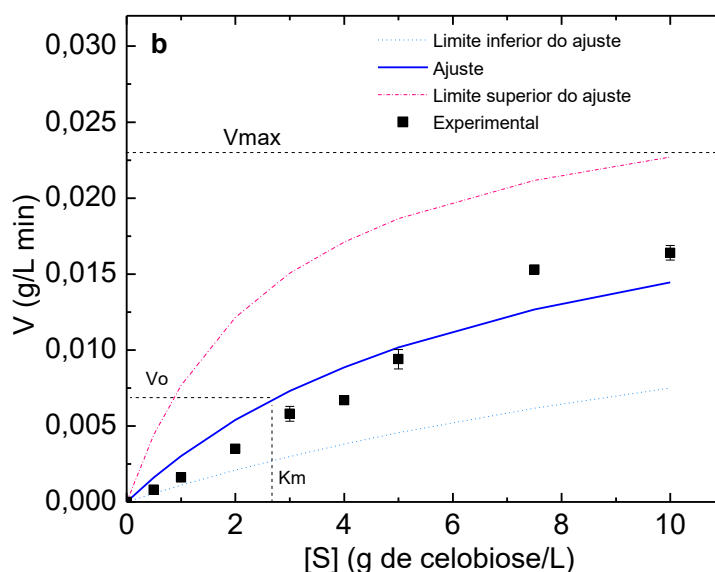


Na Figura 4.4 são apresentados os gráficos a) duplo recíproco e b) Michaelis- Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão

experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança. As análises foram realizadas com 0,0767 CBU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm.

Figura 4.4: Perfil cinético da hidrólise de celobiose com adição de 10 g/L de glicose.





Observando os gráficos de Michaelis Menten (Figura 4.2b, 4.3b e 4.4b), pode-se notar que na faixa de concentração de celobiose avaliada (de 0 a 10 g/L) não parece haver inibição por substrato em nenhuma das concentrações de inibidor (glicose) consideradas, já que não há diminuição da velocidade inicial com o aumento da concentração de celobiose. CALSAVARA et al., (1999) avaliaram a inibição por substrato da mesma enzima usada no presente trabalho numa faixa de substrato (celobiose) de 0 a 0.06 moles/L (~0-20 g/L) e chegaram a uma conclusão diferente, de que a partir de aproximadamente 10 mM (~3.4 g/L) havia inibição por substrato. Os autores não descreveram seus cálculos de velocidade inicial de hidrólise para possibilitar comparação com o método usado do presente trabalho. DEKKER, (1986) não encontrou inibição da β -glicosidase por celobiose trabalhando até 10 mM (~3.4 g/L). GROUS *et al.*, (1985) não encontraram inibição de β -glicosidase produzida por *T. reesei* rut C30 por celobiose até 120 mM (~41 g/L), mas para a β -glicosidase de *A. niger* determinaram inibição por substrato a partir de aproximadamente 20 mM (~6.8 g/L). Estes autores, no entanto, determinaram a velocidade inicial de reação apenas no tempo de 10 min, o que pode levar a erros grandes, já que o coeficiente angular da reta será determinado apenas com o ponto zero e um único ponto experimental (Figura 2.10). ANDRIĆ *et al.* (2010b), em um trabalho de revisão, concluíram que há inibição por substrato da celobiose na

β -glicosidase em concentrações maiores que 3-10 g/L de celobiose. No presente trabalho não foi encontrada inibição por substrato até 10 g/L de celobiose e, embora não tenham sido avaliadas concentrações maiores de substrato para saber a partir de que concentração ocorre inibição, isso não chega a ser um problema para o desenvolvimento de modelos matemáticos de hidrólise, já que na reação de hidrólise a adição de β -glicosidase é feita para evitar o acúmulo de celobiose, que inibe fortemente a hidrólise de celulose à celobiose catalisada pelas endo e exo glicosidases, e a concentração deste açúcar não ultrapassa 10 g/L.

Os gráficos de Lineweaver-Burk podem ser usados para determinar qual o tipo de inibição por produto. Assim, os gráficos mostrados anteriormente (Figura 4.2a, 4.3a e 4.4a) foram plotados em um único gráfico; na Figura 4.5 observa-se que o gráfico sugere que a enzima β -glicosidase é inibida competitivamente pela glicose, embora as retas não estejam se encontrando exatamente em cima do eixo $1/V_0$, este desvio é devido ao erro experimental. Na inibição não competitiva o K_m seria constante e as retas se encontrariam em $y=0$ e $x=-1/K_m$, na inibição incompetitiva as retas deveriam ser paralelas e na inibição mista as retas só poderiam se encontrar ao lado esquerdo do eixo y (em valores negativos de $1/S$).

Calsavara et al. (1999) consideraram inibição da β -glicosidase por substrato (celobiose, não competitiva ou incompetitiva) e por produto (glicose, competitiva ou não competitiva), mas não conseguiram determinar quais os tipos de inibição (para substrato ou produto), já que obtiveram parâmetros cinéticos negativos. Dekker (1986) determinou a inibição desta enzima por glicose como competitiva parcial. Grous et al. (1985) definiram a inibição de β -glicosidase de *A. niger* por celobiose como sendo do tipo competitivo e consideraram inibição por substrato, mas não conseguiram propor um modelo que descrevesse toda a região de concentração de celobiose avaliada. Propuseram um modelo para descrever o intervalo de 0 a 11 mM (~3.4 g/L) e outro para descrever o intervalo de 28 a 140 mM (~9.6 g/L a 41 g/L), mas a

faixa de 11 a 28 mM não foi bem descrita. Alfani et al. (1990) concluíram que a inibição da β -glicosidase de *A. niger* por celobiose era do tipo mista.

Figura 4.5: Gráfico Lineweaver-Burk para a hidrólise de D-(+)-Celobiose com adição de diferentes concentrações de glicose como inibidor da enzima β -glicosidase.

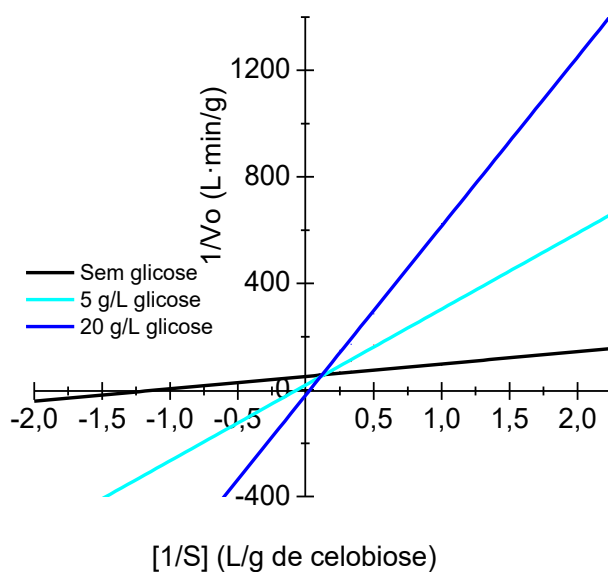
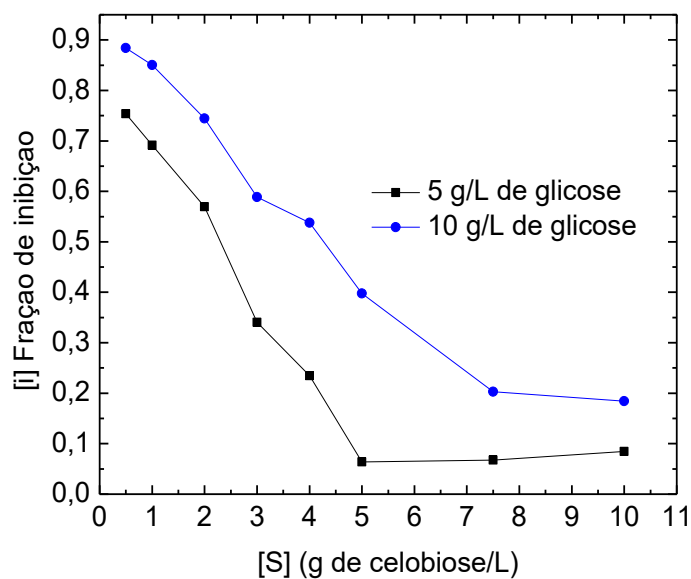


Figura 4.6: Gráfico da fração de inibição para a hidrólise D-(+)-Celobiose com adição de concentrações diferentes de glicose como inibidor da enzima β -glicosidase



A Figura 4.6 mostra o perfil da fração de inibição da enzima β -glicosidase em função da concentração de substrato, sendo a fração de inibição calculada como $i=1-V_0'/V_0$, onde V_0' é a velocidade com inibidor e V_0 é a velocidade quando não foi adicionado inibidor. Nota-se, que houve uma diminuição da velocidade inicial de reação quando a glicose foi adicionada, mas a fração de inibição diminui com o aumento da concentração de substrato, o que quer dizer que um incremento da concentração de celobiose mitiga o efeito inibitório que a glicose provoca na celobiase. Este comportamento é compatível com a inibição do tipo competitiva, em que o substrato e o inibidor competem pelo sítio ativo da enzima. Nota-se da Figura 4.5, também, que a fração de inibição aumenta com o aumento da concentração de inibidor. HOLTZAPPLE *et al.*, (1990) avaliaram a inibição da β -glicosidase (Novozym 188) por celobiose e também concluíram que o efeito inibitório aumentava com o aumento da concentração de inibidor e diminuía com o aumento da concentração de substrato, embora não tenham determinado o tipo de inibição.

BELTRAME *et al.* (1984), em um trabalho de modelagem cinética, consideraram inibição competitiva da β -glicosidase de *A. niger* por glicose, além de inibição por substrato (celobiose).

A estimativa dos parâmetros cinéticos para a equação de inibição competitiva ($v = (V_{max} [S]) / (K_m (1 + [I]/K_i) + [S])$) da β -glicosidase por glicose foi feita por ajuste não linear usando o software GraphPad Prism. Os parâmetros cinéticos determinados, assim como os valores de desvio padrão, estão mostrados na Tabela 4.3. As Figuras 4.2b, 4.3b e 4.4b mostram os dados experimentais e o modelo ajustado. A tentativa de determinar os parâmetros considerando a inibição competitiva parcial como sugerido por Dekker (1986) resultou em parâmetros cinéticos negativos (não mostrados).

Tabela 4.4: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por glicose da enzima β -glicosidase na hidrólise de D-(+)-celobiose.

Parâmetro	Melhores valores ajustados (g/L)	Intervalo de confiança 95%
K_m	1,997 ± 0,489	1,004 a 2,989
K_i	3,825 ± 0,889	1,988 a 5,661
V_{max}	0,019 ± 0,248	0,021 a 0,029
R^2 (global)	0,947	

A constante de inibição K_i indica quão potente o inibidor é, já que determina a concentração de inibidor requerida para reduzir a velocidade de reação à metade da velocidade máxima quando a concentração de substrato é baixa. Portanto, a constante de inibição K_i obtida mediante simulação nessa análise aponta que a inibição exercida pela glicose sobre a enzima β -glicosidase é alta (comparada com resultados da literatura), porém, sendo competitiva, pode ser revertida incrementando a concentração de substrato (CHANG, 2005; XIAO *et al.*, 2004; BELTRAME *et al.* 1984; BELTRAME *et al.*, 1984; DEKKER 1986).

ANDRIĆ *et al.*, (2010b) fizeram uma revisão de diversos trabalhos que avaliaram a inibição das enzimas do complexo celulolítico (ver Tabela 2.5) e mostraram que a inibição de β -glicosidase de *A. niger* por glicose quando o substrato era celobiose foi considerada competitiva, não competitiva e mista por diferentes autores. No entanto, todos os autores chegaram a uma faixa de valores de K_i similar, entre 0,04 e 0,6 g/L, indicando inibição mais forte do que a encontrada no presente trabalho ($K_i = 3,825$ g/L). Uma análise do único trabalho que considera inibição competitiva e usa a enzima da mesma fonte e o substrato celobiose (Grous *et al.*, 1985) mostra que os autores determinaram a velocidade inicial com um único ponto, o que pode levar a erros experimentais maiores, e em 1h de hidrólise, quando pode ter havido formação de glicose devido à própria reação, fazendo com que a inibição pareça maior.

4.6 Cinética de inibição da enzima celulase por glicose,

xilose e celobiose

Nesta seção foi avaliada a inibição da enzima celulase de *Trichoderma reesei* ocasionada pela adição de celobiose, glicose e xilose no início da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar submetido a dois tipos de pré-tratamento como substratos.

4.6.1 Inibição da enzima celulase utilizando BH como substrato

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente foi utilizado como substrato para o estudo de inibição da enzima celulase. Como foi detalhado no *item 4.1*, este bagaço possui 60,23% de celulose, 0,71% de hemiceluloses, 29,94% de lignina e 5,34% de cinzas na sua composição. Todos os resultados que serão apresentados estão baseados na celobiose formada durante o tempo da hidrólise enzimática, sendo usada a glucono- δ -lactona para inibir a ação da β -glicosidase.

4.6.1.1 Inibição por glicose

A inibição causada pela adição de glicose no começo da hidrólise de bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico catalisada pela enzima celulase foi representada através dos perfis cinéticos de Michaelis-Menten e o recíproco Lineweaver-Burk.

Nas Figura 4.7, 4.8 e 4.9 são apresentatos os gráficos a) duplo recíproco e b) Michaelis- Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança. As análises foram realizadas com 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm.

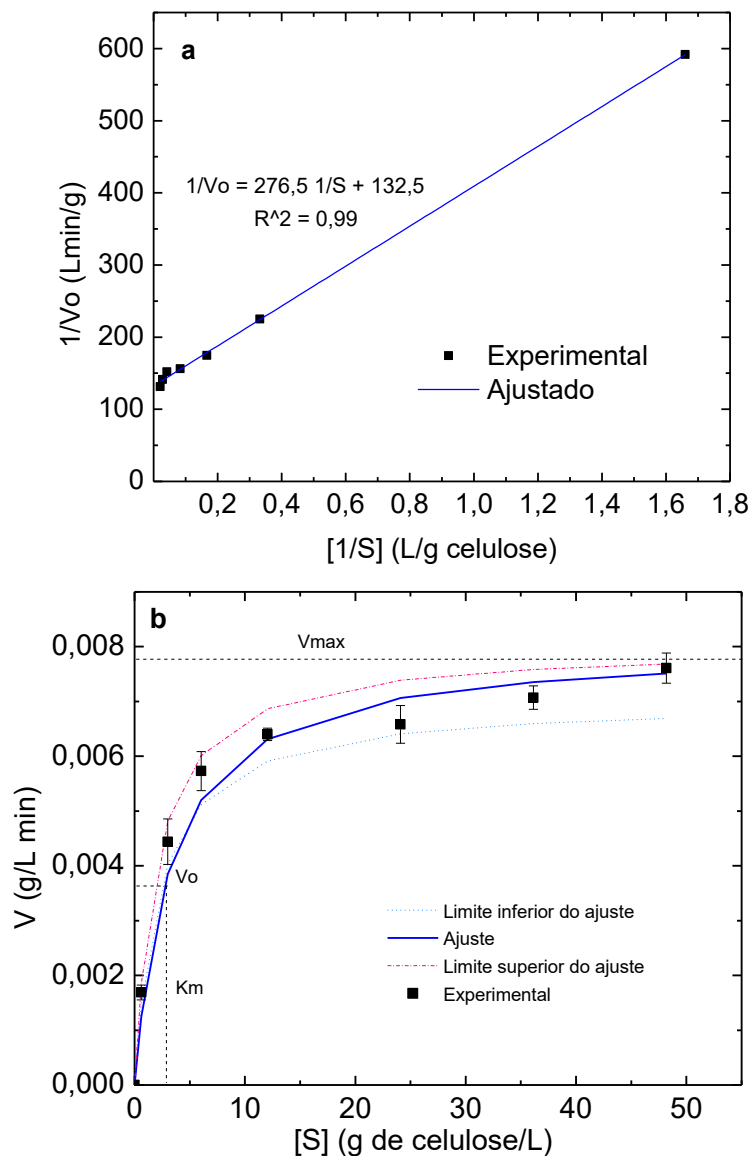
Figura 4.7: Perfil de cinético de hidrólise de BH sem adição de glicose.

Figura 4.8: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 5 g/L de glicose.

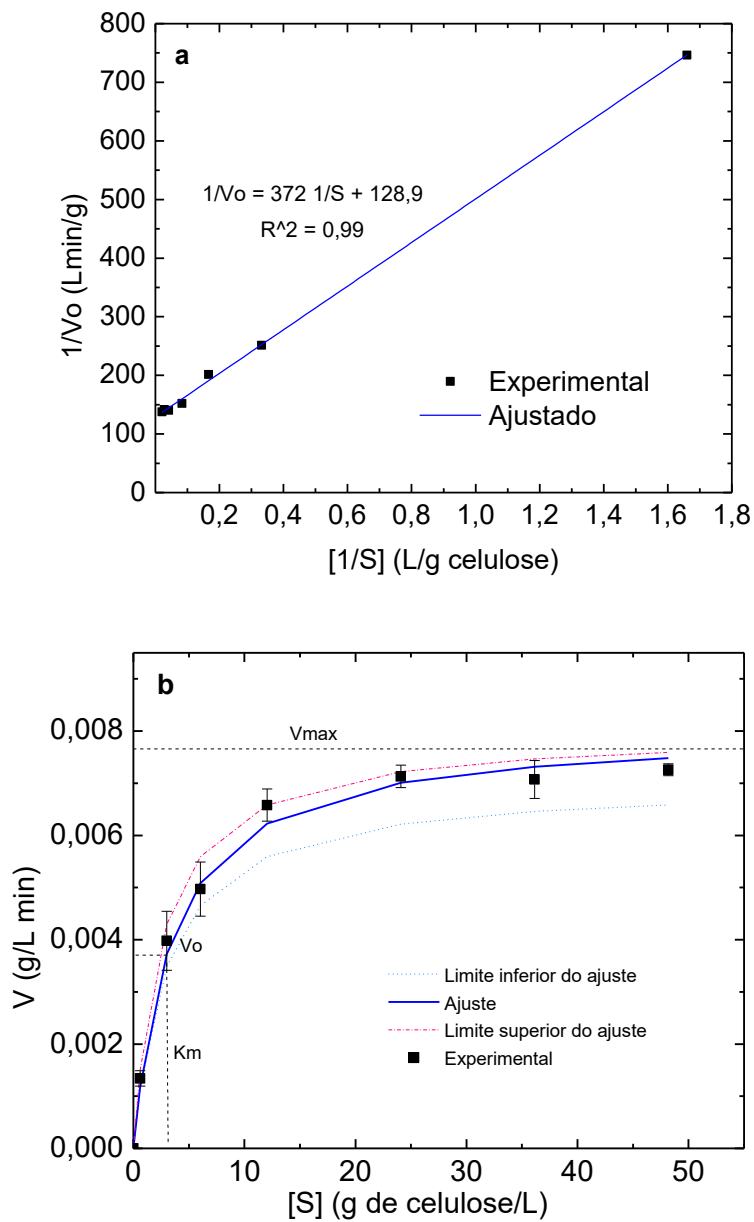


Figura 4.9: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 20 g/L de glicose.

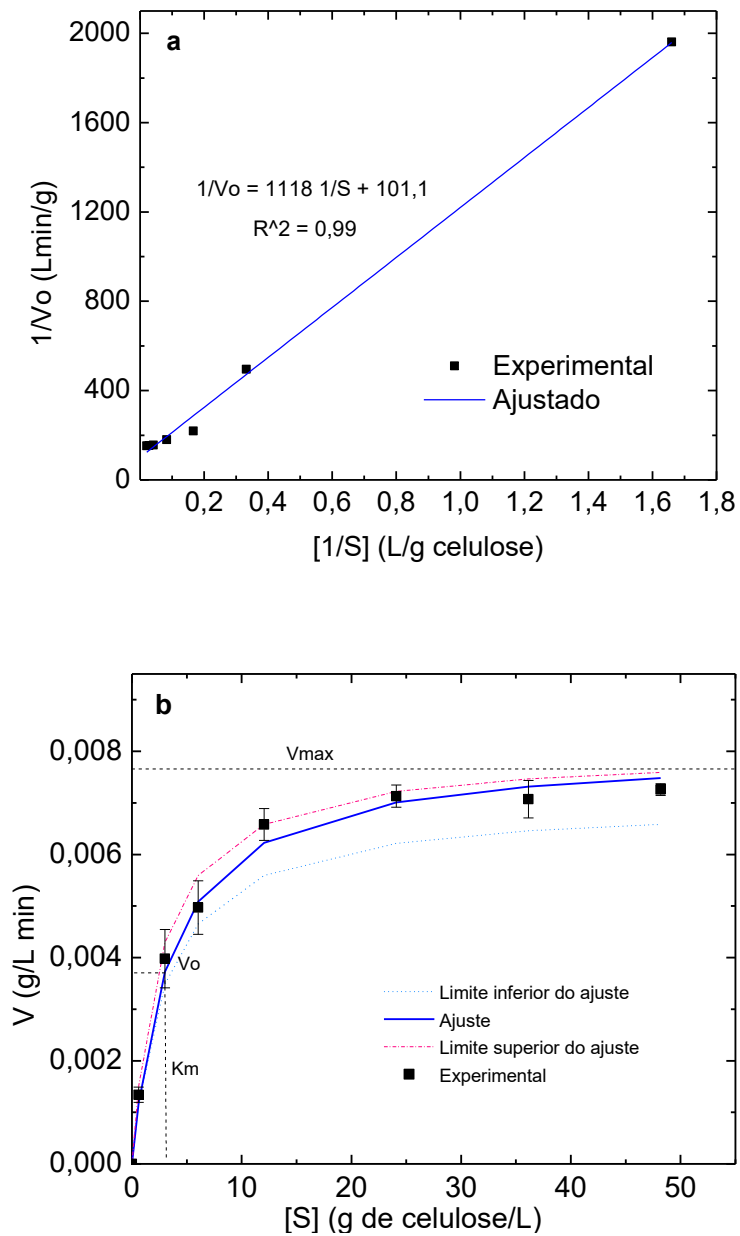
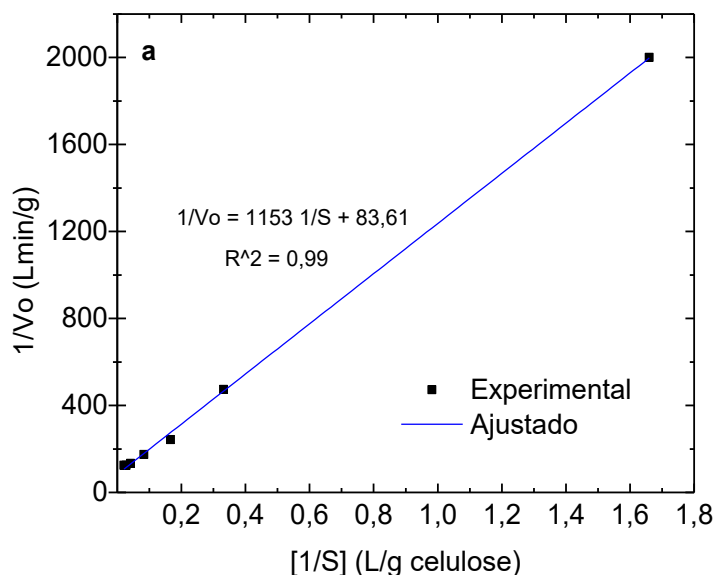


Figura 4.10: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 60 g/L de glicose.



