

PRODUÇÃO DE ENZIMAS OXIDATIVAS EM SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS E APLICAÇÃO NA DESLIGNIFICAÇÃO DE POLPAS CELULÓSICAS

Amanda Monteiro Elias
Sergio Luis Moreira Neto
Walter de Carvalho
Adriane Maria Ferreira Milagres

16.1 INTRODUÇÃO

Diversos setores da produção industrial que incluem os sistemas de conversão de materiais lignocelulósicos demandam processos de transformação da matéria-prima que podem ser auxiliados pela ação de fungos específicos ou suas enzimas. Linhagens de micro-organismos que apresentam maior eficiência de produção de enzimas, aliadas a processos biotecnológicos, proporcionam parcerias em novos e interessantes negócios. Do ponto de vista

tecnológico, a biodegradação de materiais lignocelulósicos pode ser utilizada em diversos processos industriais de transformação destinados à produção de celulose e papel, biocombustíveis, além de outros. Nesses setores industriais, o foco está principalmente na utilização de enzimas, produto do metabolismo dos micro-organismos. Entretanto, as enzimas desenvolvidas até o momento precisam ganhar mais eficiência para que processos industriais mais produtivos sejam operacionalizados.

As principais enzimas relacionadas à degradação de materiais lignocelulósicos são as xilanases, celulasas, esterases, glucanases, celobiasas, peroxidases e lacases. A questão do efeito dessas enzimas na degradação do material lignocelulósico ainda não está totalmente definida. Apesar de nunca tanto esforço de pesquisa ter sido feito sobre essa temática, existe ainda uma enorme necessidade de que sejam desenvolvidas novas tecnologias competitivas, eficientes na conversão de biomassa em bioprodutos. O descobrimento das bases técnicas de obtenção e caracterização dessas enzimas tem gerado uma visão mais clara sobre o tema, e é o que pretendemos abordar neste capítulo.

O uso de enzimas para auxiliar na deslignificação de materiais lignocelulósicos tem como premissa o rompimento das ligações entre os carboidratos e a lignina. Nesse aspecto, o primeiro setor industrial a se interessar pelo uso de enzimas foram as fábricas de celulose e papel, quando as enzimas começaram a se tornar viáveis para branquear celulose e substituir o cloro elementar, com redução na liberação de organoclorados persistentes nos ambientes naturais. O rompimento das cadeias de xilana pela xilanase separa as ligações de lignina-carboidrato, que ocorrem após o período de cozimento, melhorando o acesso dos reagentes de branqueamento e facilitando a remoção da lignina em subseqüentes seqüências químicas de branqueamento. Posteriormente, enzimas com ação direta sobre a oxidação e despolimerização da lignina presente nas fibras tornaram-se alvo de estudos.

Geralmente a produção de enzimas por fungos é estudada em meios sintéticos, muitas vezes contendo indutores enzimáticos. Portanto, os resultados nem sempre refletem os acontecimentos dos sistemas *in situ* ou *in vivo*. Uma alternativa promissora tem sido o uso de materiais lignocelulósicos como substrato indutor para a produção de diferentes enzimas, garantindo, assim, a produção de enzimas de alta especificidade, atuando como catalisadores para tornar os processos mais efetivos e baratos. Existem poucos estudos na literatura descrevendo a produção de enzimas em larga escala por fungos crescendo sobre seu substrato natural em condições de fermentação em meio sólido, sistema mais próximo do processo *in vivo*.

A produção industrial de enzimas pode ser feita em reatores especiais nos quais se colocam fungos. Como substratos, podem ser usados resíduos agrícolas ou florestais. Alguns estudos científicos e tecnológicos foram publicados sobre processos biotecnológicos em pilhas de cavacos. Tal processo, denominado biopolpação, consiste na inoculação de fungos especializados nas pilhas de cavacos para promover a deslignificação. O reator pode ser a própria pilha de cavacos, ou, eventualmente, um enorme silo de cavacos especialmente criado para oferecer melhores condições de aeração, umidade e temperatura. Os fungos inoculados nos cavacos produzem quantidades significativas de enzimas ligninolíticas, capazes de degradar seletivamente a lignina dos cavacos. A biopolpação de cavacos de madeira é uma ótima possibilidade para integrar a produção de enzimas e aplicação em outras etapas operacionais. Como as enzimas são extracelulares, elas podem ser facilmente separadas do substrato para serem usadas, por exemplo, na etapa de branqueamento da celulose.

16.2 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

No processo de degradação da parede celular vegetal atua um grupo de hidrolases, enzimas responsáveis pela degradação da celulose e das polioses que apresentam certa especificidade pelo respectivo substrato, ao passo que as enzimas envolvidas na degradação da lignina são oxidases, que em geral são pouco específicas¹ (Figura 16.1).

As enzimas hidrolíticas necessárias à degradação da celulose são as endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase e 1,4- β -glicosidase. Endoglucanases hidrolisam ligações glicosídicas, particularmente em regiões amorfas da celulose, expondo novos terminais livres que serão locais de atuação das exoglucanases. Exoglucanases ou celobio-hidrolases hidrolisam ligações glicosídicas das pontas de cadeia da celulose, produzindo celobiose. β -glicosidases clivam a molécula de celobiose em duas unidades de glicose. Em adição às enzimas citadas, uma quarta enzima, a celobiose desidrogenase, atua sobre celobiose, oligômeros de glicose e celulose, oxidando o terminal redutor. Trabalhos recentes descreveram uma mono-oxigenase lítica dependente de cobre, capaz de quebrar a cadeia de celulose pela oxidação das moléculas de anidropiranosose nos carbonos C1 ou C4^{2,3}.

Dada a heterogeneidade do substrato, a hidrólise das hemiceluloses é mais complexa, sendo necessária a ação de endo-1,4- β -xilanasase, β -xilosidase

e enzimas acessórias (α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase, acetil esterase, mananases e galactanases)⁴.

A lignina requer para sua oxidação a ação de uma série de enzimas, que compreendem a lignina-peroxidase (LiP) e peroxidase dependente de manganês (MnP), que são heme proteínas capazes de oxidar subestruturas da lignina na presença de peróxido de hidrogênio^{1,5,6}; e uma oxidase, a lacase, uma cuproproteína que catalisa a redução de O_2 a H_2O , com simultânea oxidação de subunidades fenólicas da lignina^{1,5}. A LiP apresenta potencial de oxidação suficientemente elevado para abstrair elétrons de subestruturas fenólicas e não fenólicas, ao passo que MnP, que apresenta menor potencial de oxidação, é capaz, somente, de abstrair elétrons de subunidades fenólicas. Alguns fungos do gênero *Bjerkandera* e *Pleurotus* secretam ainda um terceiro tipo de peroxidase, que oxida tanto substratos da MnP (fenóis e Mn^{2+}) quanto da LiP (álcool veratrílico) e tem sido denominada de peroxidase versátil (VPs)⁶.

Embora sem participação direta na degradação e/ou modificação da lignina, a glicoxal oxidase e a aril álcool oxidase são enzimas extracelulares que participam da produção de peróxido de hidrogênio, indispensável para a ação das peroxidases^{1,5,7}.