A fim de conseguir um resultado satisfatório, a condição de 60 g/L de glicose foi suprimida, já que impedia um ajuste que permitisse a compreensão adequada desses resultados. Por tanto, o gráfico de Michaelis-Menten não é apresentado.

A Figura 4.11, que reúne as informações contidas nas Figuras 4.7a, 4.8a, 4.9a e 4.10a, mostra que enzima celulase também apresenta inibição competitiva pela glicose, uma vez que as linhas que representam cada concentração de glicose analisada possuem praticamente o mesmo ponto de intercepção com o eixo $1/V_o$. Os parâmetros para a equação que descreve a inibição competitiva ($v = (V_{max} [S]) / (K_m (1 + [I]/K_i) + [S])$) foram estimados usando o software Origin 8.0 e seus valores são reportados na Tabela 4.4, assim como os desvios padrão e os intervalos de 95% de confiança.

Figura 4.11: Gráfico Lineweaver-Burk para a hidrólise BH com adição de diferentes concentrações de glicose como inibidor da enzima celulase.

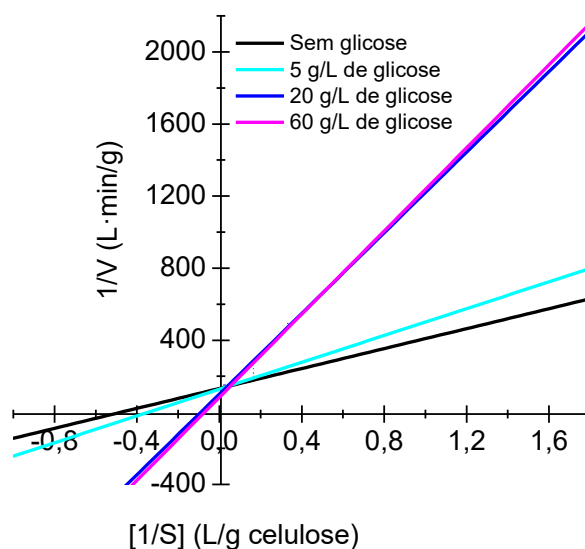


Tabela 4.5: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por glicose da enzima celulase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico.

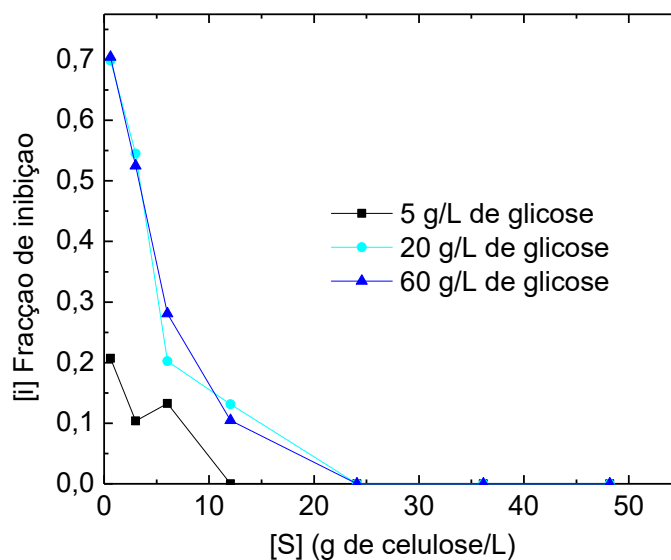
Parâmetro	Melhores valores ajustados (g/L)	Intervalo de confiança 95%
K_m	$2,101 \pm 0,058$	1,990 à 2,217
K_i	$14,950 \pm 0,737$	13,60 à 16,48
V_{max}	$0,008 \pm 0,000$	0,007 à 0,008
R^2 (global)	0,963	

A partir dos resultados mostrados na Tabela 4.4 percebe-se que a constante de inibição K_i é baixa (frente a valores reportados na literatura) indicando que para as condições do sistema estudado a inibição (competitiva)

da glicose sobre a atividade da enzima celulase é alta sendo bastante prejudicial para o desempenho na hidrólise do bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico.

Calculando a fração de inibição, nota-se que ela aumenta quando aumenta a concentração do inibidor de 5 para 20 g/L de glicose, mas não se altera de 20 a 60 g/L de glicose, como observado na Figura 4.12. A fração de inibição diminui com o aumento da concentração de substrato (celulose) e chega a zero a partir de aproximadamente 10 g/L de celulose quando a quantidade de inibidor adicionada é de 5 g/L e a partir de aproximadamente 25 g/L de celulose quando adicionamos maiores quantidades de glicose no início da reação. Este comportamento é esperado quando a inibição é do tipo competitiva.

Figura 4.12: Gráfico da fração de inibição para a hidrólise de BH com adição de concentrações diferentes de glicose como inibidor da enzima celulase.



A comparação qualitativa e quantitativa entre os resultados existentes na literatura não é simples devido à grande diferença nas condições experimentais empregadas nas análises, tais como pH, temperatura, tipo e concentração de substrato, enzimas de diferentes fontes, concentração de glicose adicionada e tempo de reação, entre outros (DEKKER, 1986). Embora numerosos estudos sobre inibição de celulase tenham sido efetuados com diferentes substratos de

celulose, como celulose em pó (SolkaFloc), resíduos têxteis de algodão e *Cellulose azure*, Avicel, CMC, α -celulose, entre outros, poucos trabalhos foram realizados com materiais lignocelulósicos, com alta concentração de substrato e adição de glicose no início da hidrólise enzimática.

ANDRIĆ *et al.*, (2010b) estudaram a inibição do complexo comercial Celluclast® por glicose durante a hidrólise de Avicel, mas não usaram nenhum inibidor para a atividade de β -glicosidase. Definiram o grau de inibição como V_0'/V_0 , onde V_0' é a velocidade com inibidor e V_0 é a velocidade quando não foi adicionado inibidor. O grau de inibição que definiram é igual a $1-i$, onde i é a fração de inibição como definida na Figura 4.12. A velocidade foi medida em relação à concentração de glicose medida após 30 minutos de reação. Determinaram um grau de inibição de 0,45 para concentração de Avicel de 20 g/L e adição de 20 g/L de glicose, correspondente a fração de inibição $i = 0.55$, valor muito diferente do obtido no presente trabalho, como pode ser observado na Figura 4-12, que mostra que a fração de inibição nestas condições é praticamente igual a zero. A diferença pode ser atribuída ao substrato diferente usado por aqueles autores. XIAO *et al.*, (2004) mediram as velocidades apenas no tempo de 30 minutos, esta medida pode conter erros maiores do que quando se determina a velocidade inicial usando vários pontos experimentais como foi feito no presente trabalho. Ainda, aos 30 minutos já pode ter havido liberação de açúcares da própria hidrólise, inclusive celobiose, que influencia nos resultados. Outro ponto é que, como os autores mediram a liberação de glicose, não estavam avaliando somente a inibição da celulase, mas também da β -glicosidase, enzima que transforma a celobiose em glicose. No presente trabalho o produto avaliado foi a celobiose e a atividade de β -glicosidase foi inibida usando glucono- δ -lactona.

Com o propósito de indagar a importância da inibição por glicose e a sua respectiva remoção *in-situ*, XIAO *et al.* (2004) realizaram ensaios de hidrólise de palha de trigo pré-tratada hidrotermicamente com o sistema celulolítico

Celluclast 1.5L suplementado com β -glicosidase (Novozym 188). As hidrólises foram executadas durante 96 horas, com concentração inicial de substrato de 2% (m/m) a 50 °C e pH de 5,0; adicionando 10, 20, e 40 g/L de glicose no começo da reação; encontrando que a velocidade inicial de formação de glicose foi reduzida rapidamente conforme a reação prosseguiu, independentemente da concentração de glicose adicionada. Foram determinadas as constantes de Michaelis e constante de inibição sendo 0,16 g/L e 1,15 g/L, respectivamente, mediante um modelo de inibição não competitivo, o qual ajustou satisfatoriamente os dados experimentais, valores muito diferentes dos encontrados no presente trabalho.

ANDRIĆ *et al.* (2010a) fizeram uma revisão de trabalhos na literatura e mostraram que não existe consenso sobre qual o mecanismo de inibição das celulasas por glicose, que foi descrito como competitivo, incompetitivo e não competitivo, e nem mesmo sobre a faixa de valores de K_i , sendo determinados valores de 0.1 a 319 g/L em diferentes trabalhos. Eles concluem que a inibição varia significativamente entre sistemas com diferentes substratos, dosagens enzima:substrato, concentrações de glicose, etc. Concluem também que a análise da inibição é complicada pela presença de β -glicosidase nos complexos enzimáticos e pela natureza multi-enzimática da reação, além do fato desta ser heterogênea.

4.6.1.2 Inibição por xilose

Foi avaliado o efeito inibitório causado sobre a enzima celulase pela adição de 2,5, 5 e 10 g/L de xilose ao início da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico.

Nas Figuras 4.13, 4.14 e 4.15 são apresentatos os gráficos a) duplo recíproco e b) Michaelis- Menten, a curva corresponde ao modelo ajustado no software GraphPad Prism 8.0. As barras de erro correspondem ao erro padrão

experimental. As linhas tracejadas correspondem aos limites superior e inferior da curva ajustada de velocidade considerando o intervalo de 95% de confiança. As análises foram realizadas com 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm.

Figura 4.13: Perfil de cinético de hidrólise de BH sem adição de xilose.

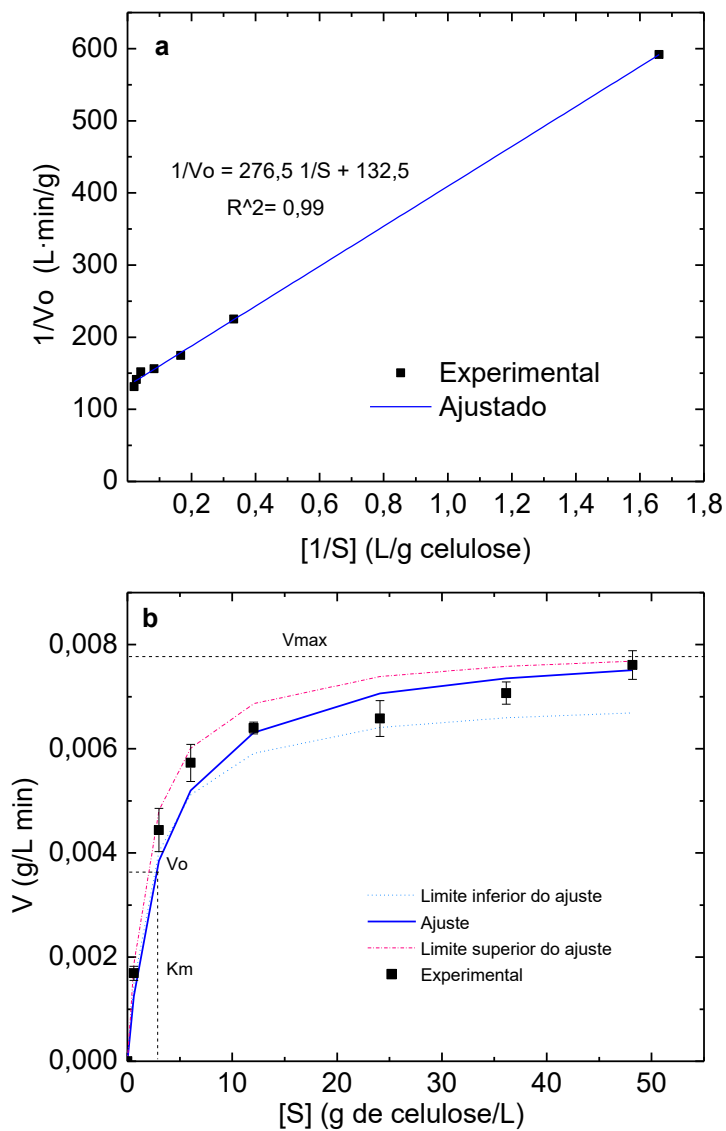


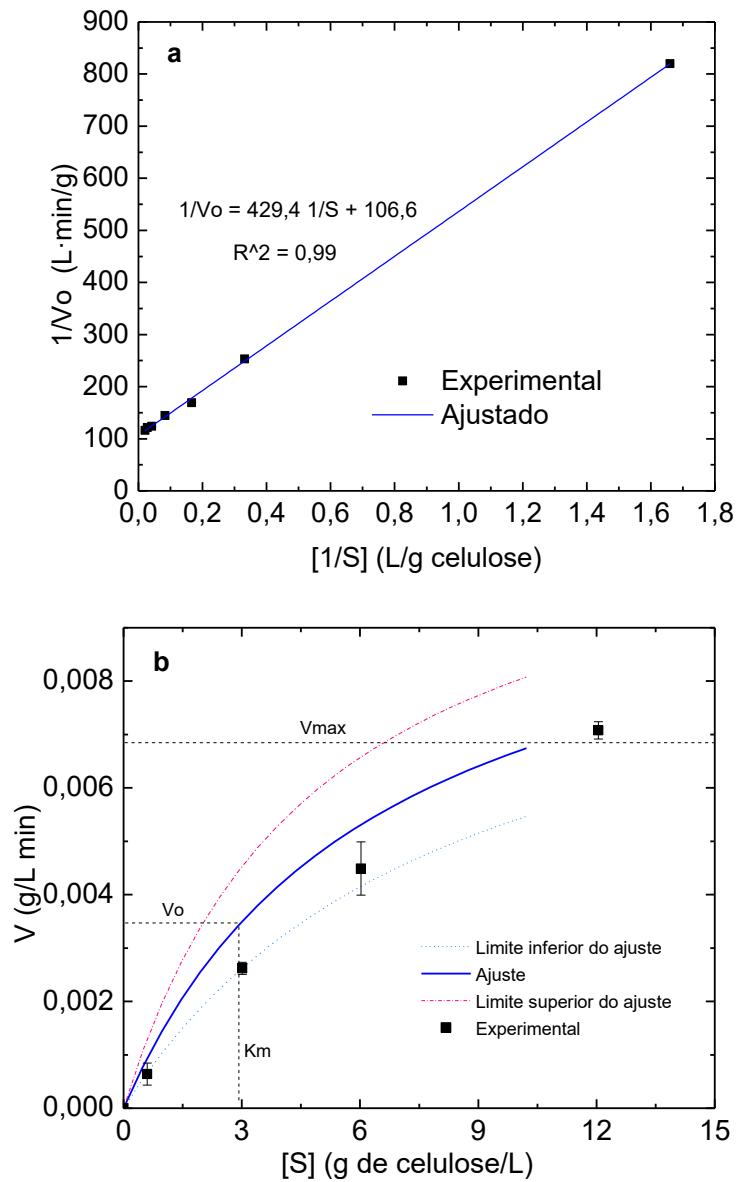
Figura 4.14: Perfil cinético de hidrólise de BH com adição de 2,5 g/L de xilose.

Figura 4.15: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 5 g/L de xilose.

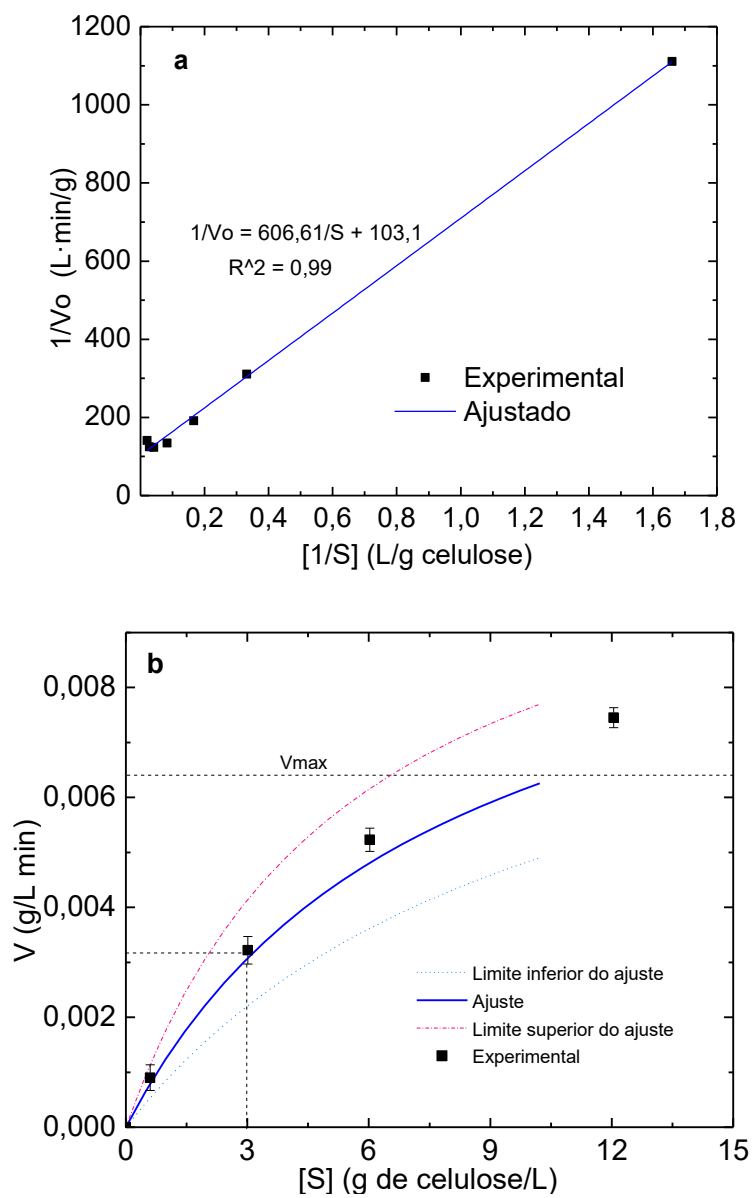
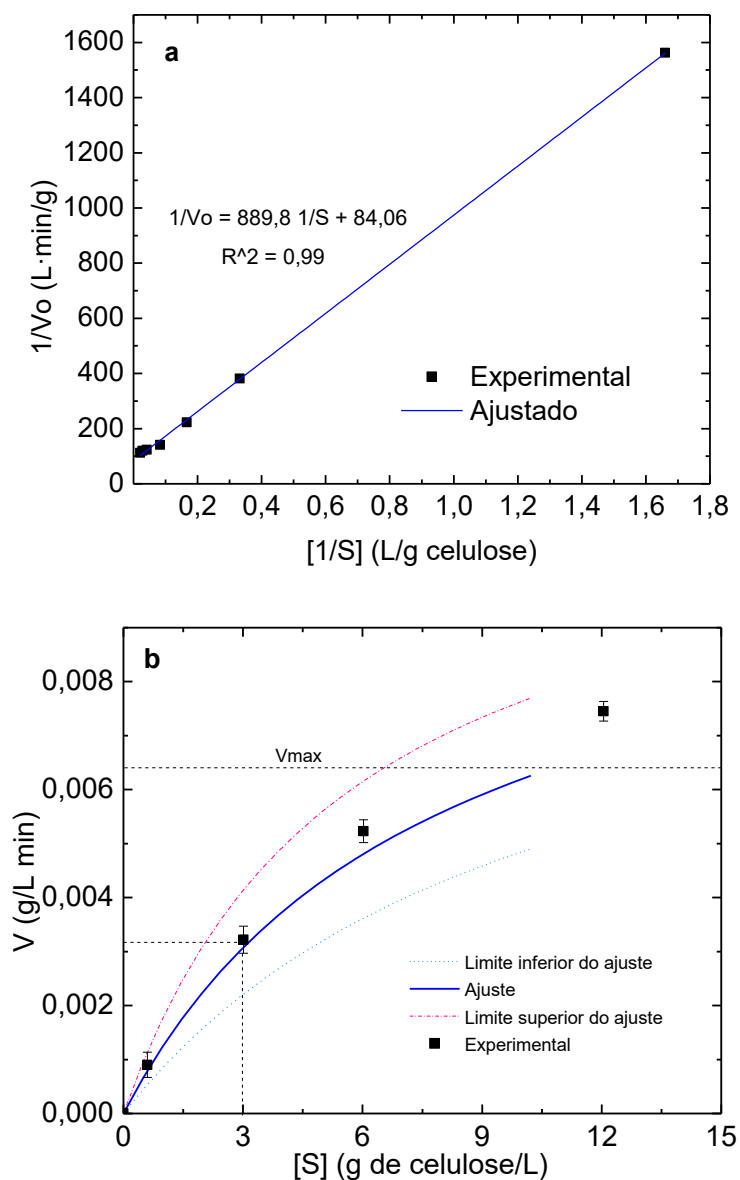


Figura 4.16: Perfil de cinético de hidrólise de BH com adição de 10 g/L de xilose.



Com a finalidade de analisar e comparar em maior detalhe os gráficos de Lineweaver-Burk que representam o efeito de inibição da xilose causado na celulase durante a hidrólise de BH, estes foram agrupados (Figura 4.18).

Na Figura 4.18 observa-se que todas as linhas representando as

concentrações de xilose estudadas apresentam um ponto de intercepção com o eixo vertical $1/V_0$ muito próximo o qual leva a inferir que o complexo celulase é inibida competitivamente pela glicose durante a hidrólise do BH. Os valores estimados através de um modelo de inibição competitiva são relacionados na Tabela 4.5.

Figura 4.17: Gráfico Lineweaver-Burk para a hidrólise BH com adição de diferentes concentrações de xilose como inibidor da enzima celulase.

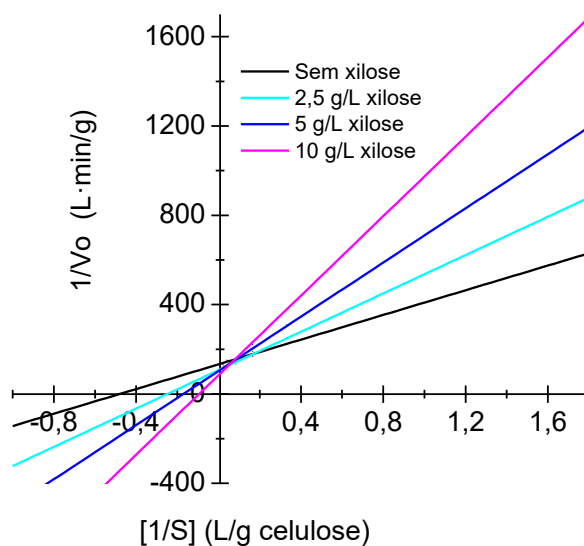
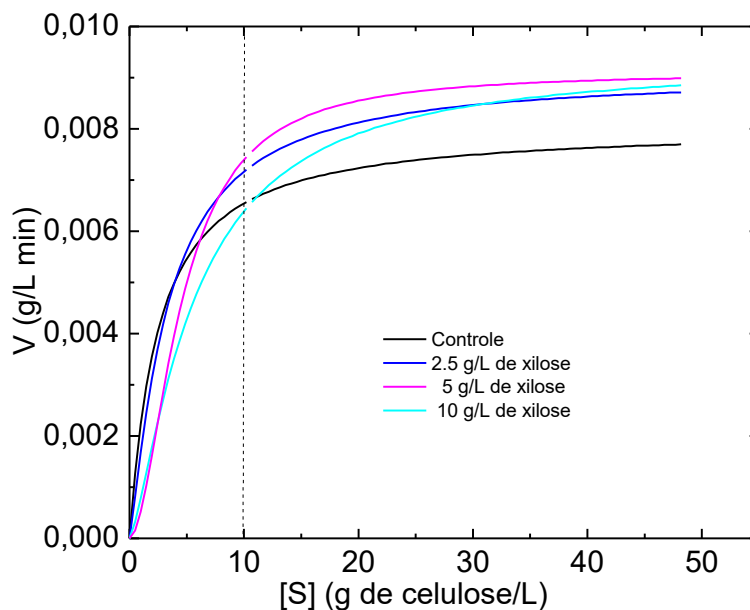


Figura 4.18: Perfil cinético Michaeliano da hidrólise de BH com adição de xilose em concentrações de 2.5, 5 e 10 g/L.



Como observado no perfil cinético da Figura 4.18 é evidente que há inibição por xilose, embora só é importante para baixas concentrações de celulose. Para concentrações de celulose até 5 g/L aproximadamente há inibição para todas as concentrações de xilose estudadas; em concentrações entre 5 e 10 g/L de substrato não existe inibição para a concentração de inibidor mais baixa (2.5 g/L), mas ainda existe para as outras concentrações de xilose. A partir de 10 g/L de celulose presente no BH o inibidor não tem mais efeito, o qual indica que a inibição exercida pela xilose na hidrólise do BH submetido a pré-tratamento hidrotérmico é de tipo competitiva uma vez o efeito diminui quando a concentração do substrato aumenta. A fim de confirmar dita premissa, foram realizadas várias análises considerando inibição competitiva no software GraphPad Prism 8.0. Primeiramente, foi feito um teste para todo o sistema estudado, é dizer que foram consideradas todas as concentrações de substrato (BH submetido a pré-tratamento hidrotérmico) mas dito sistema não conseguiu se ajustar a inibição do tipo competitiva. Seguidamente, foram feitos testes por intervalos de concentrações de substrato (0-10, 0-20, 0-30, 0-48 g/L de celulose) a partir do qual o sistema em concentrações de celulose entre 0 e 10 g/L conseguiu se ajustar para inibição do tipo competitiva. Os valores dos parâmetros ajustados podem ser observados na Tabela 4.5. Uma vez que não

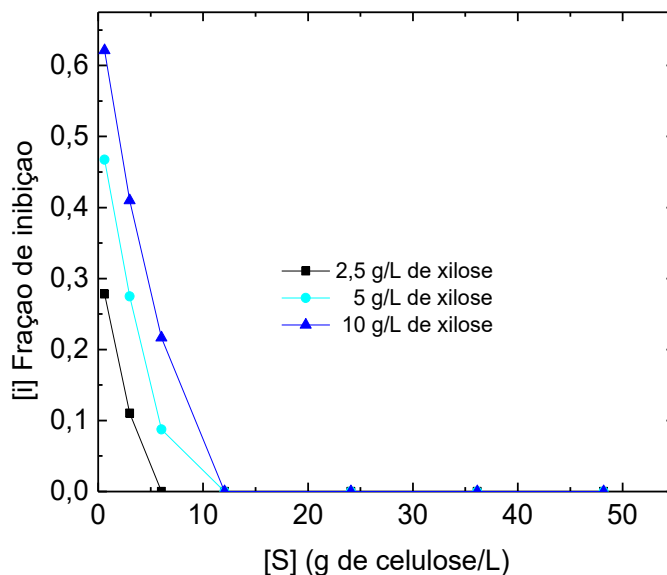
existe inibição por xilose no intervalo de concentração de substrato entre 10 e 48 g/L, foi realizado um ajuste cinético michaeliano sem inibição e os resultados estão em detalhe na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por xilose da enzima celulase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico (ajuste de inibição competitiva para concentrações de celulose entre 0 e 10 g/L).

Parâmetro	Melhores valores ajustados (g/L)	Intervalo de confiança 95%
K_m	$5,152 \pm 0,515$	4,216 a 6,32
K_i	$19,800 \pm 3,143$	14,68 a 28,15
V_{max}	$0,011 \pm 0,001$	0,010 a 0,012
R^2 (global)	0,961	

A constante de inibição $K_i=19,800\pm 3,143$ mostrada na tabela 4-5, obtida mediante ajuste de inibição competitiva no software GraphPad Prism 8.0 indica que o grau de inibição exercido pela xilose sobre a enzima celulase é moderada (comparada com a inibição causada pela xilose) para concentrações baixas de substrato (BH submetido a pré-tratamento hidrotérmico) e pode ser revertida incrementando sua concentração, o qual é confirmado pelo resultado do ajuste para uma cinética de Michaelis Menten (sem inibição) observados na Tabela 4.6 ratificando que não há inibição por xilose no sistema quando a concentração do substrato aumentou (a partir de 10 g/L celulose).

Figura 4.19: Gráfico da fração de inibição para a hidrólise de BH com adição de concentrações diferentes de xilose como inibidor da enzima celulase.



A Figura 4.19 mostra o perfil da fração de inibição da enzima celulase em função da concentração de celulose presente no BH. Percebe-se, que a fração de inibição diminui com o aumento da concentração de substrato, mas aumenta conforme a concentração de xilose aumenta. A fração de inibição (i) atinge o zero desde os 6 g/L de celulose aproximadamente, quando 2,5 g/L de xilose foram adicionados, e a partir de 12 g/L de celulose quando concentrações de 5 e 10 g/L de xilose foram adicionadas, ou seja, que o aumento da concentração de celulose alivia o efeito inibitório que a xilose ocasiona na enzima celulase, o qual é característico da inibição do tipo competitiva.

Tabela 4.7: Parâmetros cinéticos do estudo de inibição por xilose da enzima celulase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico (ajuste para concentrações de BH entre 10 e 48 g/L de celulose sem inibição).

	Concentração de xilose			
	0	2,5	5	10
Melhores valores ajustados				
Vmax	0,0081	0,0092	0,0095	0,098
Km	2,321	2,810	2,488	5,047
Erro padrão				
Vmax	1.17E-06	5.31E-06	1,96E-05	1.71E-05
Km	0,004	0,015	0,053	0,052
Intervalos de confiança				
Vmax	0,00806 a 0,00807	0,00923 a 0,00925	0,00949 a 0,00957	0,00981 a 0,00987
Km	2,314 a 2,329	2,779 a 2,84	2,383 a 2,595	4,944 a 5,151
	0,99	0,99	0,97	0,99

O mecanismo de inibição da enzima celulase por xilose tem sido escassamente relatado na literatura, não obstante alguns trabalhos têm estudado o efeito de inibição deste açúcar derivado das hemiceluloses causado na hidrólise de materiais celulósicos ou lignocelulósicos. ANDRIĆ *et al.* (2010a), ao invés de tentar distinguir o tipo de inibição, buscou determinar o grau de inibição na atividade da celulase ocasionado por diferentes monossacarídeos como xilose, galactose e manose na hidrólise de madeira conífera com o complexo celulolítico Celluclast 1.5L e β -glicosidase de Novozym 188, realizada a 50 °C, pH de 4,8 durante 30 minutos, encontrando que a velocidade de reação da hidrólise diminuiu cerca de 38%, 32% e 45% quando 100 g/L xilose, galactose e manose foram suplementados ao início da reação.

XIAO *et al.* (2004) desenvolveram um modelo cinético capaz de prever o desempenho da hidrólise de celulose onde a inibição por produto da enzima celulase, incluindo a xilose, foi considerado. Este modelo foi validado através de hidrólises realizadas com 10% de palha de milho com a enzima comercial CPN e sem suplemento de β -glicosidase a 45 °C, pH de 4,8 e 130 rpm, comprovando que a eficiência da hidrólise (24 h) foi reduzida de 53% para 46% quando 50 g/Kg de xilose foram adicionados no começo da reação, comparado com a hidrólise sem adição da mesma, causando um efeito inibitório significativo. A constante de inibição K_i teve um valor de 0,1 g/Kg e foi estimada mediante um modelo de inibição competitiva.

Similarmente, KADAM *et al.* (2004) realizaram estudo de inibição por produto na hidrólise enzimática de palha de arroz catalisada por celulase comercial (Zhaodong Richeng Enzymes) de *Trichoderma reesei*. Os ensaios foram realizados avaliando diferentes concentrações iniciais de substrato de 2, 2,5, 3,3, 5, 10 e 40 g/L, executada a 50 °C, pH de 4,8 durante 1 hora e com adição de uma mistura contendo 52% de glicose, 29,7% de xilose e 18,8 % de arabinose no começo da reação. Nesse trabalho é relatado que foram

realizados ensaios específicos com adição unicamente de cada monossacarídeo, mas os valores de concentração utilizados não foram reportados. As constantes de inibição K_i foram determinadas através de um modelo de inibição competitivo sendo 1,24, 0,33, 0,54 e 0,61 g/L para glicose, xilose, arabinose e a mistura deles, respectivamente. Este resultado indicou que a enzima celulase foi mais susceptível à inibição exercida pela xilose.

Por outro lado, ensaios de hidrólise catalisada por Spezyme CP celulase e β -glicosidase de Novozym 188 em presença de xilose, xilana e xilooligômeros, com a finalidade de analisar o impacto de cada composto sobre a conversão da celulose foram realizados por MIAO *et al.* (2012), onde 2% (m/v) de Avicel foram hidrolisados a 48°C, pH de 4.8 e 150 rpm, com adição de 1,67 e 12,5 mg/mL dos compostos anteriormente mencionados no início da reação. Após 96 horas de hidrólise notaram que a maior concentração utilizada (12,5 mg/mL) teve um maior efeito no rendimento final da hidrólise, sendo os rendimentos de 81% , 20%, 29% e 38% para a hidrólise controle, e adição de xilose, xilana e xilo-oligômeros respectivamente; e também compararam o efeito na velocidade inicial da reação causado pelos dois níveis de concentração estudados, reduzindo-se 9,7%, 34,5% e 23,8 % para a concentração de 1,67 mg/mL e 37,8 % , 53,2% e 81,9% para xilose, xilana e xilooligômeros, respectivamente; desta forma concluíram que os xilo-oligômeros possuem um efeito inibitório muito forte sobre a enzima celulase, expressando a relevância de aumentar a atividade de β -xilosidase e xilanase nos coquetéis enzimáticos empregados para hidrolisar os xilooligômeros completamente em xiloses com menos capacidade de inibição.

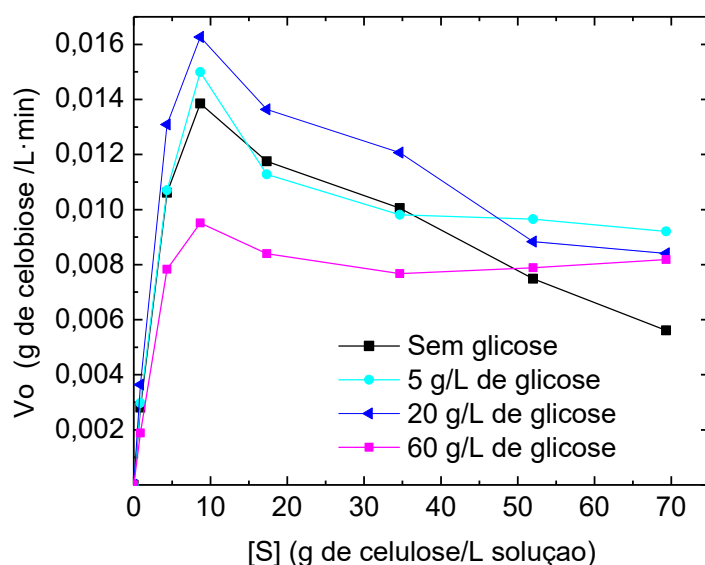
4.6.2 Inibição da enzima celulase na hidrólise de bagaço submetido a pré-tratamento organossolve (BO) como substrato

A fim de analisar o efeito que ocasiona o tipo de substrato no estudo de inibição da enzima celulase, o bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento organossolve também foi utilizado como substrato, com o objetivo de avaliar a diferença entre um substrato com menor quantidade de lignina. Como foi especificado no *item 4.1* este substrato está composto por 86,66% de celulose, 0,41% de hemiceluloses, 8,24% de lignina e 5,19 % de cinzas. Todas as análises foram executadas nas mesmas condições utilizadas para os ensaios com BH e os resultados apresentados estão baseados na formação de celobiose no decorrer dos experimentos.

4.6.2.1 Inibição por glicose

A Figura 4.20 mostra o perfil de inibição da hidrólise enzimática de BO catalisada pelo complexo celulolítico Celluclast 1.5L causado pela adição de glicose no início da reação. A hidrólise controle (sem suplemento de glicose) foi comparada com hidrólises feitas na presença de 5, 20 e 60 g/L de glicose.

Figura 4.20: Perfil cinético apresentado pela adição de glicose no início da hidrólise enzimática de BO, com 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona e 30 min de reação.



Como é observado, a Figura 4.20 mostra um perfil cinético bastante diferente do perfil clássico de Michaelis Menten. Para todos os casos analisados, incluindo o controle (sem adição de glicose), a velocidade de formação de celobiose V_o apresenta um máximo quando a concentração de celulose é aproximadamente de 10 g/L (ou 1%), e diminui com o aumento da concentração. Este comportamento a princípio leva a pensar em inibição por substrato. No entanto, nenhum dos artigos mais recentes sobre hidrólise enzimática de celulose cita inibição por substrato. MODENBACK e NOKES, (2012) fizeram uma revisão sobre hidrólise enzimática de biomassas em altas concentrações de sólidos e, embora apontem a inibição por produto como um dos principais desafios a serem superados para aumentar a conversão na hidrólise, não citam a existência de inibição por substrato, embora mostrem que a conversão diminui com o aumento da concentração de sólidos, o que foi chamado de “efeito sólido” por KRISTEN *et al.* (2009). Esta diminuição é atribuída a várias causas atuando em conjunto, entre elas problemas de transferência de massa, inibição por produto, baixo conteúdo de água disponível, etc.

No caso do presente trabalho o substrato (celulose) é o mesmo encontrado no bagaço hidrotérmico, embora os diferentes pré-tratamentos possam ter modificado suas características estruturais. LIAW e PENNER, (1990) estudaram a inibição da celulase por celulose insolúvel de dois tipos (Avicel e Solka-floc) e concluíram que havia inibição por substrato quando se usava Avicel, mas não Solka-foc. No entanto, quando os autores fazem um estudo variando a concentração de enzima, mostraram que a partir de 0,016 IU/mL de celulase já não se notava inibição por substrato com Avicel. No presente trabalho a concentração de enzima usada é quase 10 vezes maior do que este valor.

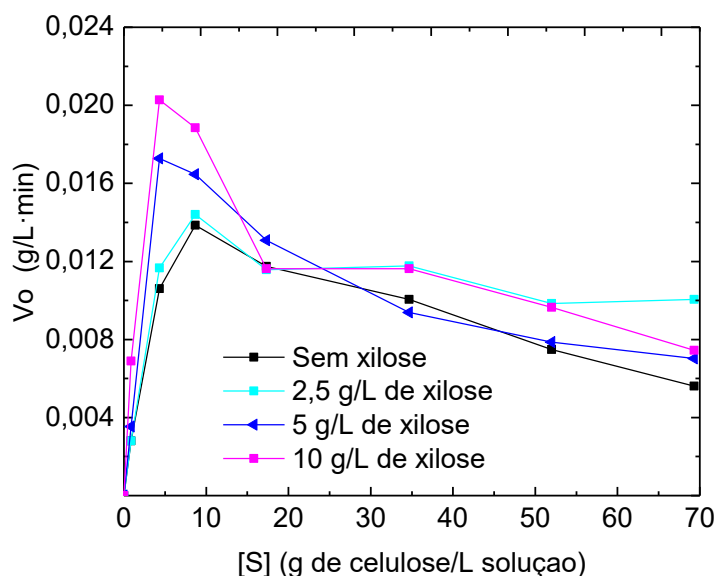
No entanto, existem outros fatores que devem ser considerados. O bagaço organossolve tem maior capacidade de absorção de água do que o bagaço hidrotérmico. Isso significa que o meio reacional apresentará maior

dificuldade de transferência de massa para maiores concentrações de substrato do que o que contém o bagaço hidrotérmico. Dados da tese de MACHADO (2013), que estudou a adsorção de celulasas no bagaço submetido a pré-tratamento idêntico ao do presente trabalho, mostram que o equilíbrio na adsorção só é atingido em aproximadamente 3h. Como os dados de velocidade inicial precisam ser retirados em tempos muito baixos de hidrólise (~20 min), este equilíbrio ainda não tinha sido atingido, especialmente para as maiores concentrações de substrato utilizadas, fazendo com que os cálculos de velocidade inicial sejam pouco confiáveis. Isso pode explicar os resultados inesperados de aumento da velocidade inicial com o aumento da concentração de inibidor (glicose) até 20 g/L. Deve-se ressaltar que quando os ensaios desta tese foram realizados, os resultados de MACHADO (2013) ainda não estavam disponíveis e a maioria dos trabalhos na literatura admitiam que o equilíbrio de adsorção era rápido.

4.6.3 Inibição por xilose

O perfil cinético exibido pela hidrólise de BO com a enzima celulase (Figura 4-18) e o efeito provocado pela suplementação de 2,5, 5 e 10 g/L de xilose no começo da reação mostra um comportamento similar ao apresentado nas análises feitas com BO com adição de glicose, mostrando um desvio com respeito ao perfil clássico michaeliano esperado, sugerindo também inibição por substrato, embora a mesma análise feita no item 4.6.2 continue válida.

Figura 4.21: Perfil cinético apresentado pela adição xilose no início da hidrólise enzimática de BO, com 0,05 FPU/mL de solução, pH de 4,8, 50 °C e 150 rpm em presença de 4g/L de glucono- δ -lactona.



O estudo da inibição por celulose na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é muito complexo devido a diferentes fatores como o tipo, a heterogeneidade (QING *et al.*, 2010) e reatividade (MANSFIELD *et al.*, 1999) do substrato, o grau de polimerização e índice de cristalinidade (DESAI e CONVERSE, 1997), a adsorção da enzima celulase na celulose, assim como na lignina (PURI, 1984), entre outros. O artigo de revisão de ANDRIC *et al.*, (2010b) cita que existe inibição por substrato, embora não mostre dados experimentais. HUANG e PENNER, (1991) citam inibição por substrato (Avicel e carboximetilcelulose) nas celulasas de *T. reesei*, mas, assim como no trabalho de LIAW e PENNER (1990), a inibição deixa de ser notada em maiores concentrações de enzima. O artigo de ORTEGA *et al.* (2001) fala de inibição por substrato, mas explicita que usa o termo para se referir a qualquer decréscimo na taxa de reação devida ao aumento da concentração de substrato, de forma que os autores estavam se referindo ao “efeito sólido” definido por KRISTEN *et al.*, (2009).

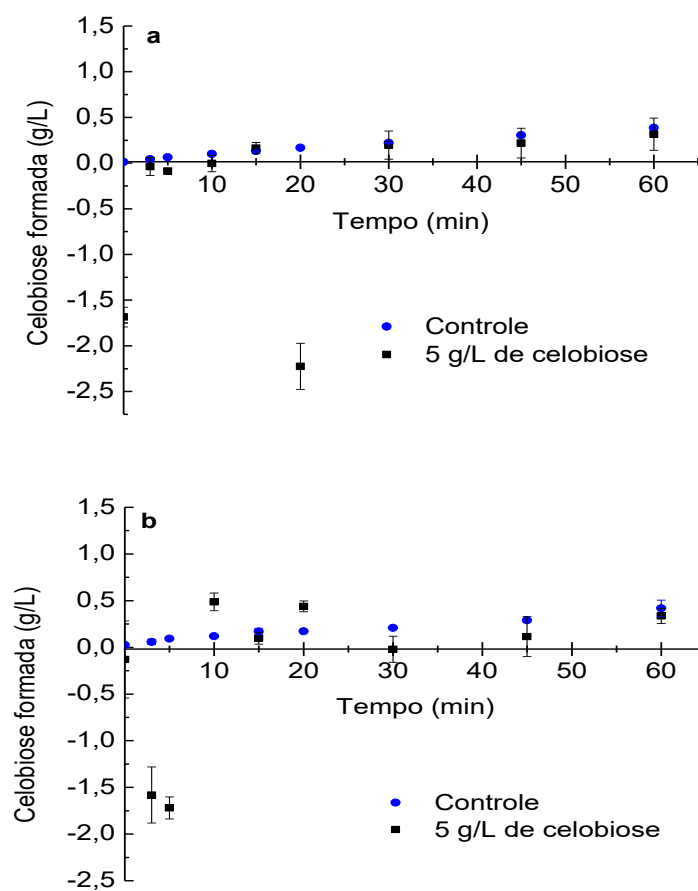
Devido a que a velocidade inicial de formação de celobiose nas análises com BO mostra-se crescente quando concentrações menores que 1% (m/v) de BO são utilizadas, um maior número de análises entre 0,1-1% (m/v) deveriam ser realizadas, uma vez que os resultados obtidos nesse trabalho em dito intervalo de concentrações não foi suficiente para uma correta determinação dos parâmetros cinéticos do mecanismos de inibição por substrato e por produto.