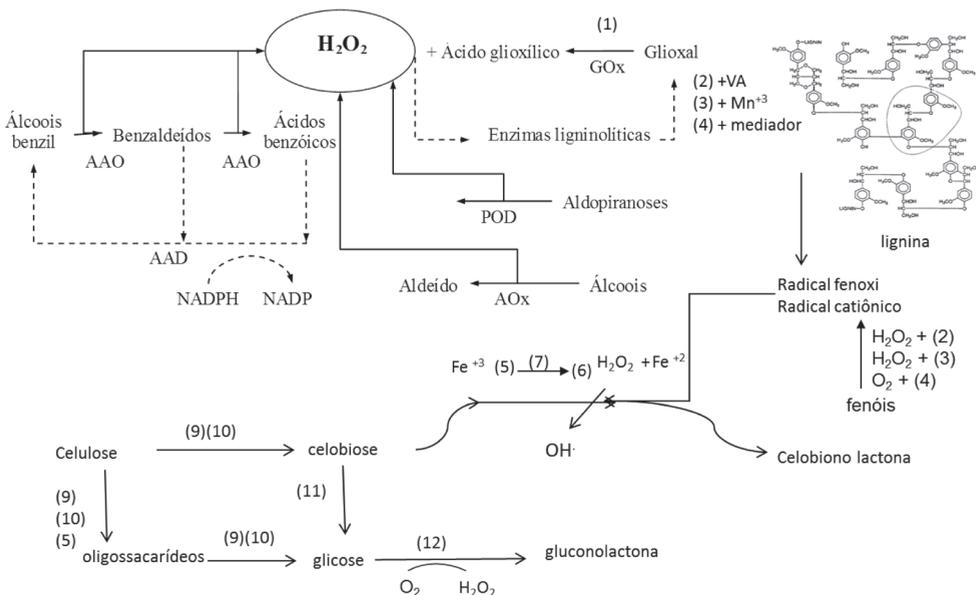


Figura 16.1 Esquema de integração de vias metabólicas de degradação de materiais lignocelulósicos. Enzimas: (1) glicoxal oxidase; (2) lignina peroxidase; (3) manganês peroxidase; (4) lacase; (5) celobiose desidrogenase; (6) celobiose quinona oxirredutase; (7) protease; (8) lactonase; (9) endoglucanase; (10) exoglucanase; (11) β -glicosidase; (12) glicose oxidase; (13) catalase.

Frente à complexidade e à diversidade dos constituintes, a parede celular dos vegetais é degradada principalmente por fungos, em especial por basidiomicetos que causam a decomposição branca. Esses fungos agem através da penetração de suas hifas pelo lúmen das células, as quais ali instaladas produzem uma variedade de metabólitos extracelulares que vão, assim, atuar degradando os componentes da parede celular vegetal. A característica comum desses fungos é a capacidade de degradar lignina, assim como celulose e polioses. Entretanto, as velocidades relativas de decomposição da lignina e polissacarídeos variam grandemente de acordo com a espécie fúngica. Esta classe de fungos pode ser distinguida em dois grupos: o grupo dos fungos que degradam simultaneamente todos os componentes lignocelulósicos e o grupo dos fungos que degradam primeiramente a lignina e a hemicelulose, preservando a celulose (Figura 16.2). Embora o nível de cada atividade enzimática varie entre os fungos, em geral eles não são bons produtores de celulases, e a seletividade de alguns está relacionada a uma atividade de celulase total baixa.

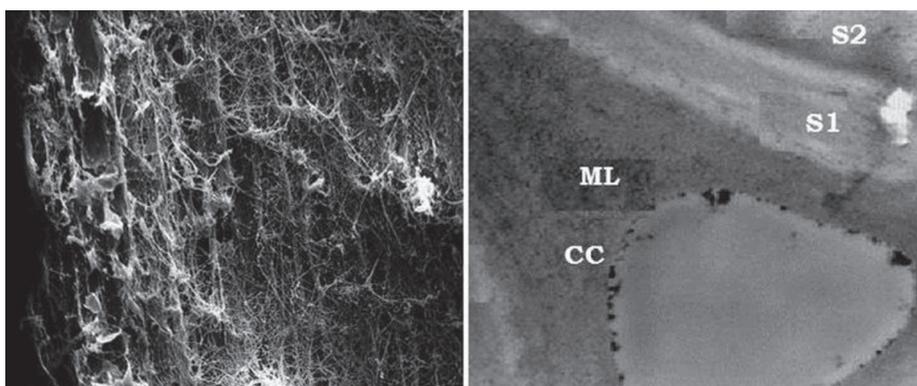


Figura 16.2 Micrografia do crescimento de um fungo de degradação branca seletiva em material lignocelulósico e características micro-morfológicas da degradação da parede celular (CC – canto da parede celular; ML – lamela média; S1, S2 – camadas da parede celular).

16.2.1 Aspectos relevantes da produção e caracterização das enzimas de fungos cultivados em madeira

Numerosos estudos são descritos na literatura a respeito da produção e caracterização de enzimas lignocelulolíticas por fungos pertencentes à classe

Basidiomicotina, degradadores de madeira. A maioria desses estudos, porém, tem sido conduzida em meios de cultura líquidos, quimicamente definidos, geralmente na presença de indutores enzimáticos e sob condições controladas de tensão de oxigênio, temperatura, pH, agitação etc.

Em ambientes naturais, os fungos colonizam e crescem sobre seu substrato sólido de forma muito diferente da que ocorre em culturas submersas, utilizadas na maioria dos estudos de degradação de lignina ou celulose. Consequentemente, essa diferença nas condições de crescimento deve afetar a expressão da bateria enzimática que compõe o sistema lignocelulolítico dos fungos. Alguns poucos estudos na literatura descrevem a produção de enzimas durante o crescimento dos fungos sobre madeira. Na maioria destes, técnicas imunocitoquímicas são utilizadas para demonstrar a localização das enzimas lignocelulolíticas no substrato⁸.

Sethuraman et al.⁹ demonstraram que o padrão de produção das enzimas é extremamente dependente da fonte de carbono utilizada. Os autores afirmam que *Ceriporiopsis subvermispora*, um fungo causador de podridão branca da madeira e conhecido devido à sua habilidade de degradar lignina seletivamente¹⁰, apresentou uma baixa atividade celulolítica, mas uma alta atividade hemicelulolítica e ligninolítica quando cultivado em meios com glicose, celobiose e celulose Avicel ou Whatman. Considerando a atividade celulolítica, detectou-se atividade para as endocelulases e quantidades não significantes de atividade para exocelulases. Esse fungo apresentou um crescimento restrito sobre substratos de celulose cristalina devido à falta de um sistema celulolítico completo, o que acarreta uma degradação limitada dos componentes celulósicos.

Como, em extratos obtidos durante a biodegradação de *Pinus radiata*¹¹ e *Eucalyptus grandis*¹² por esse fungo, a atividade de manganês peroxidases (MnPs) é abundante, tais enzimas, produzidas em um eventual processo operado em escala industrial, poderiam ser recuperadas por extração dos cavacos biodegradados previamente à polpação propriamente dita¹³ e aproveitadas para fins variados¹⁴.

À semelhança do observado para outros fungos, as MnPs produzidas por *C. subvermispora* apresentam-se como múltiplas isoenzimas. Tal multiplicidade pode implicar em diferenças nos espectros de ação e nas concentrações de Mn^{2+} e H_2O_2 requeridas por cada uma delas para oxidar compostos com estruturas distintas¹⁵.

Na sequência são apresentados dados de um estudo em que *C. subvermispora* foi utilizado para a produção de enzimas a partir de cavacos de *E. grandis* na presença ou ausência de nutrientes, glicose e milhocina¹⁶⁻¹⁷.

16.2.1.1 Produção de micélio e biodegradação da madeira

A produção de micélio como inóculo é usada principalmente com fungos que não esporulam ou que apresentam dificuldade de esporulação. Nesse caso, é requerido inicialmente o cultivo em meio sólido e, após o período de incubação, discos com diâmetro definido são transferidos para frascos contendo meio líquido, em reatores convencionais com aeração (Figura 16.3a). Após o período de incubação, o micélio obtido é filtrado, lavado e triturado em homogeneizadores com tempo e velocidade padronizados. A determinação e calibração da concentração do inóculo exigem maiores cuidados e padronizações dos procedimentos, a fim de garantir a repetibilidade dos experimentos. Para isso, uma amostra da suspensão de micélio é seca e pesada para determinação da massa seca de fungo presente numa alíquota dessa suspensão. Uma perfeita colonização de cavacos pode ser obtida usando-se uma concentração inicial de micélio igual a 500 mg por quilo de madeira (massa seca).

Além da padronização da concentração de inóculo, é fundamental empregar inóculo viável. Para tanto, recomenda-se o cultivo em reatores com injeção de ar e com o menor nível possível de cisalhamento¹⁸ (Figura 16.3b).