4.6.4 Inibição por celobiose

O mecanismo de inibição causado pelo suplemento de 2,5, 5 e 10 g/L de celobiose no início da hidrólise do bagaço de cana-açúcar submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico e organossolve não foi determinado devido a problemas na quantificação dos resultados por CLAE, uma vez que a quantidade de celobiose liberada durante o tempo de reação é muito pequena comparada com a concentração de celobiose adicionada, ocasionando problemas de super ou subestimação dos resultados. A fim de verificar se ditos inconvenientes eram causados pela coluna empregada nas análises (Aminex HPX-87H) ou inerentes às análises executadas, foram realizados testes com uma outra coluna (Aminex HPX-87P), obtendo-se a mesma tendência nos resultados.

As Figuras 4.20 a e 4.20 b, ilustram, a tendência dos perfis cinéticos apresentados pelas análises realizadas com adição de celobiose. Observa-se que para ambos os tipos de bagaço de cana utilizados na hidrólise os perfis não acompanham um padrão cinético definido, principalmente nos primeiros 20 minutos da reação, região na qual o comportamento deveria manter-se praticamente linear a fim de realizar um ajuste linear e assim determinar a velocidade inicial de reação para dita condição de concentração de substrato e concentração de inibidor adicionada.

Figura 4.22: Perfil cinético da hidrólise de bagaço a) BH , b) BO, com adição de 5 g/L de celobiose comparado com o respectivo controle, nos ensaios realizados com 8% (m/v) de sólidos a 50°C, pH de 4,8, 150 rpm, e 0,05 FPU/mL durante 60 minutos de reação.



5 Conclusões e recomendações para trabalhos futuros

Neste trabalho a cinética de inibição por produto e substrato durante a etapa da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a dois pré-tratamentos diferentes foi estudada. A hidrólise catalisada pelas enzimas celulase de *Trichoderma reesei* e β -glicosidase de *Aspergillus niger*, foi avaliada com o objetivo de estudar a influência na velocidade de sacarificação variando as concentrações de substrato.

- O estudo de inibição por glicose na β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozym188) com D(+)-celobiose como substrato revelou que esta enzima é inibida competitivamente pela glicose. A constante de inibição K_i foi $3,825 \pm 0,889$ g/L, obtida através do ajuste dos dados experimentais. Não foi observada inibição pelo substrato nas concentrações de celobiose empregadas nas análises;
- A utilização de glucono- δ -lactona inibiu de uma forma efetiva a atividade da enzima β -glicosidase presente no complexo celulolítico, uma vez que reduziu a conversão de celobiose para menos de 0,2%, o qual era relevante para realizar os estudos de inibição por produto na enzima celulase;
- As análises de inibição por produto na enzima celulase de *Trichoderma reesei* com bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento hidrotérmico mostraram que a glicose e a xilose reduziram a velocidade inicial de reação sem ocasionar uma redução relevante na velocidade máxima de formação de celobiose, indicando um mecanismo de inibição competitiva, onde a constante de inibição $14,950 \pm 0,737$ e $19,800 \pm 3,143$ g/L para glicose e xilose respectivamente, o qual adverte que a magnitude da inibição da glicose sobre a celulase é maior comparada com a xilose.

- A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento organossolve catalisada pela enzima celulase exibiu um perfil cinético bastante diferente do perfil clássico de Michaelis Menten. A velocidade de formação de celobiose V_0 apresentou um máximo quando a concentração de celulose é aproximadamente de 10 g/L (ou 1%), e diminui com o aumento da concentração; esta diminuição foi atribuída a várias causas atuando simultaneamente, entre elas problemas de transferência de massa, inibição por produto, baixo conteúdo de água disponível, etc. Estes fenômenos, além de diminuir drasticamente a velocidade de reação e, portanto, a conversão, afetaram o estudo de inibição por produto.
- A diferença dos resultados obtidos a partir das análises realizadas com os dois tipos de bagaço de cana-de-açúcar (BO e BH) confirmou que o estudo de inibição enzimática depende altamente do tipo de substrato utilizado, apesar de que as análises foram realizadas nas mesmas condições experimentais;
- Os estudos de inibição realizados com as enzimas celulolíticas, celulase e β -glicosidase, mostraram que as duas enzimas são inibidas pela glicose através de um mecanismo competitivo, porém comprovam que a inibição causada na β -glicosidase é muito maior do que na celulase, dado que a sua constante de inibição K_i é menor comparada com a da celulase, sendo $3,825 \pm 0,889$ e $14,950 \pm 0,737$ g/L para a β -glicosidase e celulase, respectivamente.
- A diferença dos resultados e parâmetros cinéticos obtidos nesse trabalho com a literatura corresponde sem dúvida à diversidade de materiais celulósicos e lignocelulósicos utilizados, à concentração e fonte das enzimas, como também às condições experimentais em que são realizados os experimentos, determinando que ditos parâmetros cinéticos são únicos e inerentes a cada sistema hidrolítico estudado.

- Os mecanismos de inibição considerados ajudaram na formulação do modelo proposto na tese de MOREIRA NETO (2016) uma vez que usou o mesmo complexo celulolítico e o mesmo substrato do presente trabalho.

Como sugestões para trabalhos futuros citam-se;

- Diminuir o tempo de reação dos experimentos para realizar cinéticas de inibição com substratos lignocelulósicos.
- Para estudos de inibição por produto em substratos lignocelulósicos sugere-se analisar em intervalos mais curtos a concentração do inibidor com a intenção de avaliar com precisão a faixa na qual ocorre dita inibição.
- Diminuir a concentração de celobiose como inibidor usada nesse trabalho a fim de realizar uma análise concludente.

Referências Bibliográficas

ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. Laboratory analytical procedure, v. 6, p. 1996, 1996.

ALFANI, F., GALLIFUOCO, A., & CANTARELLA, M. (1990). Study of Michaelis-Menten kinetics with linear-type product inhibition in ultrafiltration membrane reactors: Mathematical model, experimental and data. **The Chemical Engineering Journal**, 43(2), B43-B51

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., & NEGRO, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, 101(13), 4851-4861.

AL-ZUHAIR, S., FAN, Y. L., CHUI, K. S., & RIZWAN, S. (2007). Kinetics of *Aspergillus niger* cellulase inhibition by reducing sugar produced by the hydrolysis of carboxymethylcellulose. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, 5(1).

ANDERSEN, N. **Enzymatic Hydrolysis of Cellulose -Experimental and Modeling Studies**. 2007. (Ph.D. Thesis). BioCentrum-DTU Technical University of Denmark Denmark.

ANDRIĆ, P., MEYER, A. S., JENSEN, P. A., & DAM-JOHANSEN, K. (2010). Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, 160(1), 280.

ANDRIĆ, P., MEYER, A. S., JENSEN, P. A., & DAM-JOHANSEN, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology advances**, 28(3), 308-324.

ASENJO, J. A. Maximizing the formation of glucose in the enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 12, p. 3185-3190, 1983.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2// 2011.

BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H., & BOMMARIUS, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology advances**, 27(6), 833-848.

BAZÁN, J. H. V. **Estudo de produção enzimática da dextrana clínica**. 1993. Dissertação de Mestrado, FEA/UNICAMP, Campinas.

BELTRAME, P. L., CARNITI, P., FOCHER, B., MARZETTI, A., & SARTO, V. (1984). Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials: a kinetic study. **Biotechnology and bioengineering**, 26(10), 1233-1238.

BON, E. P.; FERRARA, M. A. Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries**. FAO. Available via <http://www.fao.org/biotech/seminaroct2007.htm>. Cited, v. 12, 2007.

BOUSSAID, A.; SADDLER, J. N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 138-143, 2// 1999.

CALSAVARA, L. P., DE MORAES, F. F., & ZANIN, G. M. (1999). Modeling cellobiose hydrolysis with integrated kinetic models. In **Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals** (pp. 789-806). Humana Press.

CARVALHO, M. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 102 p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Campinas-SP.

CHANG, R. **Physical chemistry for the biosciences**. University Science Books, 2005. ISBN 1891389335.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. In: FINKELSTEIN, M. e DAVISON, B. (Ed.). **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**: Humana Press, 2000. cap. 10, p.363-400. (Applied Biochemistry and Biotechnology). ISBN 978-1-4612-7128-4.

CHRISTOFOLETTI, G. B. **Estudo dos efeitos de etapas de pré-tratamento na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. (Tese de Doutorado). Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos.

DECKER, C. H., VISSER, J., & SCHREIER, P. (2000). β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, 48(10), 4929-4936.

DEKKER, R. F. H. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 9, p. 1438-1442, 1986.

DEMIRBAS, A. Products from lignocellulosic materials via degradation processes. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 30, n. 1, p. 27-37, 2007.

DESAI, S. G.; CONVERSE, A. O. Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 6, p. 650-655, 1997.

DESAI, S. G.; CONVERSE, A. O. Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 6, p. 650-655, 1997.

DRIEMEIER, C., PIMENTA, M. T., ROCHA, G. J., OLIVEIRA, M. M., MELLO, D. B., MAZIERO, P., & GONCALVES, A. R. (2011). Evolution of cellulose crystals during prehydrolysis and soda delignification of sugarcane lignocellulose. **Cellulose**, 18(6), 1509-1519.

FAN, L. T.; LEE, Y.H. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 11, p. 2707-2733, 1983.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, 1989. ISBN 3110839652.

FULLBROOK, P. Practical limits and prospects (kinetics). **Industrial enzymology, 2nd edn. MacMillan, London**, p. 508-509, 1996.

GAN, Q., ALLEN, S. J., & TAYLOR, G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. **Process Biochemistry**, 38(7), 1003-1018.

GARRETT, R.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. Saunders College Pub., 1995. ISBN 9780030097584.

GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GONG, C. S., LADISCH, M. R., & TSAO, G. T. (1977). Cellobiase from *Trichoderma viride*: purification, properties, kinetics, and mechanism. **Biotechnology and Bioengineering**, 19(7), 959-981.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. D., SOUTO-MAIOR, A. M., & ROCHA, G. D. M. (2009). Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, 32(6), 1500-15.

GROUS, W., CONVERSE, A., GRETHLEIN, H., & LYND, L. (1985). Kinetics of cellobiose hydrolysis using cellobiase composites from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. **Biotechnology and bioengineering**, 27(4), 463-470.

GRUNO, M., VÄLJAMÄE, P., PETTERSSON, G., & JOHANSSON, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, 86(5), 503-511.

GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., & KLYOSOV, A. A. (1987). Factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose in batch and continuous reactors: computer simulation and experiment. **Biotechnology and bioengineering**, 29(7), 906-910.

GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., GERASIMAS, V. B., SAVITSKENE, R. Y., & STEPONAVICHUS, Y. Y. (1985). A product inhibition study of cellulases from *Trichoderma longibrachiatum* using dyed cellulose. **Journal of biotechnology**, 3(3), 167-174.

GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P., MANENKOVA, J. A., & PROTAS, O. V. (1992). Enzymatic saccharification of industrial and agricultural lignocellulosic wastes. **Applied biochemistry and biotechnology**, 34(1), 625.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: Effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and β -glucosidase activity on the inhibition pattern. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 6, p. 663-671, 1992.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 1// 2009.

HOLTZAPPLE, M. T., CARAM, H. S., & HUMPHREY, A. E. (1984). Determining the inhibition constants in the HCH-1 model of cellulose hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, 26(7), 753-757.

HOLTZAPPLE, M., COGNATA, M., SHU, Y., & HENDRICKSON, C. (1990). Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, 36(3), 275-287.

HONG, J. et al. Combined product and substrate inhibition equation for cellobiase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 12, p. 2779-2788, 1981.

HUANG, X.; PENNER, M. H. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 2096-2100, 1991/11/01 1991.

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

KADAM, K. L., RYDHOLM, E. C., & MCMILLAN, J. D. (2004). Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnology progress**, 20(3), 698-705.

KAYA, F., HEITMANN, J. A., & JOYCE, T. W. (1994). Cellulase binding to cellulose fibers in high shear fields. **Journal of biotechnology**, 36(1), 1-10.
KESHWANI, D. R., & CHENG, J. J. (2009). Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. **Bioresource technology**, 100(4), 1515-1523.

LASER, M., SCHULMAN, D., ALLEN, S. G., LICHWA, J., ANTAL, M. J., & LYND, L. R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource technology**, 81(1), 33-44.

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1-3, p. 1081-1099, 2005/03/01 2005.

LEE, Y.-H.; FAN, L. T. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: (II). Analysis of extended hydrolysis times. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 4, p. 939-966, 1983.

LIAW, E. T.; PENNER, M. H. Substrate-velocity relationships for the *Trichoderma viride* cellulase-catalyzed hydrolysis of cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 2311-2318, August 1, 1990 1990.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934/03/01 1934.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., & PRETORIUS, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, 66(3), 506-577.

MACHADO LONGO, D. **Estudo da adsorção das enzimas do Complexo celolítico em bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-**

tratamentos e avicel, 2013. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

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

MANI, S., TABIL, L. G., & OPOKU, A. (2002). Ethanol from agricultural crop residues-An overview. **The society for engineering, food and biological systems**. *MBSK*, 02-217.

MANSFIELD, S. D., MOONEY, C., & SADDLER, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology progress**, 15(5), 804-816.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. John Wiley & Sons, 2003. ISBN 0471461415.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 8// 2012.

MIAO, Y., CHEN, J. Y., JIANG, X., & HUANG, Z. (2012). Kinetic studies on the product inhibition of enzymatic lignocellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, 167(2), 358-366.

MIAO, Y., CHEN, J. Y., JIANG, X., & HUANG, Z. (2012). Kinetic studies on the product inhibition of enzymatic lignocellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, 167(2), 358-366.

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

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. **Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review**. *Biomass and Bioenergy*, 2013, vol. 56, p. 526-544.

MOREIRA NETO, J. **Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar** 2016. (Tese de Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

MOSIER, N. S., HALL, P., LADISCH, C. M., & LADISCH, M. R. (1999). Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. **In Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics** (pp. 23-40). Springer Berlin Heidelberg.

- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M., & LADISCH, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, 96(6), 673-686
- NOBLE, R. D., GIUBILEO, G., VIOLANTE, V., & FABIANI, C. (1990). Analysis of enzyme catalysis under batch conditions. **The Chemical Engineering Journal**, 44(2), B47-B50.
- OH, K. K., KIM, S. W., JEONG, Y. S., & HONG, S. I. (2000). Bioconversion of cellulose into ethanol by nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, 89(1), 15-30.
- ORTEGA, N., BUSTO, D., & PEREZ-MATEOS, M. (2001). Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International biodeterioration & biodegradation**, 47(1), 7-14.
- PAN, X., GILKES, N., & SADDLER, J. N. (2006). Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Holzforschung**, 60(4), 398-401.
- PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., & SOCCOL, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, 74(1), 69-80.
- PÉREZ, J., MUNOZ-DORADO, J., DE LA RUBIA, T. D. L. R., & MARTINEZ, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, 5(2), 53-63.
- Philippidis, G. P., Smith, T. K., & Wyman, C. E. (1993). Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. **Biotechnology and bioengineering**, 41(9), 846-853.
- PHILIPPIDIS, G. P., SMITH, T. K., & WYMAN, C. E. (1993). Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. **Biotechnology and bioengineering**, 41(9), 846-853.
- PINTO, G. F. D. M., REGINALDO RAMOS. **Cinética Enzimática**. 1^ª edição. Rio de Janeiro-Brasil: 2009.
- PURI, V. P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 10, p. 1219-1222, 1984.

QING, Q., YANG, B., & WYMAN, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource technology**, 101(24), 9624-9630.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RABINOVICH, M. L., MELNICK, M. S., & BOLOBOVA, A. V. (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry (Moscow)**, 67(8), 850-871.

ROSGAARD, L., PEDERSEN, S., LANGSTON, J., AKERHJELM, D., CHERRY, J. R., & MEYER, A. S. (2007). Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. **Biotechnology progress**, 23(6), 1270-1276.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3165-70, September 1, 1996.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. D., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., & REZENDE, S. T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, 35(5), 1004-1010.

SATTLER, W., ESTERBAUER, H., GLATTER, O., & STEINER, W. (1989). The effect of enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, 33(10), 1221-1234.

SCHLITTLER, L. **Engenharia de um Bioprocesso para a Produção de Etanol de Bagaço de Cana de Açúcar**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências)—Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SCHUERCH, C. Ozonization of cellulose and wood. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia**, v. 2, n. 1, p. 79-95, 1963.

SIQUEIRA, L. Euforia com o etanol celulósico acaba e começam os desafios da larga escala. <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/euforia-etanol-celulosico-acaba-desafios-larga-escala-310315/#comments>, 31 de março de 2015. Acesso em: Abril 25 de 2015.

SOO-IN, Y. U. N., JEONG, C. S., & CHUNG, D. K. (2001). Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 65(9), 2028-2032.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 5// 2002.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 5–6, p. 367-375, // 1996.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 160-167, 5// 1997.

TOLAN, J.; FOODY, B. Cellulase from Submerged Fermentation. In: TSAO, G. T.; BRAINARD, A. P., *et al* (Ed.). **Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics**: Springer Berlin Heidelberg, v.65, 1999. cap. 3, p.41-67. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). ISBN 978-3-540-65577-0.

VÄLJAMÄE, P., PETTERSSON, G., & JOHANSSON, G. (2001). Mechanism of substrate inhibition in cellulose synergistic degradation. **European Journal of Biochemistry**, 268(16), 4520-4526.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 11// 2012.

VOLYNETS, B.; DAHMAN, Y. Assessment of pretreatments and enzymatic hydrolysis of wheat straw as a sugar source for bioprocess industry. **Int J Energy Environ**, v. 2, n. 3, p. 427-446, 2011.

WALD, S., WILKE, C. R., & BLANCH, H. W. (1984). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, 26(3), 221-230.

WONG, D. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009/05/01 2009.

XIAO, Z., ZHANG, X., GREGG, D. J., & SADDLER, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In **Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held** May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO (pp. 1115-1126). Humana Press.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.

ZHANG, J.; VIKARI, L. Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*. **Bioresource Technology**, v. 117, n. 0, p. 286-291, 8// 2012.

ZHANG, Y. H. P., HIMMEL, M. E., & MIELENZ, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), 452-481.

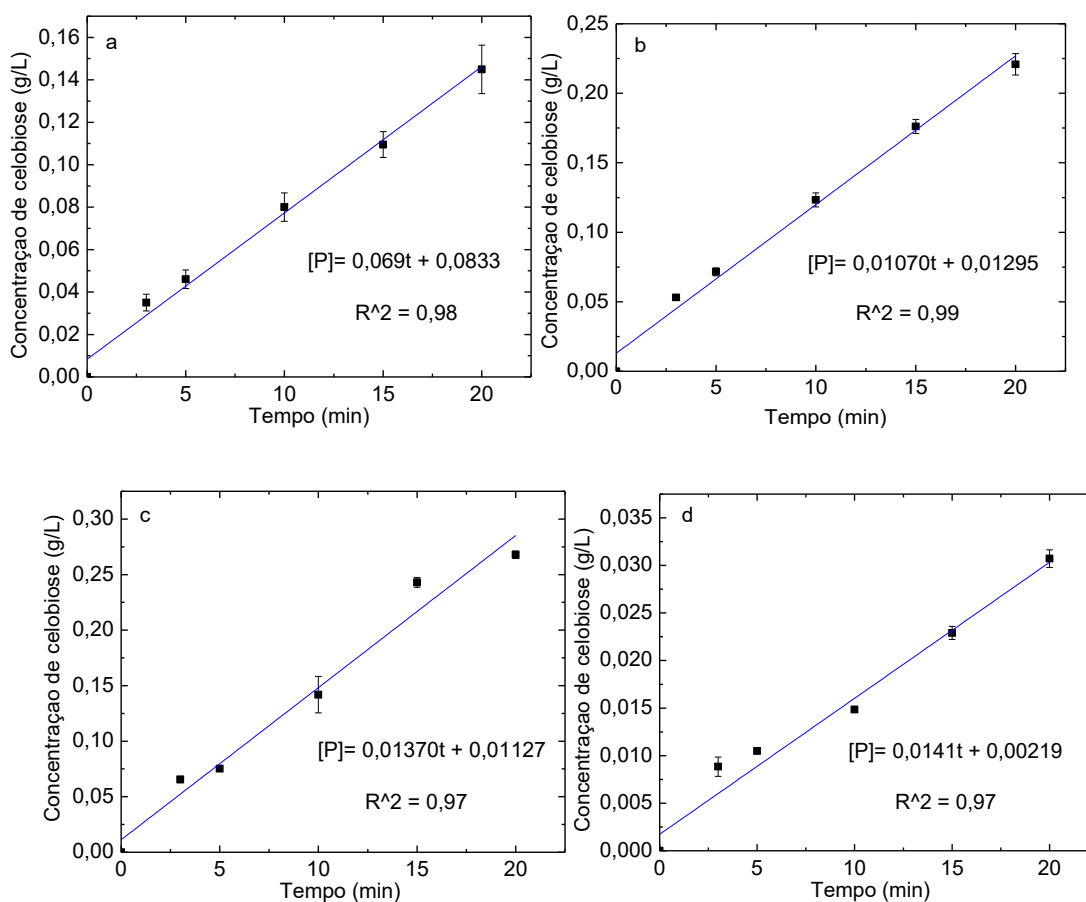
ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHAO, X., CHENG, K., & LIU, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(5), 815.

Apêndice I

Determinação das velocidades iniciais de reação para a cinética de inibição da enzima β -glicosidase por glicose com D-(+)-Celobiose como substrato

Figura I 1 Gráficos da velocidade inicial de reação para o controle (sem glicose) da cinética de inibição da enzima β -glicosidase com D-(+)-celobiose como substrato em concentrações de: a) 0,5 g/L ; b) 1 g/L ; c) 2 g/L ; d) 3 g/L; e) 4 g/L ; f) 5 g/L ; g) 7,5 g/L e h) 10 g/L.



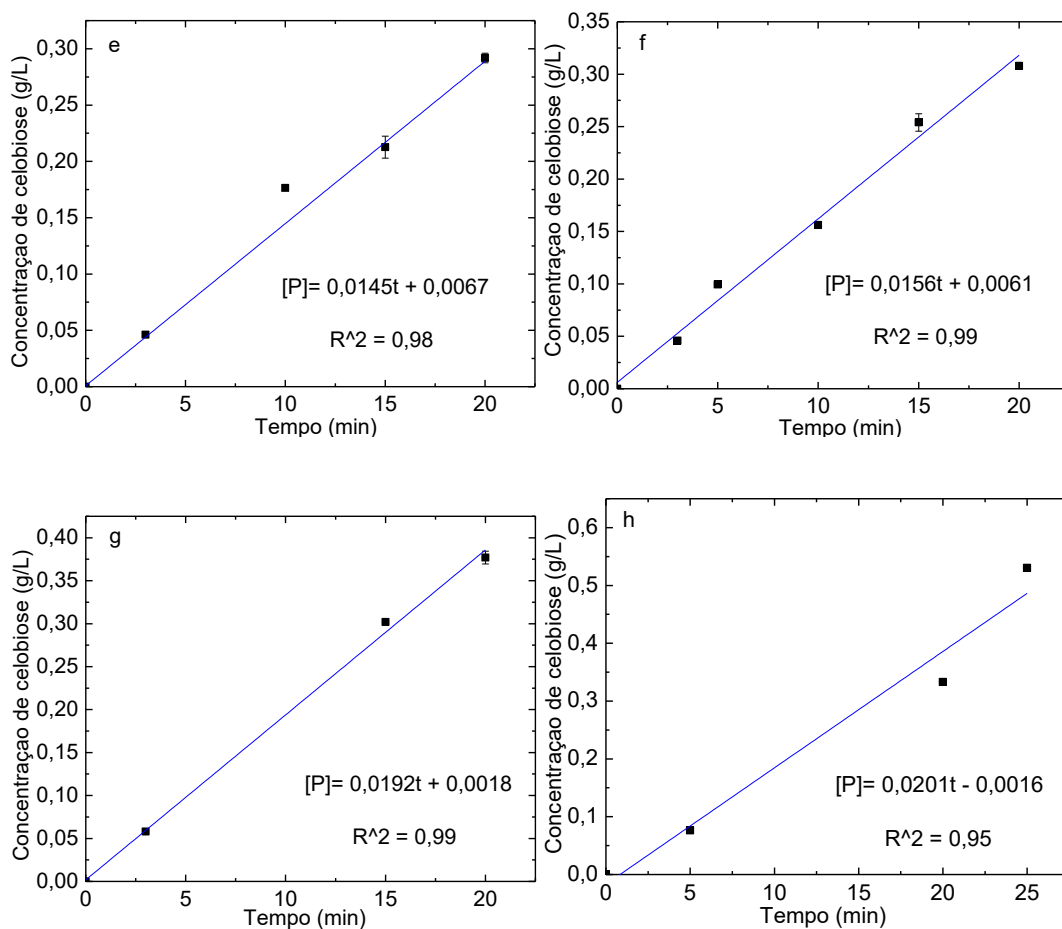
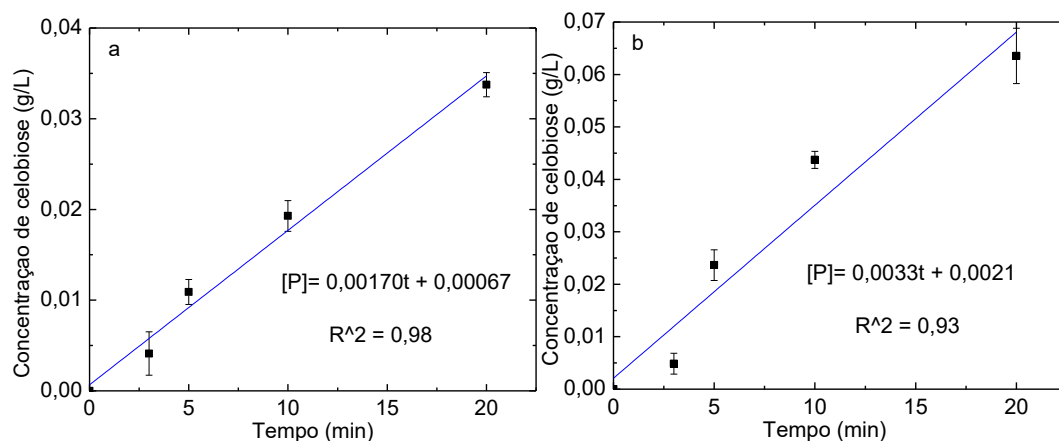
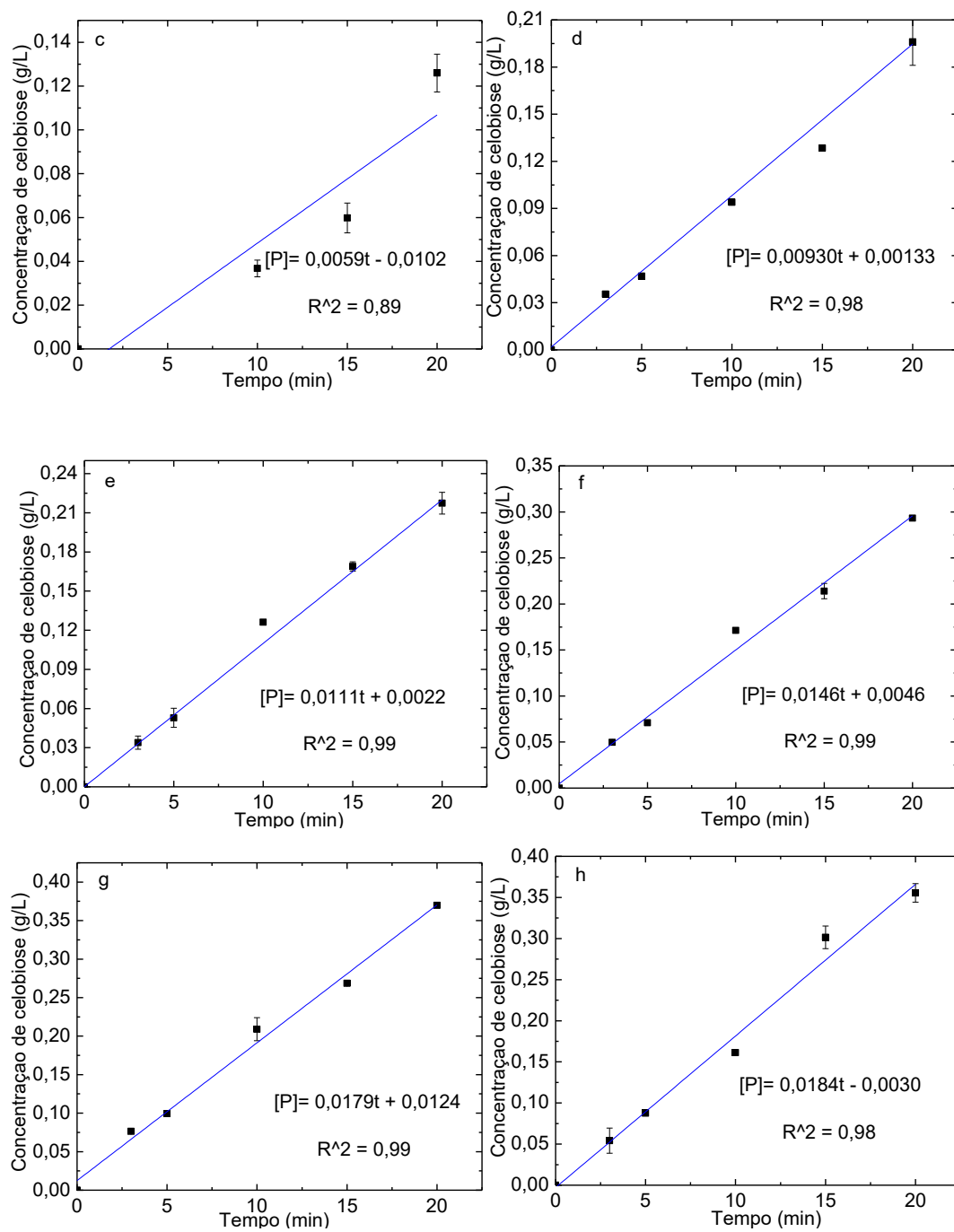


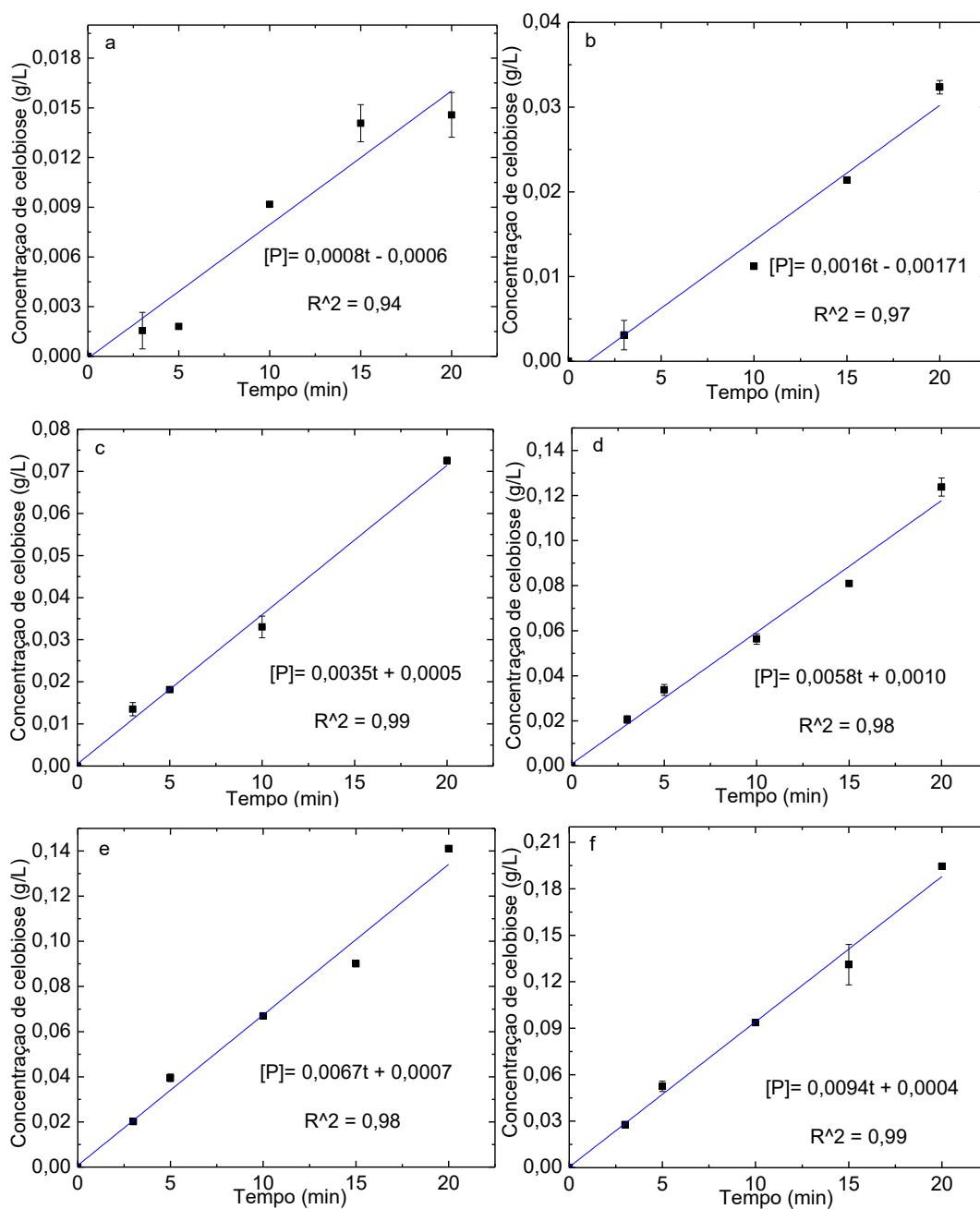
Figura I 2 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima β -glicosidase com D-(+)-celbiose como substrato em concentrações de: a) 0,5 g/L ; b) 1 g/L ; c) 2 g/L ; d) 3 g/L; e) 4 g/L ; f) 5 g/L ; g) 7,5 g/L e h) 10 g/L e 5 g/L de glicose como inibidor.

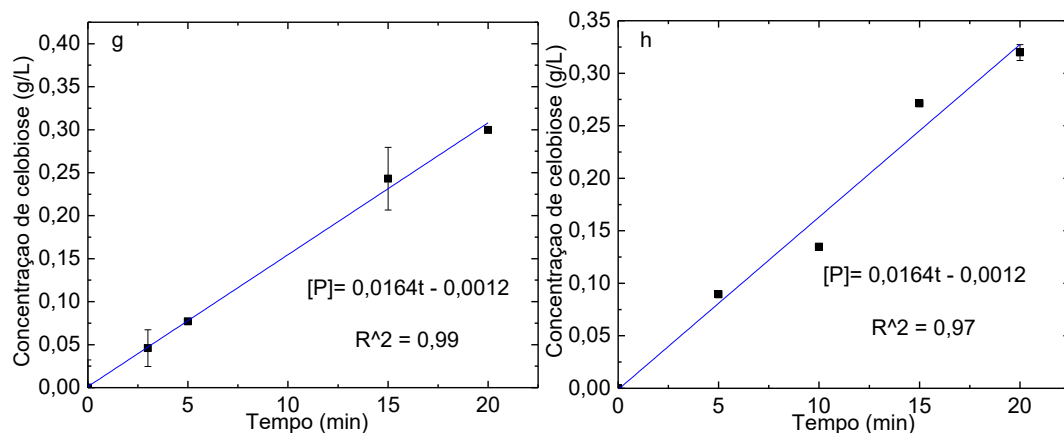




]

Figura I 3 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima β -glicosidase com D-(+)-celbiose como substrato em concentrações de: a) 0,5 g/L ; b) 1 g/L ; c) 2 g/L ; d) 3 g/L ; e) 4 g/L ; f) 5 g/L ; g) 7,5 g/L e h) 10 g/L e 10 g/L de glicose como inibidor.

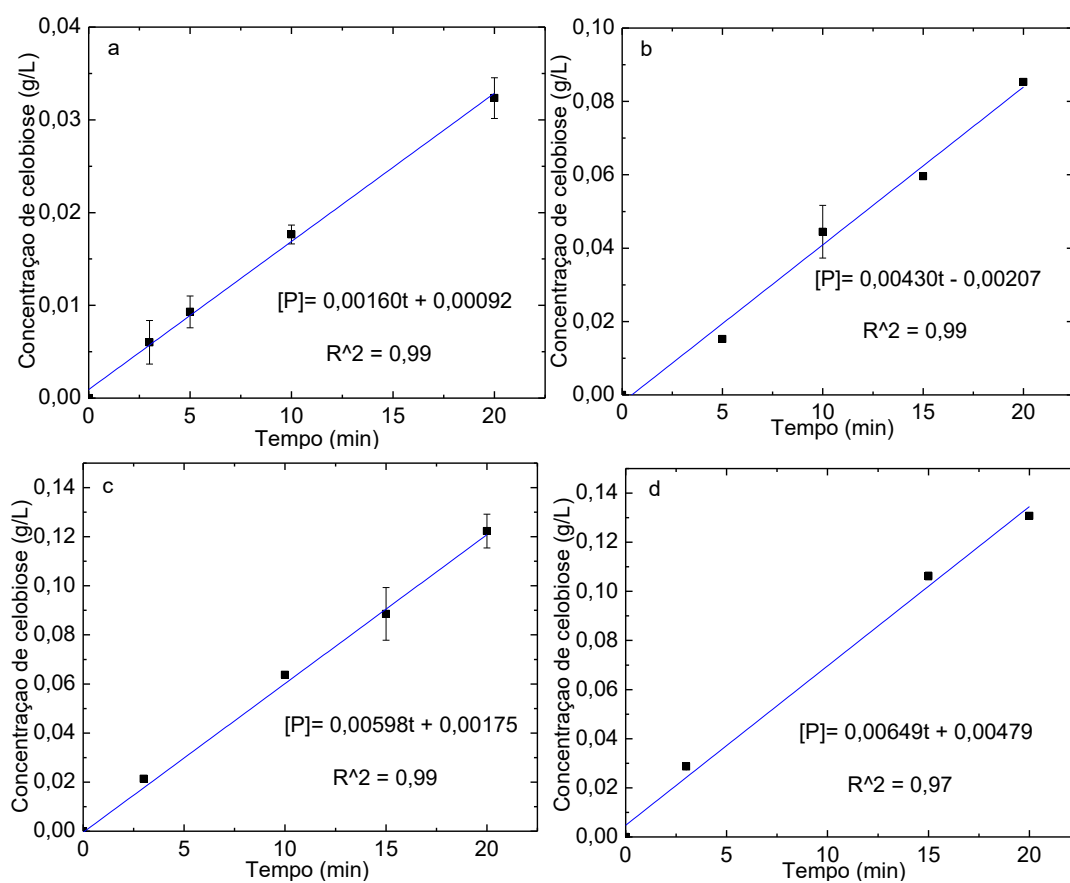




Apêndice II-a

Determinação das velocidades iniciais de reação para a cinética de inibição da enzima celulase por glicose com BH como substrato

Figura IIa- 1 Gráficos de velocidade inicial de reação do controle da cinética de inibição da enzima celulase com BH como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L .



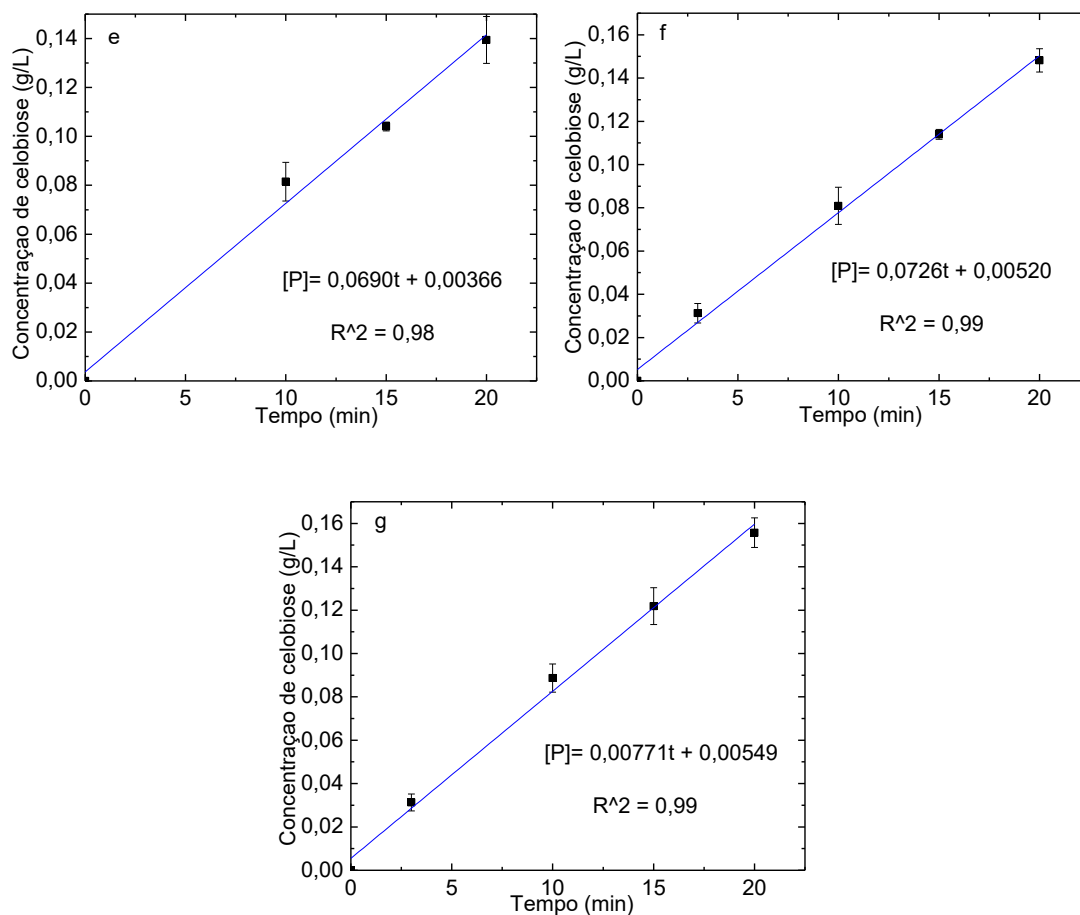
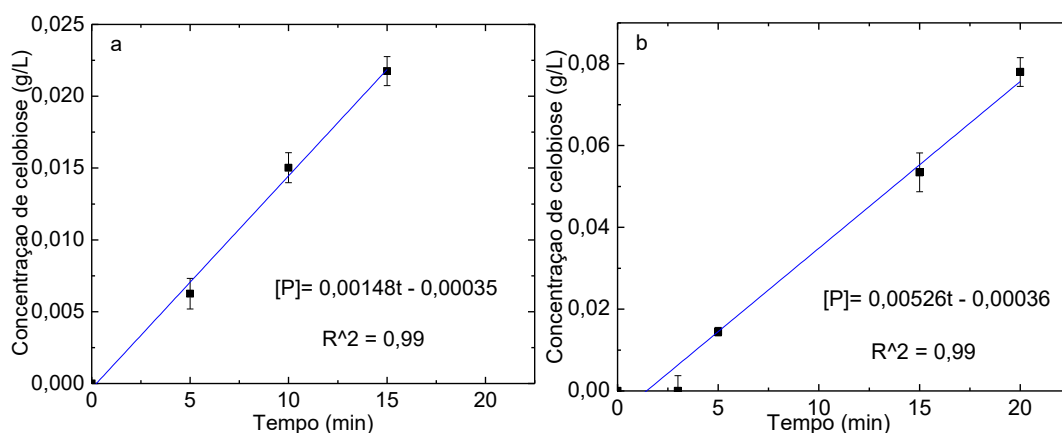


Figura IIa- 2 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BH como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 5 g/L de glicose como inibidor.