Figura 16.3 (a) Biorreator agitado por pás e (b) de baixo cisalhamento com agitação e aeração por tubo em L.

Previamente à inoculação de cavacos de madeira, estes devem ser mantidos em água destilada por um período de 12 a 16 horas. Após a drenagem da água, os cavacos terão umidade de 60%. A operação de inoculação é feita por aspersão, quando então são adicionados o(s) devido(s) cossustratos e a suspensão de micélio fúngico ou, alternativamente, por inoculação por semente, utilizando cavacos pré-cultivados com fungo.

O cultivo em biorreatores pode ser realizado de formas diferentes; no entanto, o que mais se recomenda para cavacos é a utilização de um sistema aerado, utilizando-se fluxo de ar igual a 23 L/h e com agitação intermitente, tipo tambor rotativo. Na ausência desses reatores, podem-se utilizar baldes de polietileno fechados com tampa e com uma entrada para ar¹⁹ (Figura 16.4).

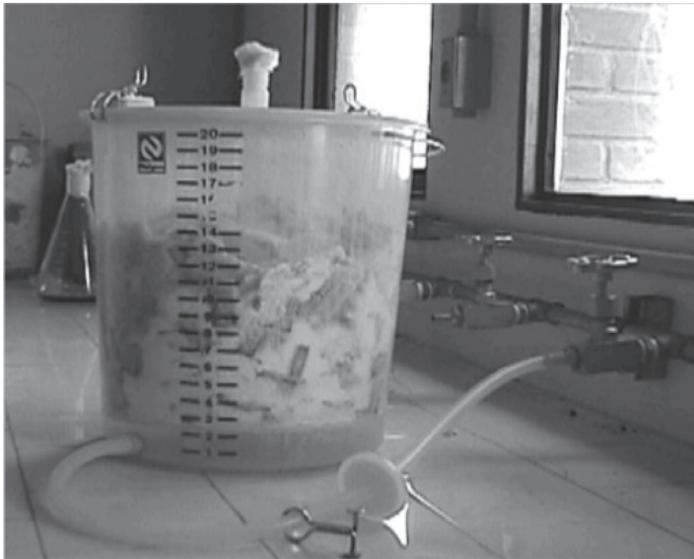


Figura 16.4 Biorreator aerado com ar umidificado com cavacos de madeira, inoculado com *Ceriporiopsis subvermispora*.

Embora o sistema de cultivo em meio sólido seja o sistema preferido para a produção de muitas enzimas de interesse industrial por fungos filamentosos, a recuperação dessas enzimas do substrato é um processo laborioso e complexo, principalmente quando substratos lignocelulósicos são utilizados. Não existe uma metodologia padrão descrita na literatura para a recuperação de proteínas desses substratos sólidos. Isto se dá porque os processos de recuperação ou extração dependem do micro-organismo utilizado, tipo

do substrato (natureza, tamanho de partícula, porosidade etc.) e do tipo de proteína a ser extraída. Segundo Leatham et al.²⁰, é importante compreender as limitações da extração de enzimas desde substratos lignocelulósicos. Os autores afirmam que, no caso de madeira, pode-se assumir que somente as enzimas presentes sobre as superfícies hidratadas e expostas desse substrato podem ser extraídas.

Dentre os fatores mais importantes a serem considerados na recuperação das enzimas a partir dos cavacos, estão a natureza da solução de extração, concentração, volume e pH. Também devem ser consideradas as condições de extração, tais como temperatura e agitação, e a quantidade de extrações feitas para recuperação da maior parte da atividade²⁰⁻²¹.

Proteínas microbianas extracelulares produzidas durante a degradação de madeira podem estar ligadas à membrana celular do micro-organismo, adsorvidas na superfície da madeira ou formando agregados dentro do lúmen das células da madeira, devido à natureza hidrofóbica das proteínas²². Por esse motivo, é essencial a utilização de soluções com forças iônicas apropriadas e agentes solubilizantes de membrana para melhorar o rendimento da recuperação enzimática.

O número de extrações necessárias para máxima recuperação enzimática parece ser um assunto mais difícil de estabelecer, uma vez que, dependendo da enzima, às vezes até a quarta extração ainda é possível detectar uma atividade significativa. Porém, após duas extrações consecutivas, na maioria das vezes é possível recuperar mais de 80% da atividade, para a maioria das enzimas estudadas²³.

As enzimas recuperadas durante a extração correspondem a enzimas extracelulares que estão associadas ou adsorvidas ao micélio fúngico e às superfícies expostas dos cavacos. Extratos preparados a partir dos cavacos biodegradados por *C. subvermispota* suplementados (CN) ou não (SN) com nutrientes, glicose (0,5% m/m) e milhocina (0,5% m/m) foram analisados quanto à atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas (Tabela 16.1), confirmando o alto potencial ligninolítico e a baixa capacidade celulolítica exibidos pelo fungo²⁴.

Com relação à atividade de MnPs, verificou-se que esta aumentou gradativamente durante o período de biodegradação, tanto na presença quanto na ausência de nutrientes; na presença de nutrientes, entretanto, a atividade de MnPs foi sempre consideravelmente superior, independentemente do tempo de cultivo.

Tabela 16.1 Atividades enzimáticas (UI/Kg de madeira seca) determinadas nos extratos preparados a partir dos cavacos de *E. grandis* biodegradados por *C. subvermispota* durante diferentes períodos, na presença (CN) ou ausência (SN) de conutrientes

ENZIMA	7 DIAS		14 DIAS		28 DIAS	
	SN	CN	SN	CN	SN	CN
Endoglucanases	54	135	133	275	110	137
Celobio-hidrolases	0	0	0	0	0	0
β -glicosidases	9	16	15	23	87	132
Xilanases	260	402	376	541	123	252
β -xilosidases	0	0	0	0	0	0
Mananases	381	385	213	267	87	75
Lacases	10	6	2	1	6	29
Manganês peroxidases	430	1.013	765	2.066	896	2.323
Lignina peroxidases	0	0	0	0	0	0

Após o cultivo, podem-se avaliar os compostos aromáticos e hemeproteínas dos extratos com medidas de absorvâncias em 280 nm²⁵ e 405 nm²⁶, respectivamente (Figura 16.5). Dessa forma, a variação da concentração dos produtos de degradação da lignina com o tempo de cultivo pode ser estimada através da multiplicação dos valores de absorvância em 280 nm pelos respectivos fatores de diluição empregados nas análises. Ressalta-se, porém, que a adição de conutrientes aos cavacos de madeira previamente ao cultivo do fungo aumenta a velocidade de biodegradação em cerca de 40% (Figura 16.6).

16.2.1.2 Métodos utilizados para a limpeza e concentração de proteínas extracelulares de fungos

Apesar da vantagem do uso dos materiais lignocelulósicos para a produção de enzimas ligninolíticas, estes são ricos em compostos indesejáveis como lignina, extrativos, resinas etc., sendo este um dos problemas encontrados para a caracterização de proteínas e enzimas de fungos cultivados em materiais lignocelulósicos.

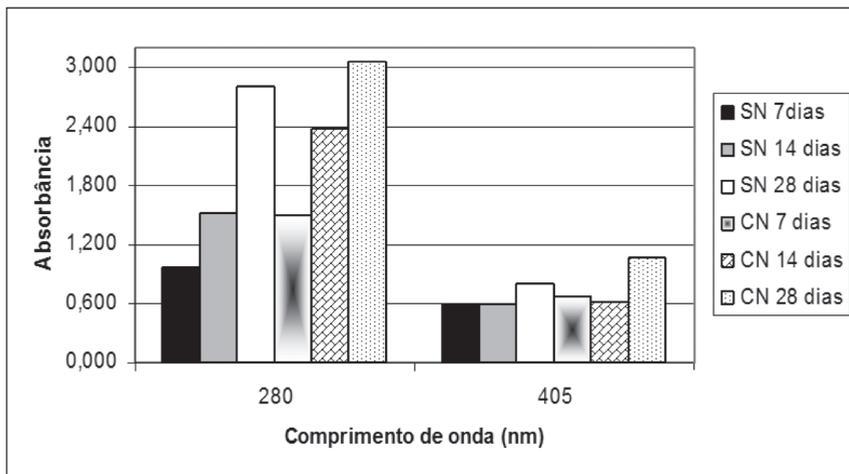


Figura 16.5 Absorbâncias, a 280 nm (extratos diluídos) e a 405 nm (extratos não diluídos), dos extratos obtidos ao longo dos cultivos na presença (CN) ou ausência (SN) de nutrientes.

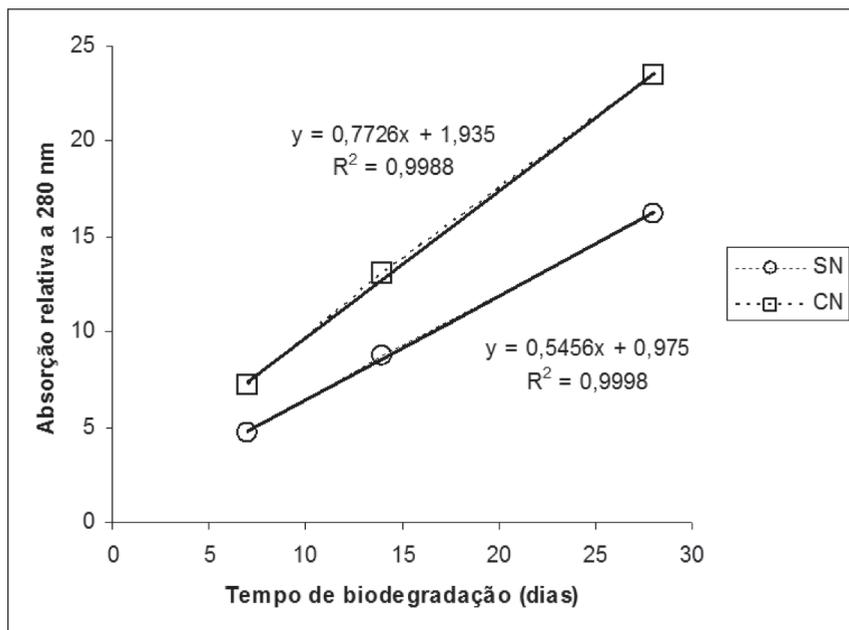


Figura 16.6 Absorção relativa a 280 nm dos extratos enzimáticos obtidos ao longo dos cultivos conduzidos na presença (CN) ou ausência (SN) de nutrientes.

As proteínas podem ligar-se a compostos fenólicos em meio aquoso através de diferentes mecanismos, como ligações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O produto resultante da degradação de ligninas é mais hidrofóbico e suscetível à agregação e precipitação da proteína. Algumas características estruturais das proteínas, como regiões ricas em prolina, predisõem-nas à formação do complexo. Compostos fenólicos podem também formar ligações covalentes irreversíveis com proteínas como uma consequente oxidação a quinonas.

Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam as enzimas ou alteram a mobilidade das moléculas de proteínas, em géis ou resinas. Portanto, é necessária a remoção dessas substâncias para que o procedimento de separação e identificação das proteínas apresente um resultado sem interferências, devendo ser incluídos nos procedimentos de purificação de proteínas métodos capazes de eliminar compostos que prejudiquem as técnicas analíticas de determinação de proteínas e atividades enzimáticas e a eletroforese.

Além de interferir na quantificação e caracterização de proteínas, a presença de extrativos e derivados de lignina também interfere na determinação de atividades enzimáticas^{11,27}. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos adequados para a remoção seletiva dos contaminantes presentes nos extratos é uma parte importante de trabalhos que visam purificar e caracterizar enzimas de interesse produzidas durante a biodegradação de materiais lignocelulósicos.

Um número diferente de métodos já foi estudado para a remoção das substâncias provenientes da madeira e que conferem uma cor marrom ao extrato enzimático. A extração de proteínas com ácido tricloro acético (TCA), fenol, e mesmo a remoção prévia dos extrativos da madeira em água, foram técnicas empregadas com o objetivo de se obter preparações proteicas mais limpas e com menos contaminantes. A extração de cavacos em água ou etanol/água previamente à inoculação de fungos em madeiras mostrou-se bastante eficiente na remoção de compostos aromáticos²⁸.

Para a remoção de compostos aromáticos presentes em extratos de materiais lignocelulósicos biodegradados pode-se usar também a polivinilpirrolidona (PVPP) que tem origem na polimerização da vinilpirrolidona, sendo o produto obtido formado por macromoléculas em rede. A adsorção de polifenóis por PVPP se dá através da OH do polifenol e do grupo carbonila de PVPP, juntamente com a sobreposição (elétrons desemparelhados) das interações polares e hidrofóbicas entre o anel aromático do polifenol e o anel de PVPP. Em um trabalho realizado por Magalhães²⁹, foram testadas

concentrações de PVPP entre 1,0% e 5,0%; entretanto a máxima redução na absorbância a 280 nm obtida, utilizando-se 5,0% de PVPP, foi de apenas 8,5%. De acordo com Toth e Pavia³⁰, a eficiência de PVPP na adsorção de compostos aromáticos é aumentada em menores valores de pH, por haver favorecimento da formação de pontes de hidrogênio entre adsorvente e adsorbato.

Resinas de troca iônica também podem ser empregadas para limpeza de extratos enzimáticos. A limpeza de extratos enzimáticos em resinas de troca iônica tem por objetivo remover eficientemente não só grande parte da cor dos extratos, mas também compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos furânicos e metais, contaminantes que podem interferir na obtenção dos resultados da purificação. As resinas de troca iônica são constituídas por um esqueleto tridimensional ao qual se fixam os grupos ativos. Estas permitem trocar os íons não desejáveis da solução problema por aqueles que se encontram saturando os grupos funcionais da resina. Um estudo conduzido com o extrato de cultivo de *C. subvermispota* exemplifica a possibilidade de extração das MnPs em coluna empacotada com resina trocadora de ânions (DEAE Sepharose) em pH 4,8 (Figura 16.7). Sabe-se que as MnPs produzidas por *C. subvermispota* apresentam pontos isoelétricos (pIs) que variam entre 3,2 e 4,4²⁷. Por outro lado, os contaminantes encontrados em extratos preparados a partir de madeira biodegradada normalmente apresentam pK_a s em valores básicos da escala de pH³¹.

Toda a atividade de MnPs contida em 50 mL do extrato foi adsorvida em 10 mL de resina, sem levá-la a indícios de saturação (Figura 16.7a). A Figura 16.7b mostra que a absorbância a 280 nm foi inferior àquela encontrada no extrato bruto em todas as frações obtidas durante o procedimento experimental. Esse procedimento evidencia a possibilidade do emprego de extração em fase sólida como uma etapa que, além de levar à concentração das enzimas de interesse, minimiza a concentração de compostos que absorvem a 280 nm, mas não têm afinidade pela resina.

O carvão ativado é um excelente adsorvente de compostos que absorvem a 280 nm, graças à sua alta área superficial e à presença de uma variedade de grupos funcionais em sua superfície. O oxigênio é o principal átomo que aparece na rede de carbono, presente principalmente nos grupos funcionais carbonila, carboxila, hidroxila e enois. Esses grupos superficiais influenciam a reatividade e as propriedades de adsorção do material.