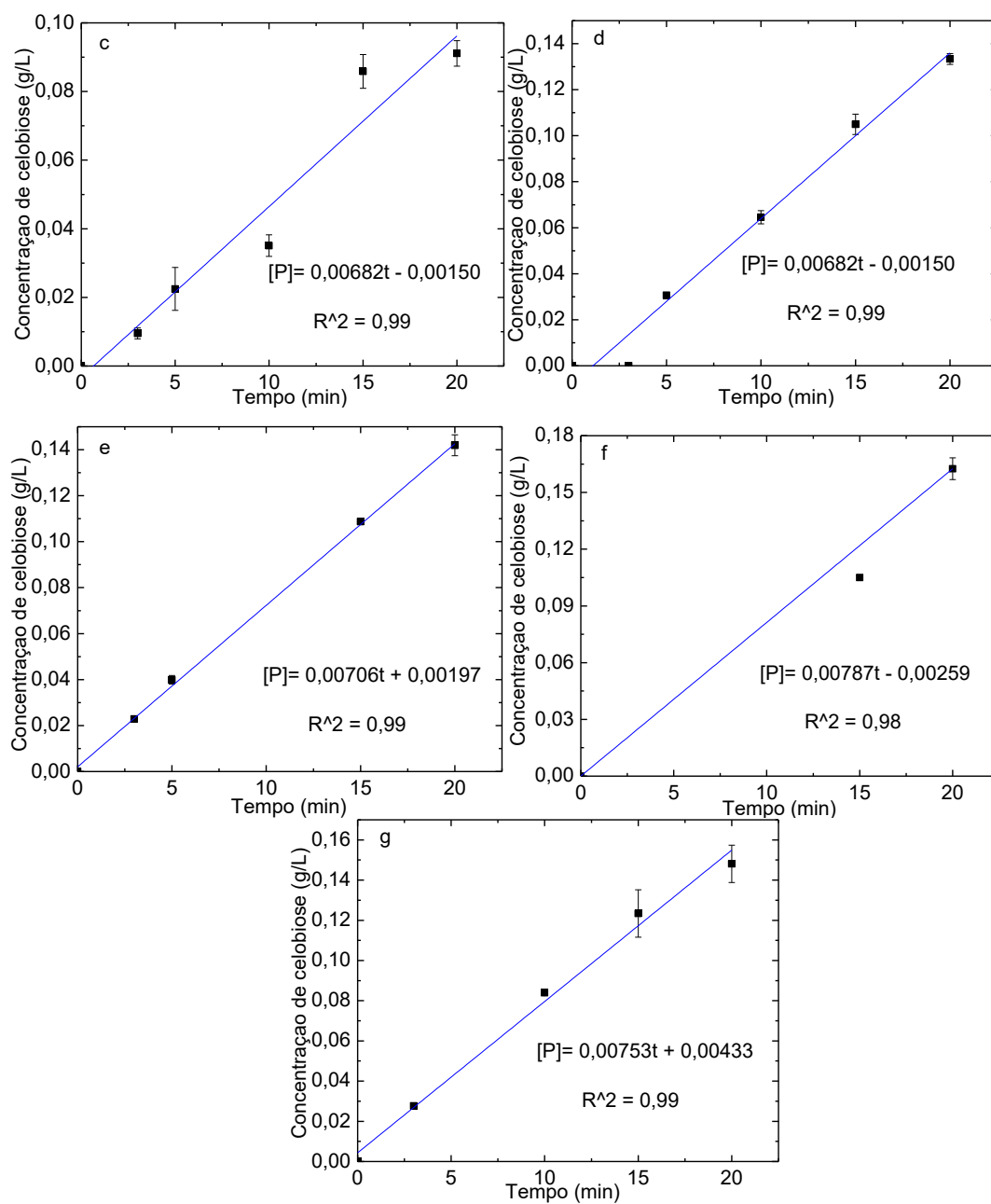
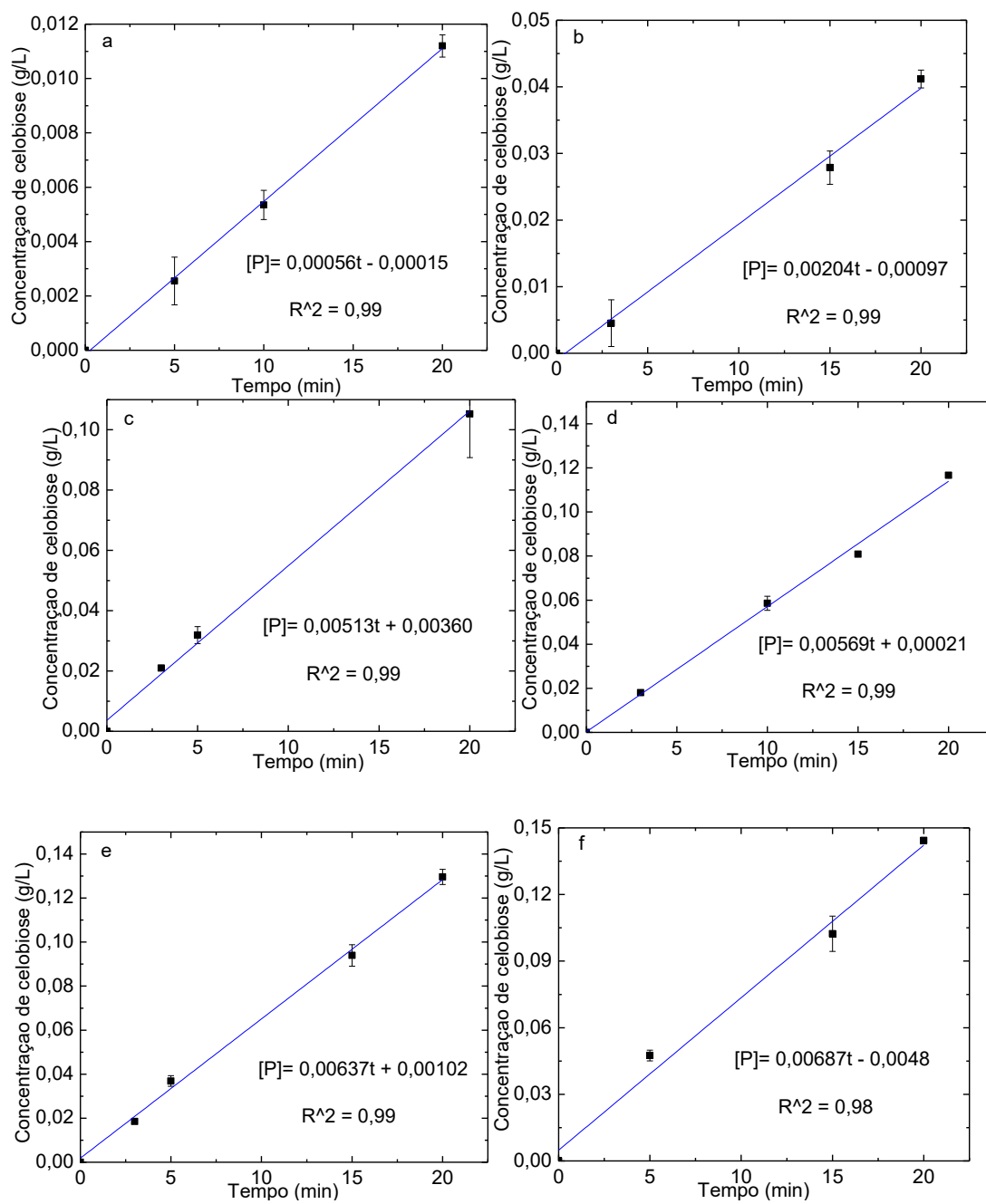


Figura IIa- 3 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BH como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 20 g/L de glicose como inibidor.



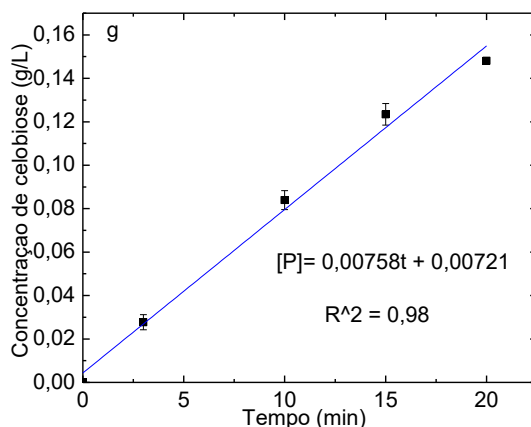
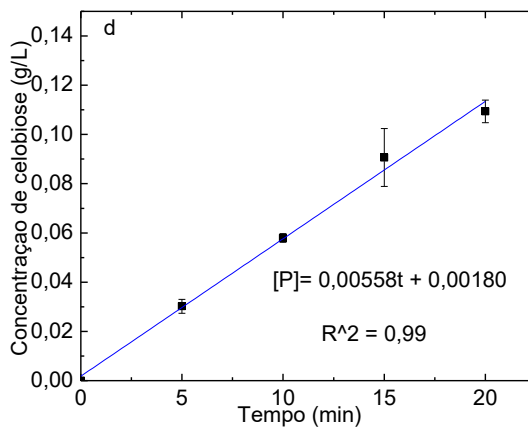
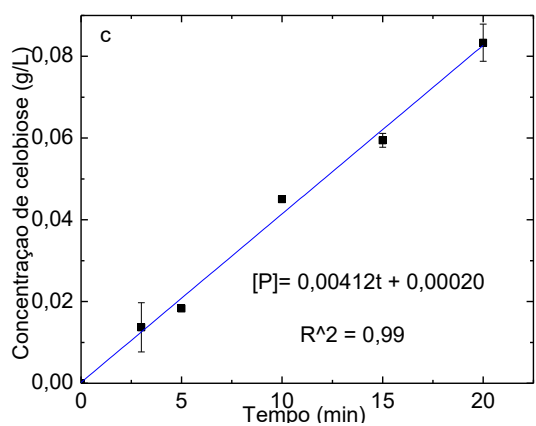
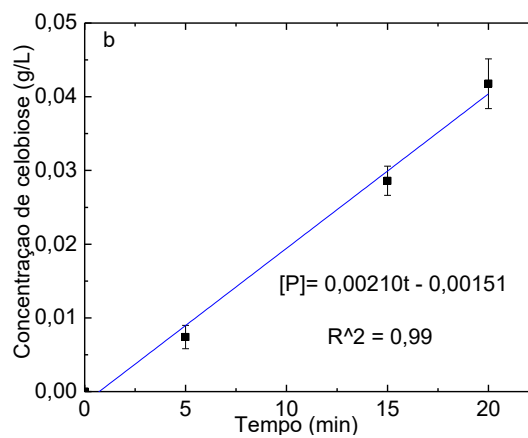
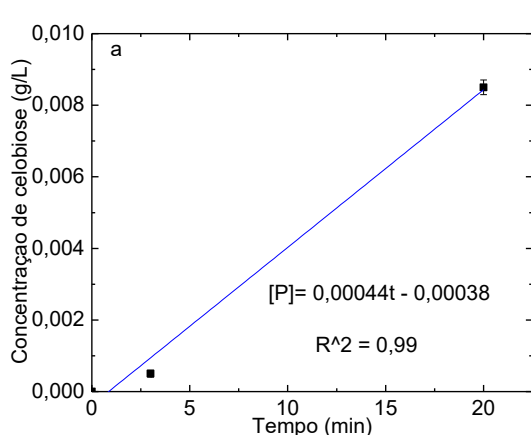
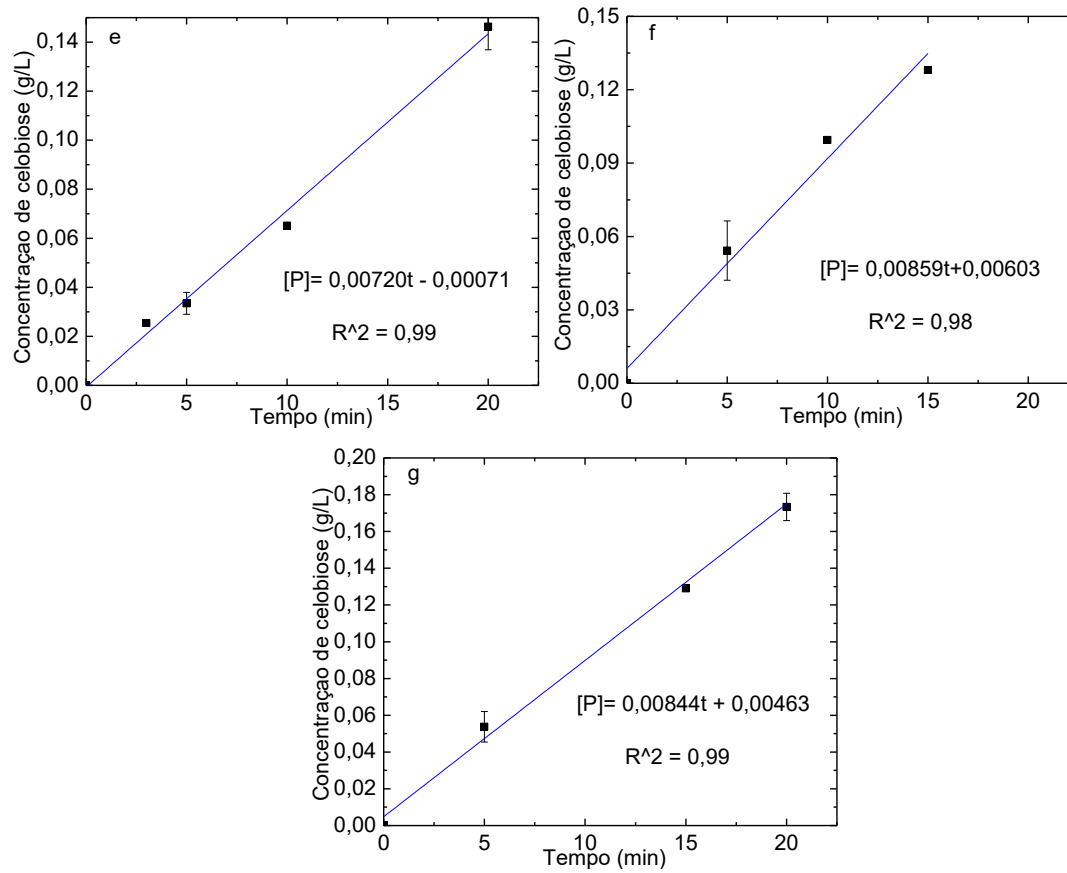


Figura IIa- 4 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BH como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 60 g/L de glicose como inibidor.

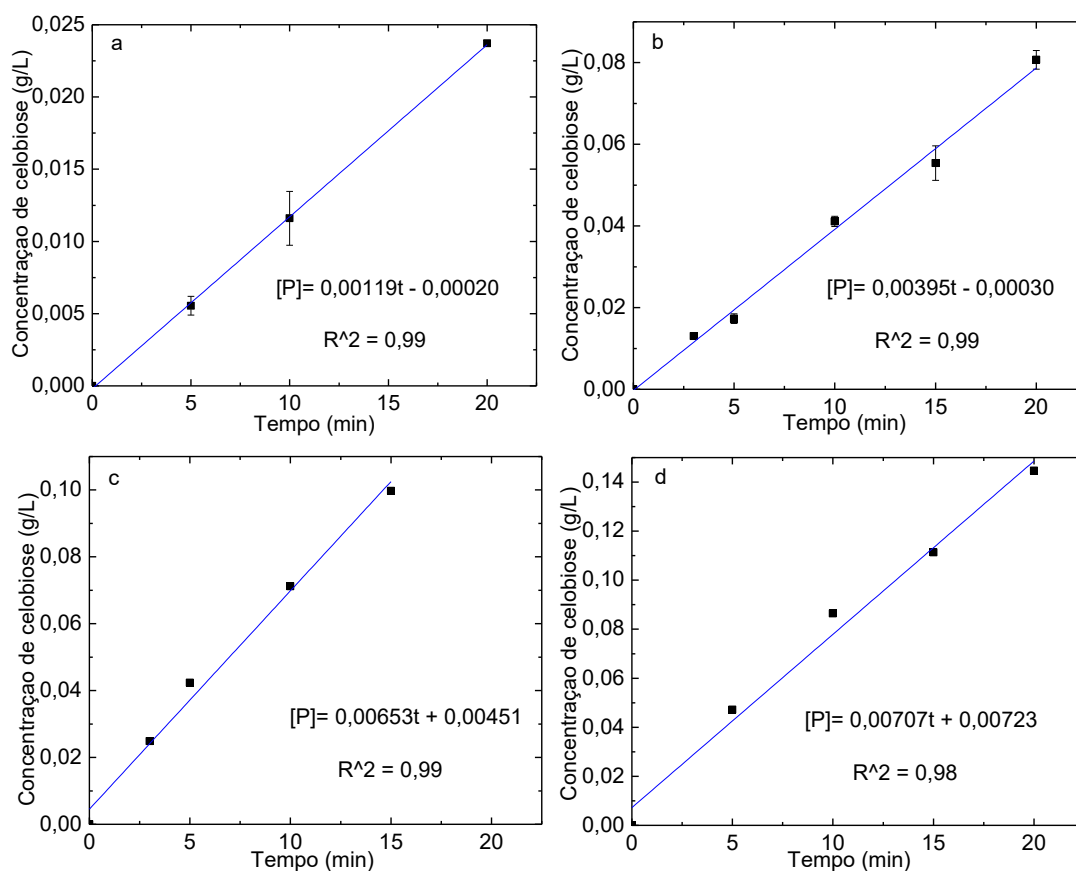




Apêndice II-b

Determinação das velocidades iniciais de reação para a cinética de inibição da enzima celulase por xilose com BH como substrato

Figura IIb- 1 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BH como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 2.5 g/L de xilose como inibidor.



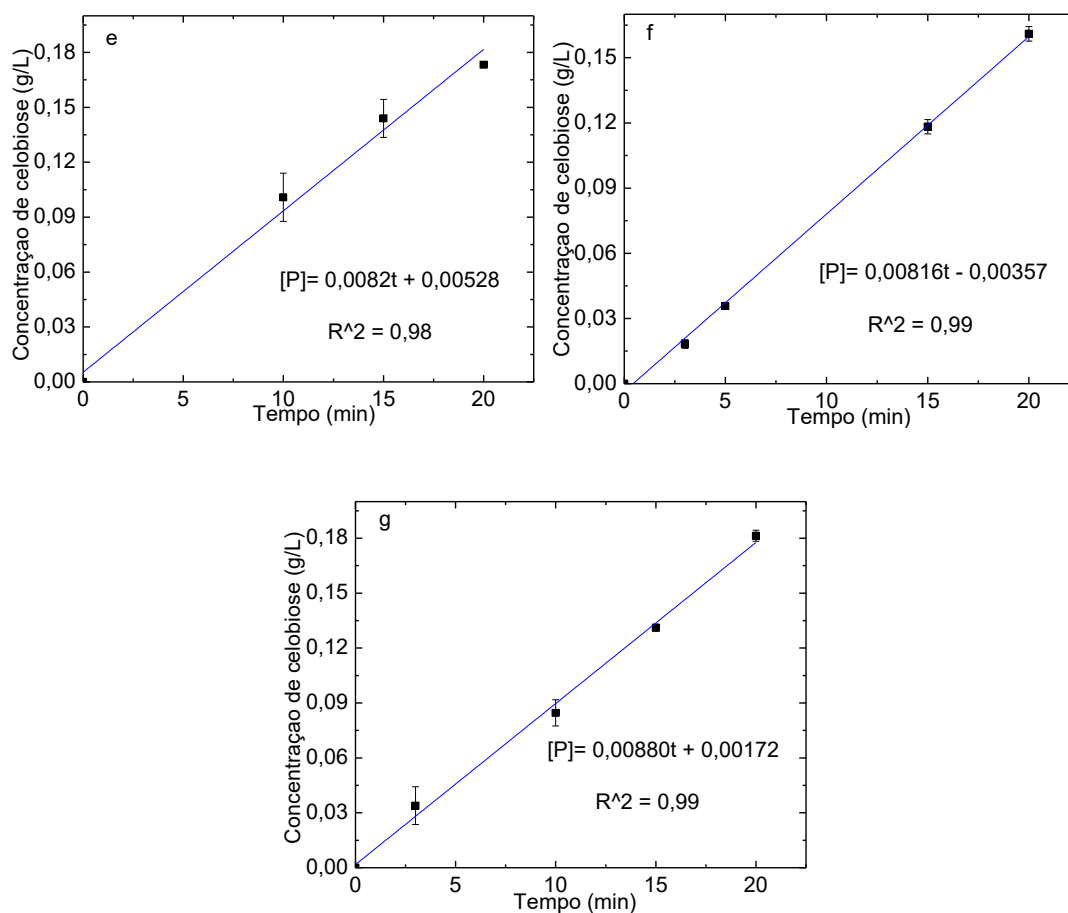
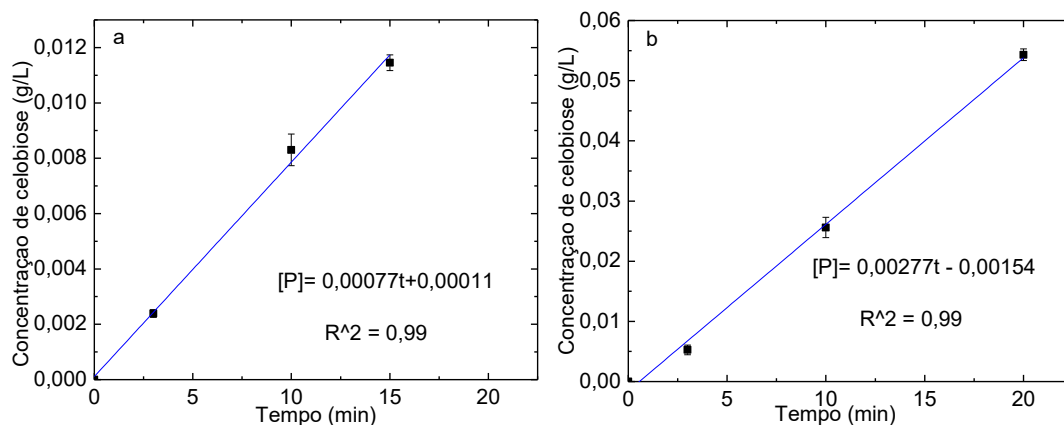


Figura IIb- 2 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BH como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 5 g/L de xilose como inibidor.