Tem-se estabelecido que a principal forma de interação entre fenol e carvão ativado é através da ligação entre os elétrons do sistema π , ou seja, os elétrons π do anel aromático do fenol ligam-se ao sistema π das camadas

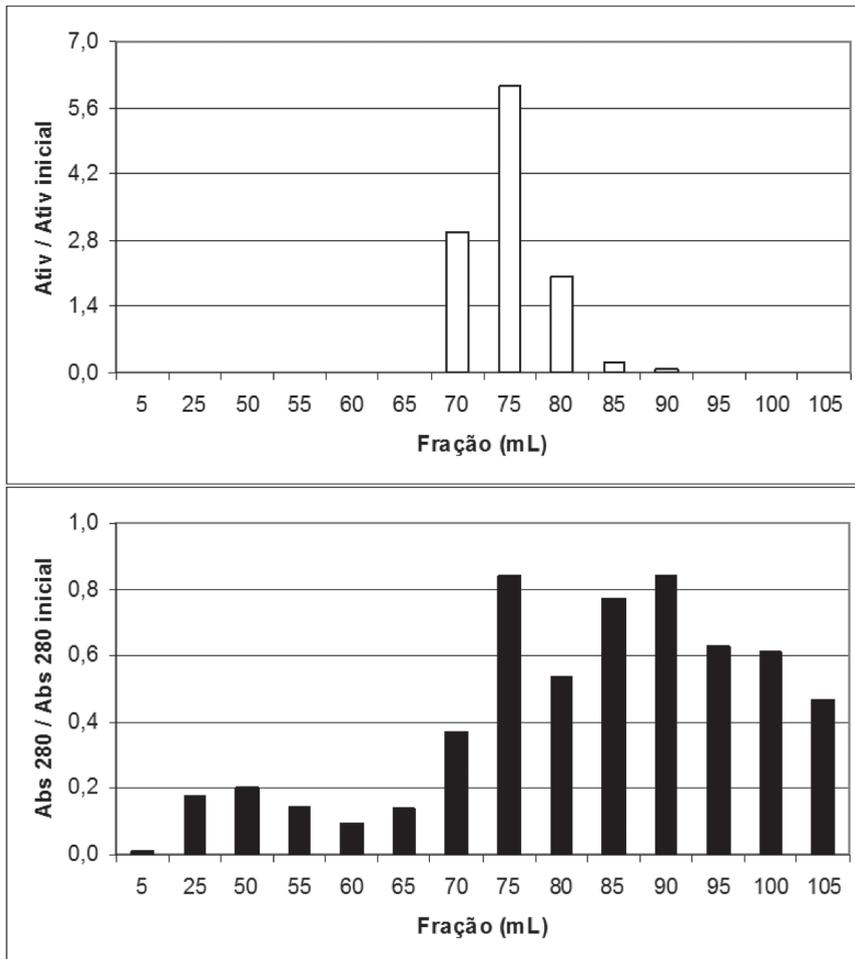


Figura 16.7 Relação entre a atividade de MnPs no eluato e no extrato de *C. subvermispora* (a) cultivado em madeira e conutrientes (CN) e (b) entre a absorbância a 280 nm no eluato e no extrato CN, respectivamente efluente e afluyente, durante as etapas de carregamento (0 mL a 50 mL), lavagem (55 mL a 60 mL) e eluição (65 mL a 105 mL) da coluna empacotada com a resina DEAE Sepharose em pH 4,8. Concentração de NaCl utilizada na eluição: 65 mL (0 M a 0,1 M), 70 mL (0,1 M), 75 mL (0,1 M a 0,2 M), 80 mL (0,2 M), 85 mL (0,2 M a 0,3 M), 90 mL (0,3 M), 95 mL (0,3 M a 0,4 M), 100 mL (0,4 M), 105 mL (0,4 M a 0,5 M).

grafíticas do carvão. Essa interação ocorre paralelamente ao plano basal do carvão ativado.

A partir de estudos de adsorção de extratos enzimáticos com atividade de MnP em carvão ativado ficou demonstrado que a concentração necessária para alcançar alta eficiência de adsorção depende do tempo de biodegradação

dos cavacos e da presença ou ausência de nutrientes durante o cultivo do fungo. Extratos mais “limpos”, em geral, apresentam menor seletividade na remoção de compostos que absorvem em 280 nm durante a adsorção em carvão ativado¹⁷.

A seguir, serão apresentados dados de recuperação da atividade de MnPs de extratos preparados a partir dos cavacos biodegradados por 7, 14 e 28 dias submetidos à adsorção em carvão ativado, variando-se a concentração de carvão de forma a maximizar a recuperação (Tabela 16.2).

Tabela 16.2 Valores percentuais de atividade de MnPs e de absorção relativa a 280 nm remanescentes nos extratos enzimáticos após adsorção em concentrações selecionadas de carvão ativado

EXTRATO	CARVÃO (% M/V)	ATIVIDADE (%)	ABSORÇÃO A 280 NM (%)
SN 7 dias	0,5	90,7	59,4
SN 14 dias	1,5	93,1	35,8
SN 28 dias	3,0	85,2	26,9
CN 7 dias	1,0	92,6	40,3
CN 14 dias	2,0	98,5	35,3
CN 28 dias	3,0	102,7	30,3

Cultivo em madeira na presença (CN) ou ausência (SN) de nutrientes.

Conforme pode ser observado, dependendo do extrato e da concentração de carvão ativado utilizados, foi possível remover entre 40% e 75% da absorção a 280 nm com apenas pequenas perdas na atividade de MnPs, inferiores a 15%.

Na sequência, os extratos foram submetidos à recuperação das enzimas com o auxílio da resina DEAE Sepharose em pH 4,8; que foi seguida pela eluição no mesmo tampão, adicionado de NaCl 0,2 M (Tabela 16.3).

Tabela 16.3 Atividade de MnPs, absorção relativa a 280 e a 405 nm e concentração de proteínas, determinados nos extratos após o condicionamento com carvão ativado e resina trocadora de ânions

EXTRATO	ATIVIDADE(UI/ML)	ABSORÇÃO A 280 NM	ABSORÇÃO A 405 NM	PROTEÍNAS (MG/ML)
SN 7 dias	3,63	15,02	0,85	0,16
SN 14 dias	12,27	12,74	1,08	0,17

EXTRATO	ATIVIDADE(UI/ML)	ABSORÇÃO A 280 NM	ABSORÇÃO A 405 NM	PROTEÍNAS (MG/ML)
SN 28 dias	7,81	40,55	1,50	0,22
CN 7 dias	14,39	31,80	1,89	0,35
CN 14 dias	23,50	34,30	2,69	0,24
CN 28 dias	20,02	50,35	2,43	0,39

A Tabela 16.3 mostra que, após o condicionamento com carvão ativado e resina trocadora de ânions, as atividades de MnPs chegaram a valores de até 23,50 UI/mL. Embora os valores de absorção relativa a 280 nm tenham sido superiores àqueles determinados nos respectivos extratos brutos, os aumentos nos valores de atividade de MnPs (superiores a 30 vezes) foram muito mais expressivos que os aumentos nos valores de absorção relativa a 280 nm (inferiores a 5 vezes). Apesar disso, picos de absorção de luz no comprimento de onda de 405 nm, típicos de hemeperoxidasas purificadas, foram observados apenas nos extratos SN 14 dias, CN 14 dias e CN 28 dias (Figura 16.8).

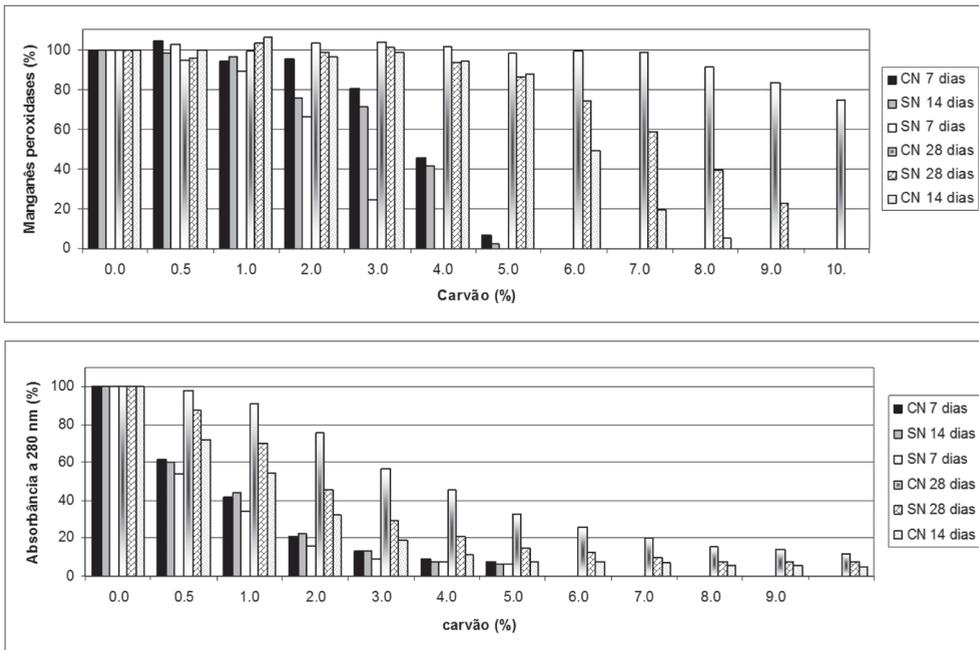


Figura 16.8 Espectros de absorção relativa obtidos após o condicionamento dos extratos com carvão ativado e resina trocadora de ânions.

O fato de os aumentos nos valores de absorção relativa a 405 nm (1,9 a 4,5 vezes) terem sido muito menores que aqueles esperados com base nos valores de atividade de MnPs (33,9 a 105,8 vezes) demonstra que o condicionamento dos extratos acarreta a remoção de inibidores da atividade enzimática. Comportamento semelhante, observado durante a extração de MnPs com uma outra resina trocadora de ânions (Q Sepharose), também foi reportado por Lobos e colegas²⁷.

A caracterização do perfil de bandas proteicas e de atividade enzimática MnPs nos extratos secretados pelo fungo foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando-se sistema descontínuo³⁰. As bandas de proteínas foram reveladas com nitrato de prata, após eletroforese em condições desnaturantes. A presença de bandas com atividade de MnPs foi detectada após eletroforese em condições não desnaturantes, empregando-se mistura constituída por 1,75 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 3,2), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,5 mL de sulfato de manganês 1 mM, 0,25 mL de albumina bovina 1,8%, 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,25 mL de extrato enzimático.

Carvalho et al.¹⁶ separaram duas bandas proteicas principais, com massas molares relativas (M_r) iguais a $46,8 \pm 0,6$ KDa e $51,6 \pm 1,0$ KDa, dos extratos preparados a partir dos cavacos biodegradados; tanto na presença (CN) quanto na ausência (SN) de conutrientes. Nos cultivos não suplementados, essas duas bandas foram claramente visualizadas nos extratos obtidos após 28 dias de biodegradação (SN 28 dias); nos suplementados, após 14 dias (CN 14 dias). A atividade de MnPs foi confirmada pela coloração dos respectivos géis com vermelho de fenol em presença de H_2O_2 após eletroforese sob condições não desnaturantes, com bandas bastante difusas tendo sido geralmente observadas (Figura 16.9).

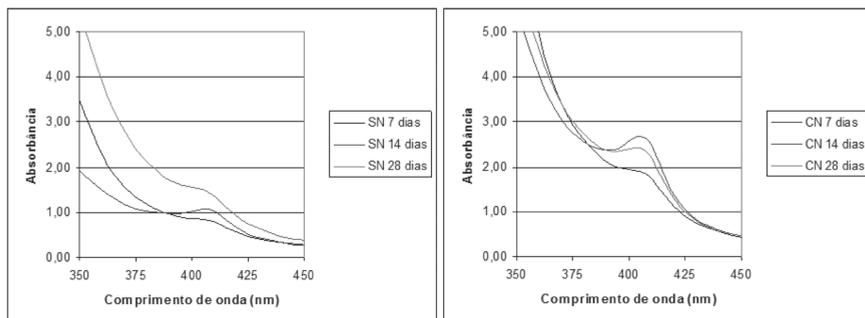


Figura 16.9 Espectros de absorção relativa obtidos após o condicionamento dos extratos com carvão ativado e resina trocadora de ânions.

Para a obtenção de bandas bem definidas e livres de artefatos, os extratos tiveram que passar por condicionamento. Portanto, a avaliação do resultado é difícil em virtude de haver alguma alteração composicional nesta etapa. Esse procedimento limita o analista a concluir que a suplementação nutricional altera o padrão das principais proteínas extracelulares produzidas pelo fungo. Como demonstrado nos exemplos anteriores, a suplementação nutricional apenas acelera o desenvolvimento do micro-organismo sobre os cavacos da madeira.

16.3 USO DE ENZIMAS OXIDATIVAS NO BIOBRANQUEAMENTO DE PÓLPAS CELULÓSICAS

O branqueamento é um tratamento que tem como objetivo aumentar a alvura e limpeza de polpas celulósicas cuja maior parte da lignina foi removida por algum tratamento. A remoção da lignina residual de polpas normalmente é conduzida em uma sequência multiestágios, com o uso de produtos clorados, oxigênio, ozônio ou peróxido de hidrogênio, variando de acordo com o grau de alvura desejado. As enzimas oxidativas podem ser um desses agentes, pois, como já descrito, agem na lignina através da formação inicial de um radical catiônico que induz a ruptura de ligações e a consequente degradação química dos intermediários formados.

A descrição de vários fungos eficientes em degradar lignina possibilitou os estudos de aplicação em processos industriais, como um meio de melhorar a seletividade dos processos de polpação e de branqueamento³¹. Mais recentemente, experimentos laboratoriais de deslignificação por fungos também têm sido realizados para produção de bioetanol^{32,33}. A modificação, degradação e remoção da lignina por fungos diminuem a recalcitrância do material lignocelulósico. Isso poderia ser traduzido em economia de produtos químicos de polpação e/ou pré-tratamento. Entretanto, como os fungos demandam um longo tempo para causar modificações na estrutura do material lignocelulósico, são inviáveis para o uso industrial.

As enzimas oxidativas são de interesse para diversos processos industriais de transformação que envolva lignina ou outros compostos aromáticos. Alguns fatores dificultam a aplicação de enzimas, dentre os quais os mais importantes são o volume requerido de enzima e as condições dos processos, uma vez que as enzimas fúngicas atuam normalmente na temperatura de 30 °C a 40 °C e em pH de 3 a 5. Porém, em estudos de polpação em escala laboratorial, antes de serem processados, os cavacos

biodegradados são lavados com um volume de líquido/sólido na razão de 3:1 (v/p). O extrato enzimático obtido é rico principalmente em xilanases e Mn-peroxidases^{11,14,34}. Tais enzimas são potencialmente importantes em biobranqueamento de polpas celulósicas, em que a lignina é removida quase completamente após o processo de polpação, porém uma parte é capaz de permanecer na polpa interferindo na qualidade do produto final³⁵.

16.3.1 Uso de lacases

As lacases são enzimas que, para degradar a lignina, necessitam primeiramente oxidar mediadores que, por sua vez, atuam como agentes oxidantes da lignina residual presente em polpas celulósicas. Na ausência de mediador, a lacase age polimerizando a lignina em vez de degradá-la. O primeiro mediador de lacase testado para oxidar a lignina foi o *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid* (ABTS). O uso de ABTS não tem utilidade prática por ser um composto tóxico e de custo incompatível com os processos de deslignificação. Muitos estudos já foram realizados em busca de outros mediadores eficientes na degradação de lignina, menos tóxicos e de baixo custo. Um mediador redox ideal deve ser um bom substrato para lacase, suas formas oxidadas e reduzidas devem ser estáveis durante o ciclo redox do mediador, desempenhando, dessa forma, muitos ciclos de reação sem sua degradação³⁶. O 1-hidroxibenzotriazol (HBT) é um mediador bastante eficiente para os processos de deslignificação, embora apresente custo elevado. Metabólitos fúngicos como o ácido 3-hidroxiantranílico³⁷ e compostos derivados de lignina, principalmente compostos fenólicos³⁸, também já foram testados, porém não apresentaram a mesma eficiência do HBT³⁹⁻⁴⁰. Como a ação da enzima é essencialmente oxidativa, e não de mineralização completa da lignina, o tratamento requer uma etapa subsequente de extração alcalina para remover a lignina oxidada, de forma muito similar ao que se observa nos sistemas de branqueamento químico.