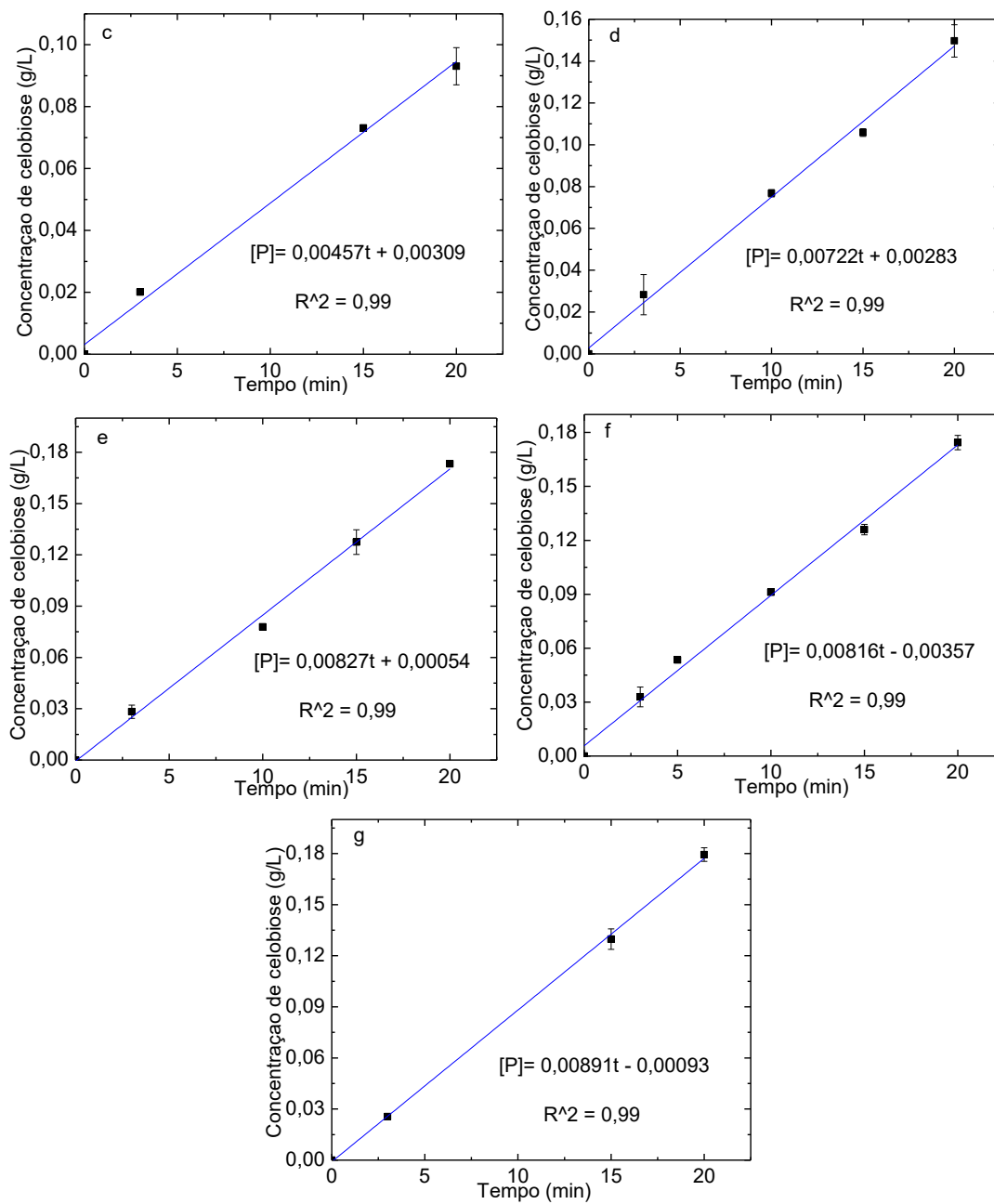
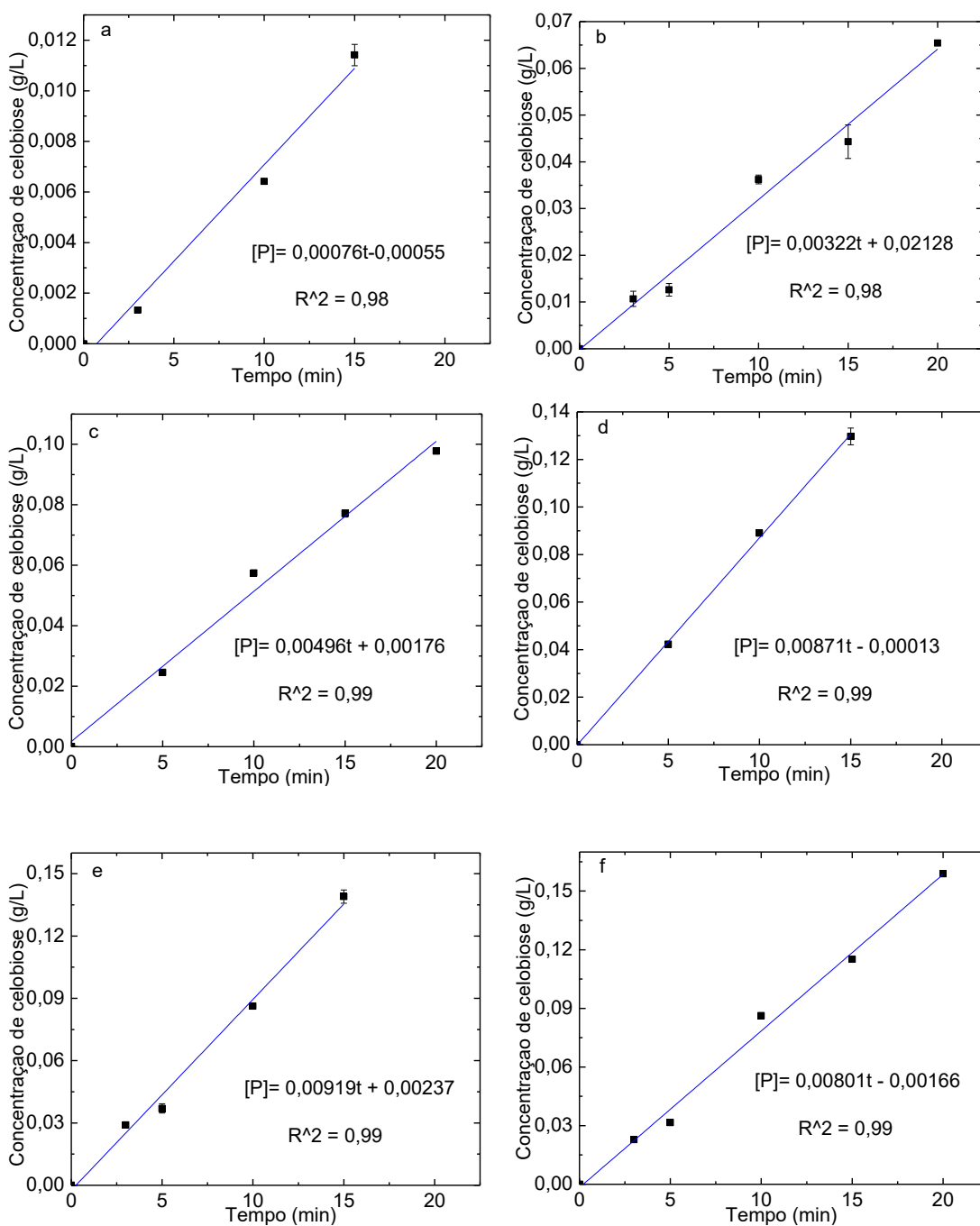
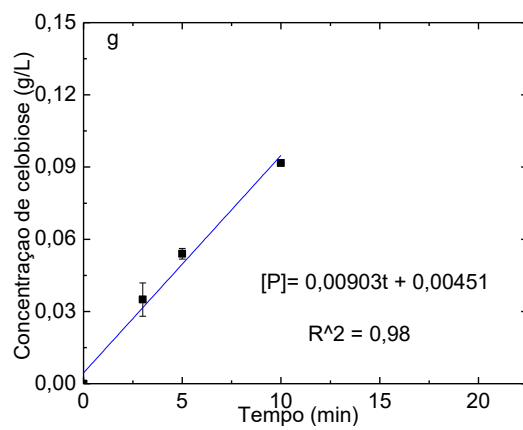


Figura IIb- 3 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BH como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 10 g/L de xilose como inibidor.

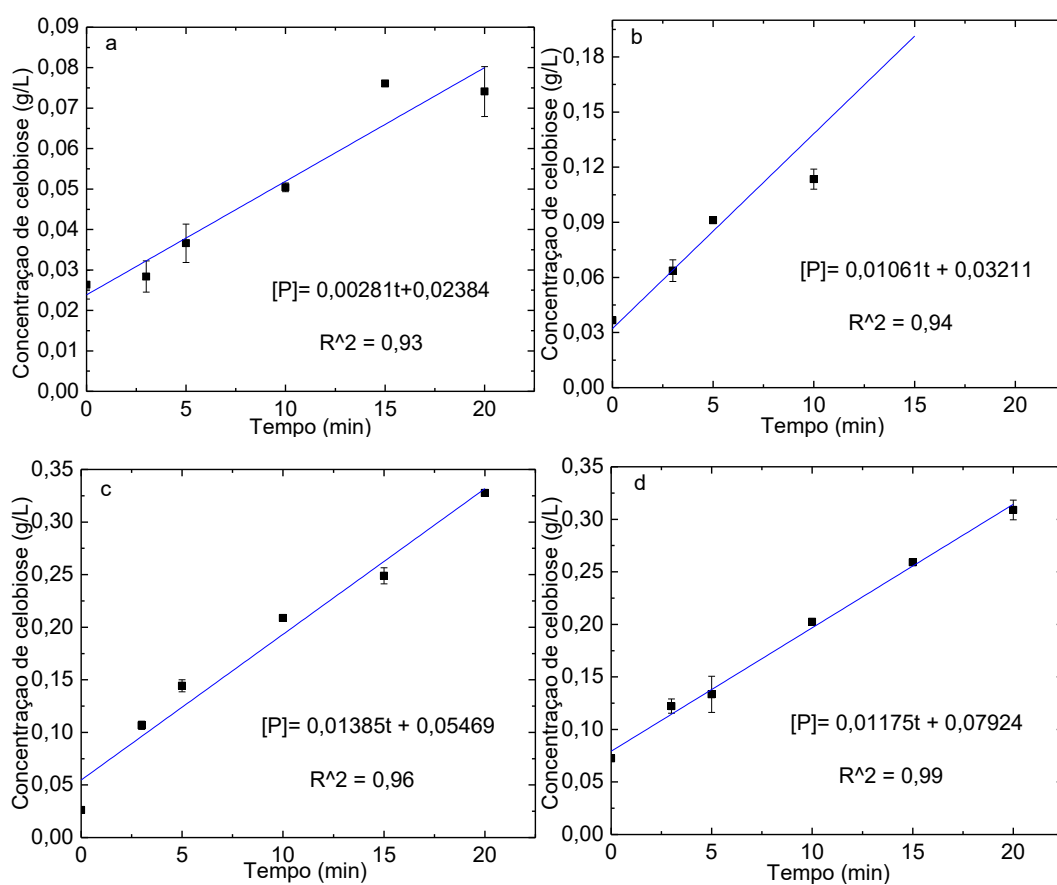




Apêndice III-a

Determinação das velocidades iniciais de reação para a cinética de inibição da enzima celulase por glicose com BO como substrato

Figura IIIa- 1 Gráficos de velocidade inicial de reação do controle da cinética de inibição da enzima celulase com BO como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L .



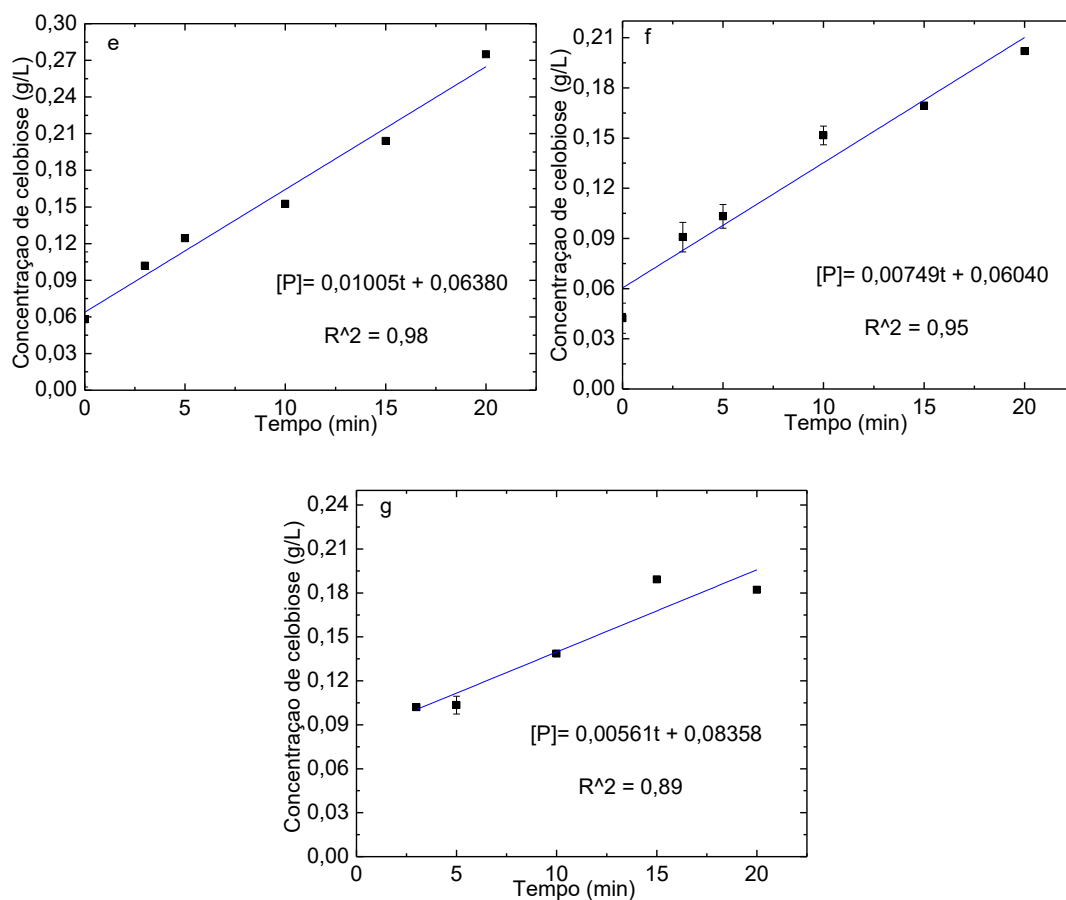
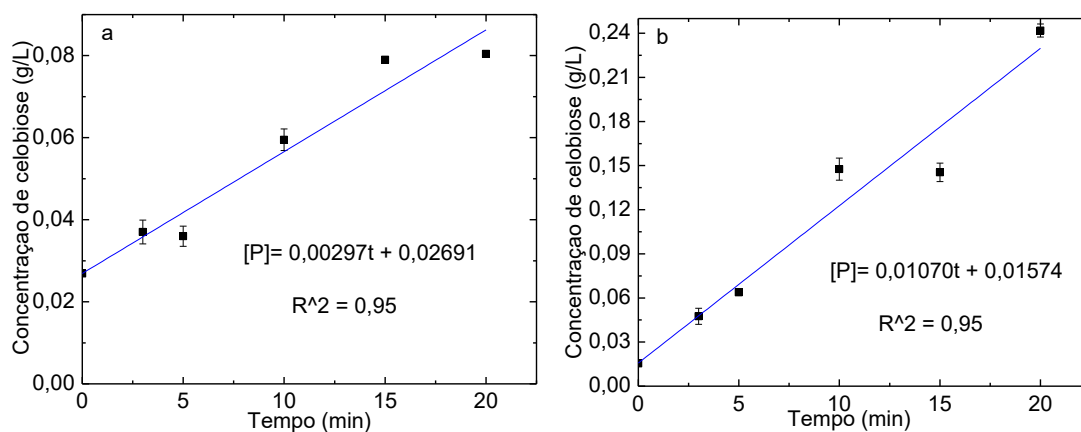


Figura IIIa- 2 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BO como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 5 g/L de glicose como inibidor.



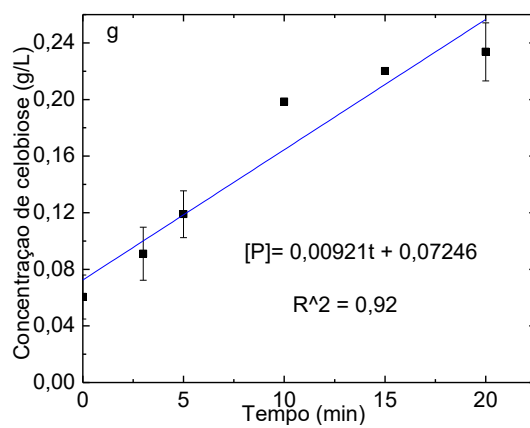
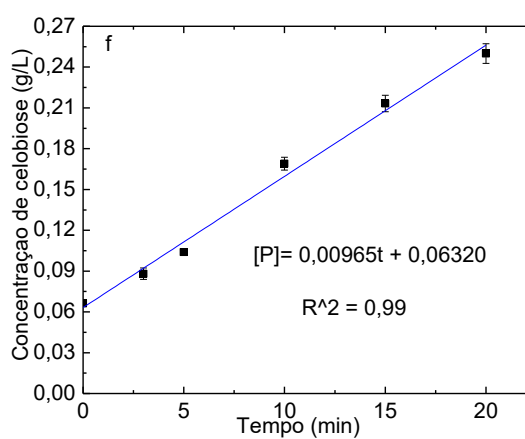
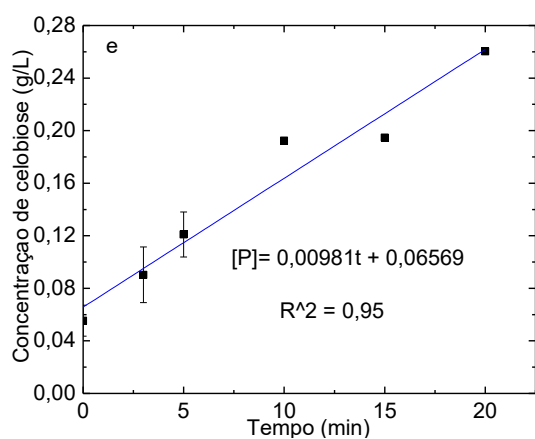
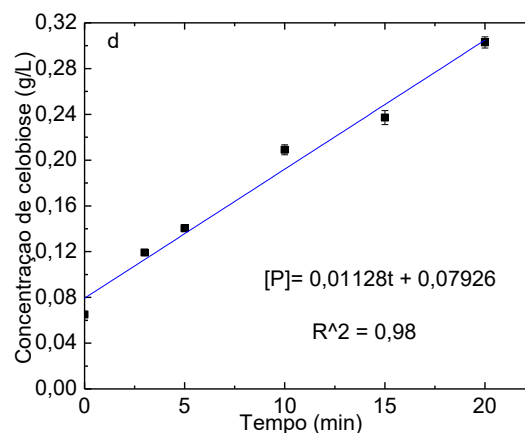
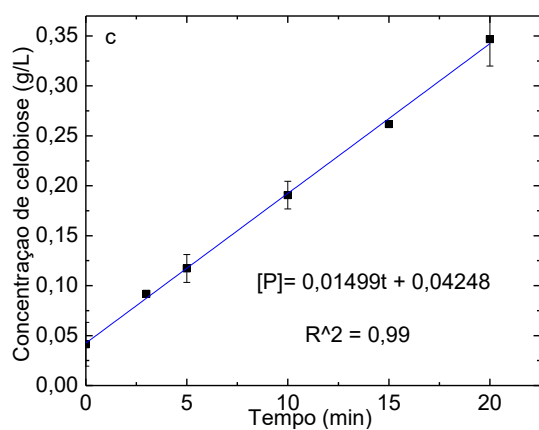
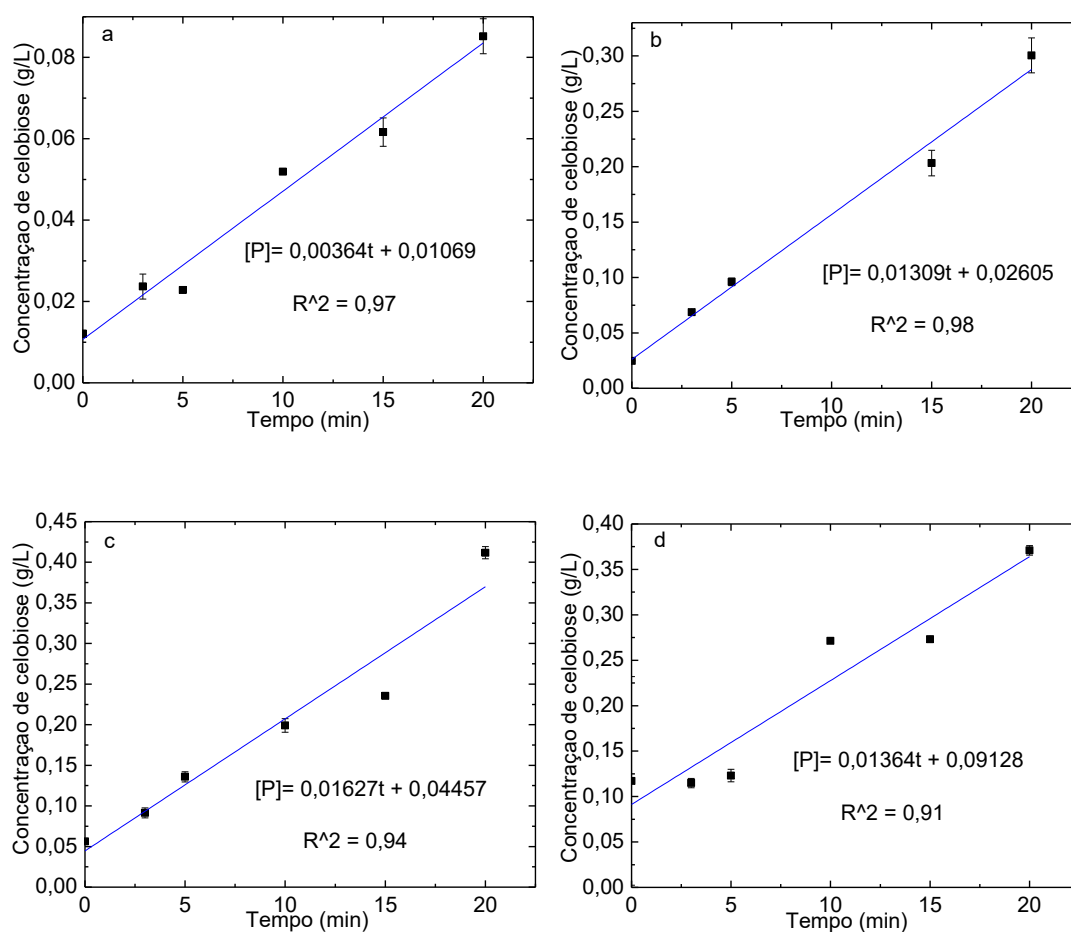


Figura IIIa- 3 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BO como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 20 g/L de glicose como inibidor.



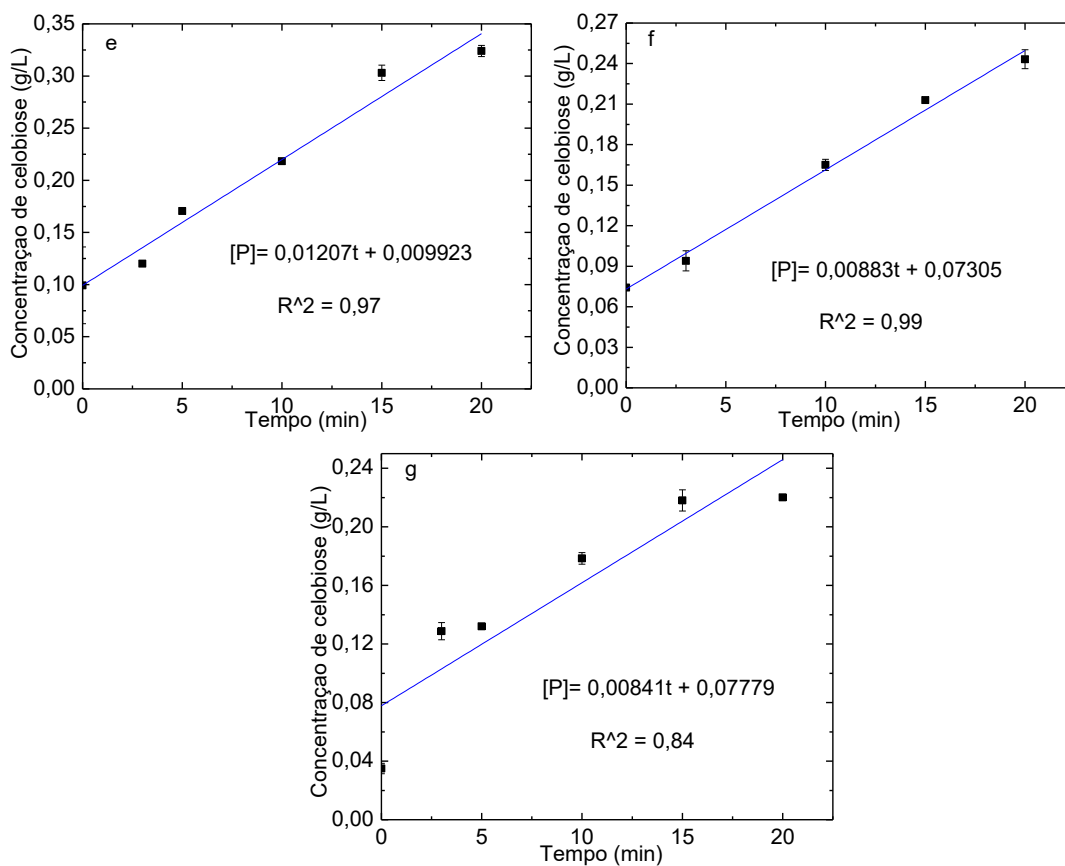
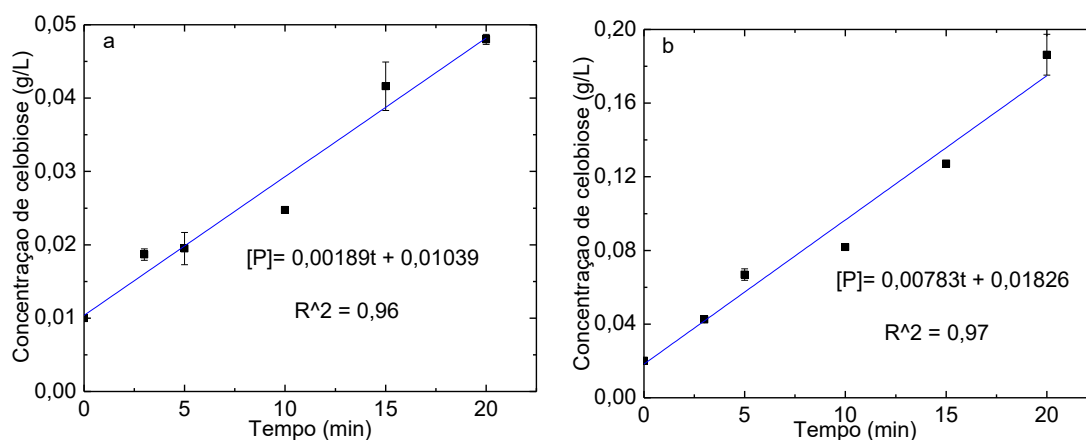
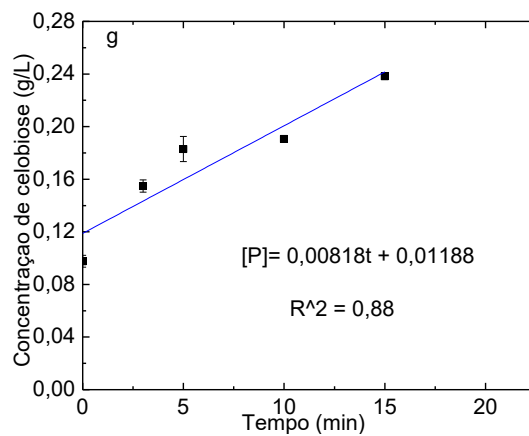
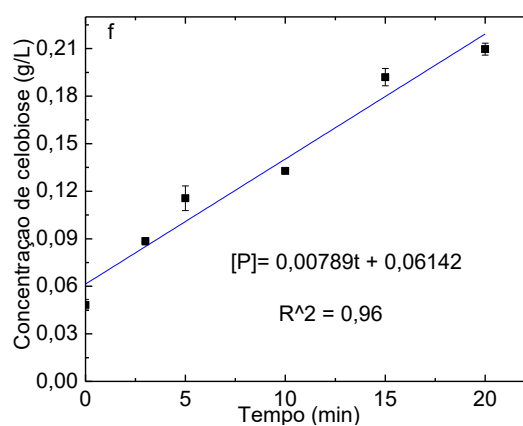
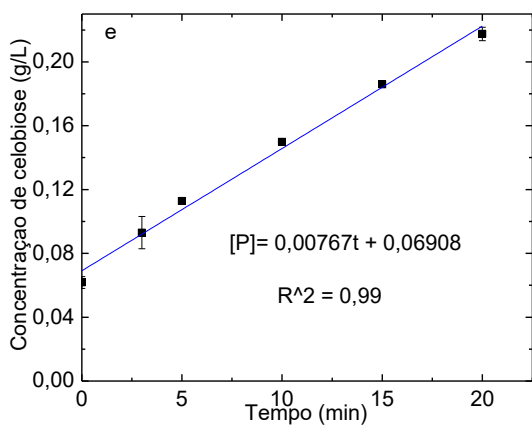
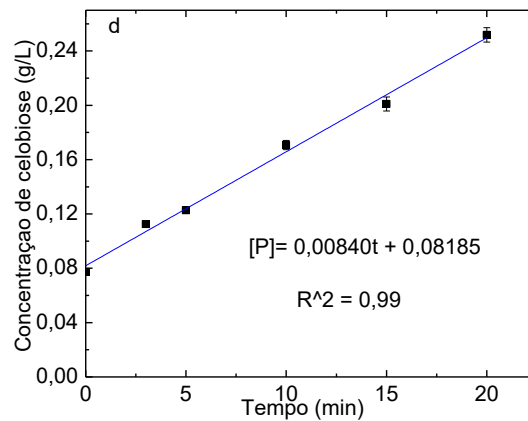
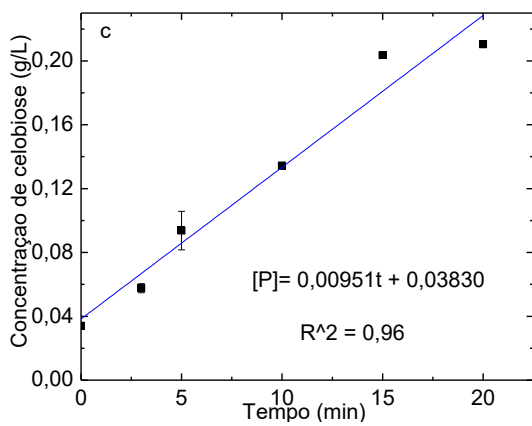


Figura IIIa- 4 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BO como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 60 g/L de glicose como inibidor.

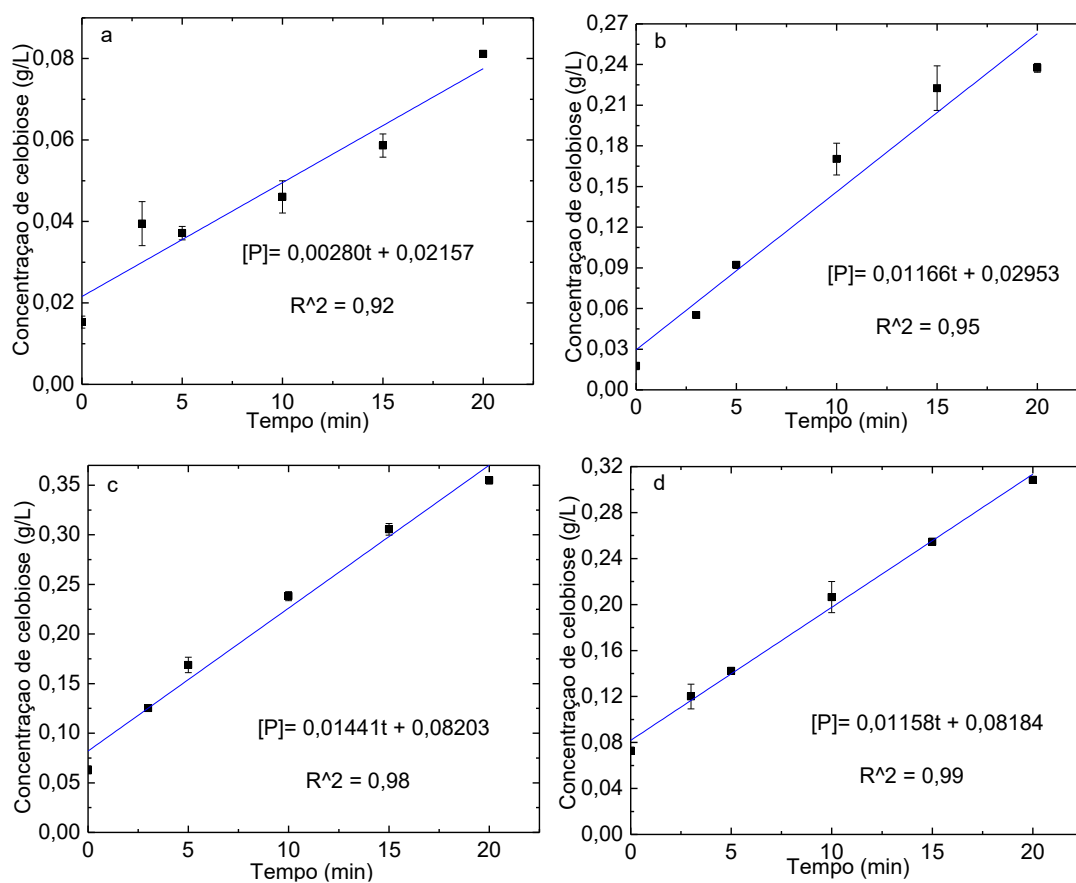




Apêndice III-b

Determinação das velocidades iniciais de reação para a cinética de inibição da enzima celulase por xilose com BO como substrato

Figura IIIb- 1 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BO como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 2.5 g/L de xilose como inibidor.



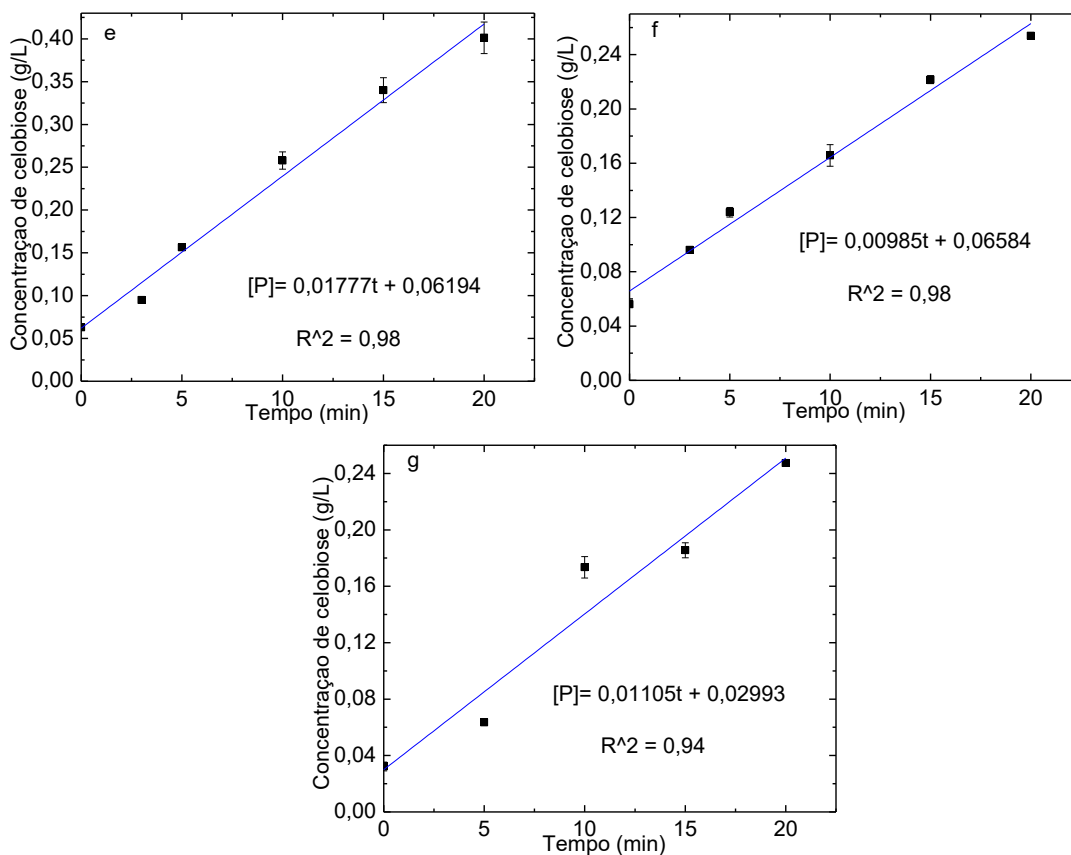
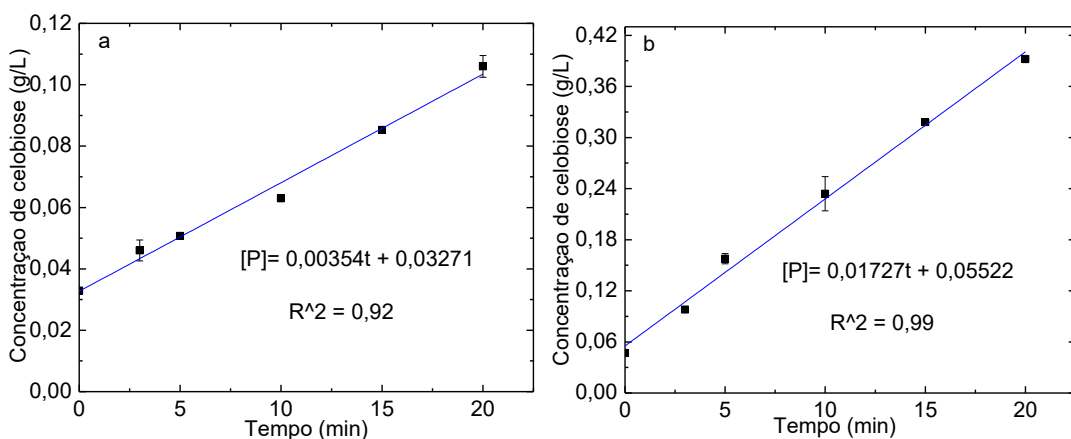


Figura IIIb- 2 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BO como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 5 g/L de xilose como inibidor.



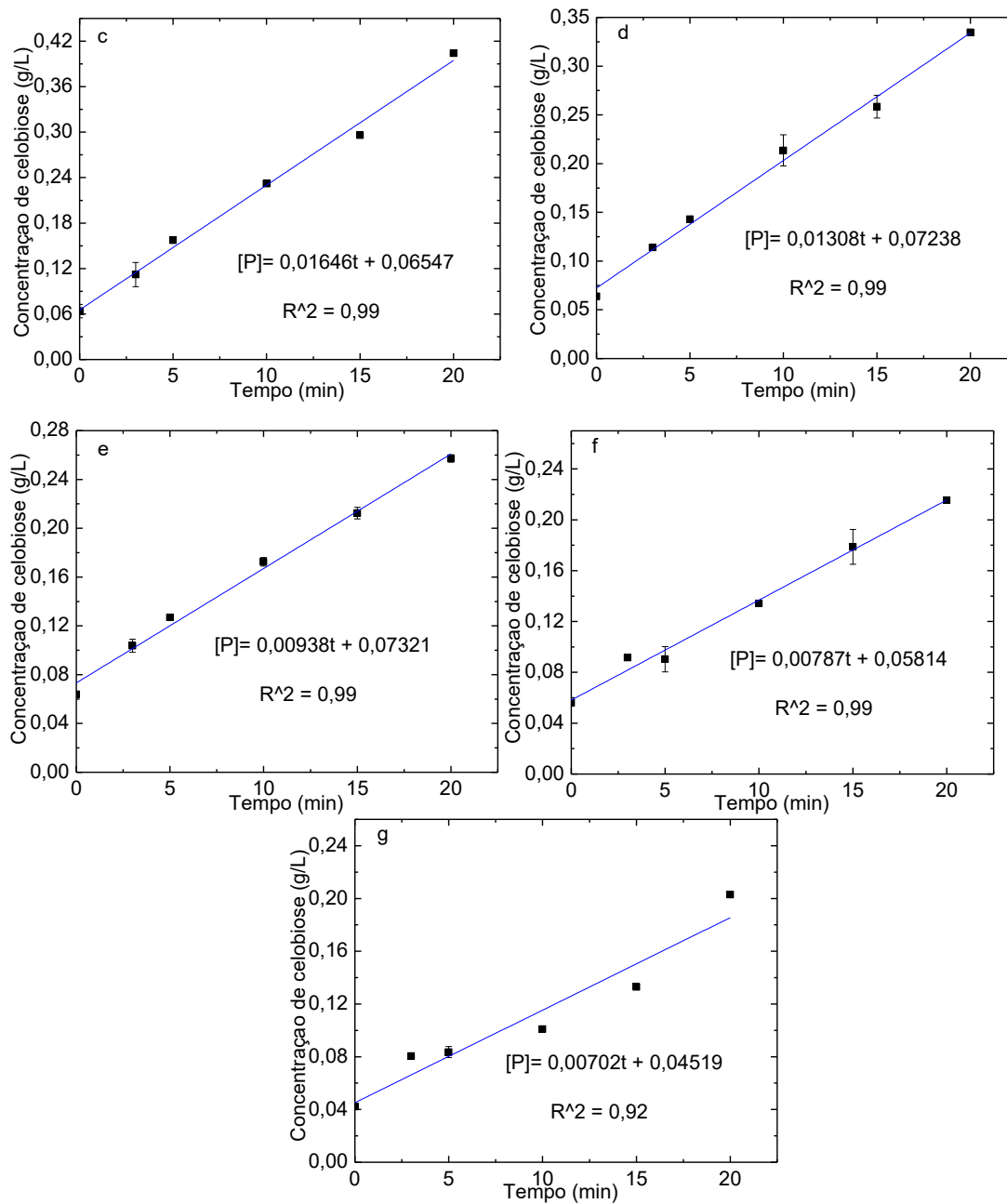


Figura IIIb- 3 Gráficos de velocidade inicial de reação da cinética de inibição da enzima celulase com BO como substrato em concentrações de: a) 1 g/L ; b) 5 g/L ; c) 10 g/L ; d) 20 g/L; e) 40 g/L ; f) 60 g/L e g) 80 g/L e 10 g/L de xilose como inibidor.