As condições de tratamento com lacase requerem um pH entre 4,5 a 6,0, e a temperatura não ultrapassa os 50 °C. Os níveis de utilização da enzima em geral são elevados. Trabalhos recentes mostram níveis de produção de lacase tão elevados quanto 740 U/mL⁴¹. Assim, é importante definir o melhor ponto de aplicação da lacase no processo de branqueamento, a fim de manter a maior eficiência catalítica e diminuir a carga empregada no branqueamento. A melhor performance da lacase tem sido obtida com polpas tratadas com oxigênio (*kraft/O₂*), e não com as polpas marrons saídas do reator principal.

No entanto, isso parece depender claramente do tipo de polpa empregado, e seria necessário avaliar essa questão para cada caso que se faça necessário.

Call e Muncke⁴⁰ otimizaram as cargas de enzimas, mediador, pH e temperatura de reação obtendo 57% de deslignificação da polpa celulósica, medido pelo número kappa. Em uma etapa subsequente, a condição otimizada do branqueamento foi avaliada em uma planta piloto, e o resultado de deslignificação foi confirmado. Como consequência, a alvura da polpa aumentou de 38% para 55% ISO. Com uma etapa de branqueamento posterior utilizando o peróxido de hidrogênio, a alvura final atingiu o valor de 76,5% ISO.

Esse não foi o único ensaio de tratamento de polpas com lacase em escala piloto. Ibarra e colegas⁴² usaram sequências de branqueamento combinando oxigênio, lacase e peróxido de hidrogênio e observaram que nas sequências com lacase as polpas finais resultaram em menor número kappa do que as obtidas nas sequências sem lacase. A alvura das polpas em questão foi proporcional à remoção de kappa, sendo 91,2% ISO na sequência que incluía lacase contra 87,9% no controle.

O elevado custo dos mediadores tem sido o maior entrave no emprego de branqueamento com lacases. Camarero et al.⁴³ avaliaram o uso de mediadores alternativos, por exemplo, os compostos nitrogenados frequentemente usados na indústria de alimentos, assim como compostos fenólicos correlacionados com subestruturas de lignina. A acetosiringona destacou-se entre os mediadores, tanto para a redução de kappa quanto para a elevação da alvura da polpa; entretanto, comparado ao HBT, os mediadores testados foram menos eficientes.

A demanda por mediadores é da ordem de 10 Kg/t de polpa. Contudo, o uso de fenóis derivados da lignina ou misturas de licor *kraft* poderiam ser utilizados. Compostos fenólicos gerados a partir da degradação de substratos lignocelulósicos por fungos têm sido usados como modelos de mediadores de lacase para descoloração de corantes reativos³⁸.

Outro aspecto relevante nos estudos de branqueamento com lacases é que, dependendo da origem da lacase, obtêm-se diferenças de deslignificação³⁹.

16.3.2 Uso de MnP

O uso de MnP no branqueamento de polpas promove altos níveis de deslignificação e de alvura, mas requer a presença de vários coadjuvantes no meio reacional. Para a MnP atuar é necessária a presença de um

ácido orgânico como láctico, oxálico ou malônico, MnSO_4 , Tween 60 ou outra mistura surfactante rica em ácido graxo poli-insaturado e H_2O_2 . Este último deve ser adicionado preferencialmente de forma contínua ao longo da reação.

Os estudos de branqueamento com MnP purificada de *Phanerochaete sordida* em polpas celulósicas com kappa inicial de 17 e alvura de 31,8% resultou após uma extração alcalina em uma polpa com kappa 11 e alvura de 44%. Ao se repetir essa sequência MnP/álcali por seis vezes obteve-se uma polpa com 75% de alvura. Esse ensaio foi obtido com elevadas cargas de enzima (100 UI/g de polpa) por um tempo prolongado de 24 horas. A presença de ácidos graxos insaturados, sulfato de manganês e peróxido de hidrogênio foi fundamental para alcançar o resultado positivo de branqueamento. O efeito branqueador da MnP está relacionado a reações de peroxidação de lipídeos, que, ao gerar radicais organoperoxila, atuam na degradação da lignina¹⁴.

O uso de MnP imobilizada proporcionou a geração de Mn^{3+} ou radicais organoperoxila quando uma solução contendo MnSO_4 , H_2O_2 , ácido malônico e Tween 80 foi passada pela coluna de imobilização. A reação enzimática foi conduzida a 40 °C e os produtos da reação foram eluídos e transferidos para o reator de branqueamento a 70 °C. A alvura da polpa obtida alcançou 88% após sete ciclos de branqueamento enzimáticos seguidos de extração alcalina⁴⁴.

Um estudo de branqueamento de polpas em um reator de quatro litros com a sequência composta por MnP/quelante/peróxido de hidrogênio alcalino e carga de enzima de 20 U/g de polpa resultou numa polpa com 86% de alvura em relação ao controle de 80%, cujas propriedades mecânicas não foram alteradas.

Um fator que afeta a eficiência da MnP é o tipo de quelante usado para os íons Mn_3^+ . Feijoo et al.⁴⁵ avaliaram diversos quelantes durante o teste de branqueamento com MnP e definiram que o oxalato foi o quelante que deu melhor resultado. Todo o processo requereu a otimização da concentração de MnSO_4 e H_2O_2 , com resultado da ordem de 30 μM a 50 μM e 40 μM a 50 μM , respectivamente. A adição do peróxido de hidrogênio foi feita com pulsos de cinco minutos a partir da diluição de uma solução estoque de maior concentração. O branqueamento com enzima e peróxido produziu uma polpa com 83% de alvura, e no controle, sem enzima, a alvura foi bem menor (77%).

16.3.3 Uso de LiP

A enzima lignina peroxidase tem sido muito menos avaliada em estudos de biobranqueamento de polpas *kraft* do que as lacases e as MnPs. Isso se deve ao fato de a enzima LiP ser produzida por poucos micro-organismos e ser secretada somente em condições de cultivo bastante especiais, principalmente em decorrência da limitação de carbono ou nitrogênio nos meios de cultura¹. Em geral, os estudos de branqueamento realizados com LiP utilizaram extratos brutos de cultivo, ou seja, nestes extratos há outras enzimas. Esse fato dificulta muito o discernimento de quais são os agentes envolvidos no biobranqueamento. Um branqueamento enzimático de polpa *kraft* de eucalipto realizado com uma mistura de LiP, MnP e celobiose desidrogenase mostrou-se vantajoso para reduzir o número kappa em relação a um branqueamento ao controle utilizando apenas álcali⁴⁶. O uso de misturas de enzimas é uma condição bastante favorável para o branqueamento de polpas devido à ocorrência de um efeito sinérgico, conforme reportado por Antonopoulos et al.⁴⁷, para a mistura de peroxidases e xilanases. Esse preparado enzimático atuou em condição levemente alcalina (pH 7,6) e ocasionou uma redução de 2,8 pontos no número kappa de polpas, com kappa inicial de 11,7.

A produção de LiP em fermentadores é expressivamente menos eficiente do que lacase e MnP, e isso limita muito a aplicação dessa enzima em processos de biobranqueamento. De fato, a diferença de produtividade é da ordem de mil vezes menos para a LiP, visto que essa enzima é frequentemente produzida e expressa em unidades por litro (UI/L), enquanto os valores de atividades obtidos com lacases e MnPs são expressos em UI/mL.

16.4 PRINCÍPIOS BÁSICOS DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE POLPAS

16.4.1 Procedimento de recuperação de enzimas de cavacos de madeira biotratados

Micro-organismo, preparo do inóculo e biodegradação da madeira

Ceriporiopsis subvermispora deve ser mantido em ágar extrato de malte a 4 °C, e das placas retira-se 20 discos com diâmetro de 8 mm para inoculação em frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio à base de extrato de batata-dextrose (2,4%) e de extrato de levedura (0,7%). Após 12 dias

de incubação estática a 27 °C, o micélio obtido deve ser filtrado, lavado e macerado com água esterilizada.

Biorreatores de polietileno com capacidade de 20 L são preenchidos com 2 Kg de cavacos de eucalipto (massa seca) e mantidos imersos em água por um período de 12 horas. Após drenagem e esterilização a 121 °C por 15 minutos, os biorreatores podem ser inoculados com uma alíquota da suspensão de micélio obtida da maneira descrita no parágrafo anterior, de forma a se obter uma concentração inicial de micélio igual a 500 mg por quilo de madeira (massa seca), podendo ser suplementados ou não com conutrientes, glicose (0,5% m/m) e milhocina (0,5% m/m). Os biorreatores inoculados necessitam ser agitados para homogeneização de seu conteúdo e incubados a 27 °C por 28 dias, utilizando-se fluxo de ar igual a 23 L/h.

Preparo dos extratos enzimáticos

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, o conteúdo do biorreator (micélio e cavacos) é então transferido, em frações de 200 g, para frascos Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL do tampão de extração (acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, adicionado de 0,01% de Tween 60) e mantido sob agitação de 120 rpm a 10 °C por um período de 4 horas. Os extratos enzimáticos assim obtidos passam pela etapa de centrifugação a 3.400 g por 15 minutos, para a remoção de materiais particulados.

Experimento de remoção de contaminantes e concentração das enzimas

A remoção de contaminantes é normalmente conduzida em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de extrato e 2% de carvão ativado sob agitação por 30 minutos, seguida de filtração em papel de filtro quantitativo.

Após a adsorção em carvão ativado, o pH dos extratos é ajustado para 4,8 com ácido acético 2 M, sendo posteriormente carregados em coluna (10,2 × 0,98 cm) empacotada com a resina DEAE Sepharose CL 6B. Previamente ao carregamento dos extratos, a coluna necessita ser equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,8), sendo as operações de carregamento, lavagem e eluição operadas a 0,50 a 0,75 mL/min. Para a lavagem da coluna, emprega-se um tampão de equilíbrio, e para a eluição, NaCl 0,2 M preparado no mesmo tampão.

Determinação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas, expressas em UI/Kg de madeira ou UI/mL de extrato, podem ser feitas utilizando as seguintes metodologias:

Para a atividade de lacases é feito o acompanhamento da oxidação de ABTS ($\epsilon_{420\text{nm}}$ igual a $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura reacional contém 0,1 mL de ABTS 1 mM, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 75 mM (pH 5,0), 0,1 mL de água deionizada e 0,5 mL de extrato enzimático.

A atividade de manganês peroxidases é determinada acompanhando-se a oxidação de vermelho de fenol ($\epsilon_{610\text{nm}}$ igual a $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura reacional contém 1,75 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 3,2), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,5 mL de sulfato de manganês 1 mM, 0,25 mL de albumina bovina 1,8%, 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,25 mL de extrato enzimático. Após o início da reação, frações de 1 mL são retiradas do tubo contendo a mistura reacional a cada 1 minuto e transferidas para cubetas contendo 65 μL de hidróxido de sódio 6,5 M, previamente à leitura da absorvância.

A atividade de lignina peroxidases é determinada acompanhando-se a oxidação de Azure B. A mistura reacional contém 0,1 mL de Azure B 320 μM , 0,5 mL de tampão succinato de sódio 50 mM (pH 4,5), 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,2 mL de extrato enzimático.

16.4.2 Tratamento enzimático de polpas celulósicas

Preparo da polpa

Para se obter uma boa eficiência no tratamento enzimático de polpas celulósicas é necessário que a matéria-prima tenha sido submetida a um pré-tratamento para que parte da lignina e hemicelulose seja removida, preservando ao máximo a celulose. Em geral, as polpas passam por tratamentos alcalinos ou ácidos visando alcançar esse objetivo. Dependendo da composição química da polpa é feita a escolha da(s) enzima(s) para o tratamento enzimático. Conhecendo-se as atividades das enzimas estudadas (Tabela 16.1), é possível calcular a carga enzimática que deve ser aplicada no tratamento. As condições operacionais de temperatura, pH e tempo vão depender das propriedades da enzima utilizada.

Condições de tratamento enzimático da polpa

O tratamento com o extrato enzimático é normalmente feito empregando duas unidades de atividade por grama de massa seca de polpa e 1,5 g de polpa (massa seca) na consistência de 10%. A consistência é determinada pela relação massa seca/massa úmida, sendo expressa em porcentagem (Equação 16.1). A polpa é pesada e é determinada a massa úmida. Para atingir a consistência desejada (10%), adiciona-se um volume de água e enzimas à massa seca. O pH da polpa deve ser ajustado de acordo com o experimento, trabalhando-se geralmente em pH entre 4 e 7 para enzimas derivadas de fungos, temperatura de 50 °C e tempo de 2 a 12 horas. A mistura de enzima e polpa é mantida em sacos de polietileno, vedados com seladora e devidamente incubados em banho com temperatura controlada.

(Equação 16.1)

$$\text{água adicionada (ml)} = \frac{\text{polpa (massa seca)} - \text{polpa (massa úmida)}}{\text{consistência}} - \text{enzima (mL)}$$

Após os tratamentos das polpas com o extrato contendo a atividade oxidativa, estas precisam ser submetidas a uma extração alcalina. Normalmente, utilizam-se 4% de NaOH, a 70 °C, durante 60 minutos. Depois dessa etapa são realizadas as análises das polpas, empregando no mínimo os testes de viscosidade e número kappa.

O número kappa representa o grau de deslignificação de uma polpa de celulose e é definido como o número de mililitros de uma solução de KMnO_4 0,1 N consumido por um grama de polpa seca. Os resultados são corrigidos para dar um consumo de 50% de KMnO_4 em contato com as amostras. As polpas, entre 0,30 g e 0,35 g (massa seca), são suspensas em 10 ml de água destilada e transferidas com 140 ml de água destilada para um Erlenmeyer de 300 ml, o qual necessita ser mantido a 25 °C sob agitação. Para polpas de celulose com baixos teores de lignina, com um número kappa entre 2,5 e 35, pipetam-se 25 mL de KMnO_4 0,1000 +/- 0,0005 N em um Erlenmeyer de 125 mL, e adicionam-se 25 mL de H_2SO_4 4,0 N. Essa solução é então misturada quantitativamente à polpa para reagir por 10 minutos, sendo a reação em seguida interrompida pela adição de 5,0 mL de KI 1,0 M. Todo o residual da solução de permanganato deve ser lavado com 50 mL de água destilada e vertido no frasco contendo a polpa. O iodo livre presente na suspensão é que vai ser titulado com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1000

+/- 0,0005 N até a solução ficar amarelo-clara. Em seguida, são adicionadas duas gotas de solução de amido, e a titulação é conduzida até a viragem da cor azul para a branca. Um controle sem a polpa deve ser preparado para que o volume de Na_2SO_3 consumido pelo branco seja usado na equação de determinação do número kappa (Equação 16.2).

$$\begin{aligned} \text{(Equação 16.2)} \quad n^\circ \text{ kappa} &= (P \times f)/w \times [1 + 0,013 (25 - T)] \\ P &= [(b-a)]/0,1 \quad f = 0,0084P + 0,895 \end{aligned}$$

em que P é o volume de KMnO_4 que reagiu (mL); a é o volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação da amostra (mL); b é o volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação do branco (mL); f é o fator de correção para um consumo de 50% de permanganato de potássio, determinado para cada P; N é a normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; T é a temperatura de análise ($^\circ\text{C}$); e w é a massa da polpa seca (g).

A viscosidade é determinada pesando exatamente 0,125 g em um frasco, seguido da adição de 25 mL de uma solução de etilenodiamina cúprica 0,5 M. Após agitação de 10 minutos com uma barra magnética a mistura é transferida para a pipeta de Fesnske-Oswald, previamente aferida com óleo padrão e usada dentro dos limites de viscosidade apropriados. O tempo de escoamento é cronometrado, podendo assim a viscosidade da polpa de celulose ser determinada de acordo com a Equação 16.3.

$$\text{(Equação 16.3)} \quad V \text{ (cp)} = k_v \times t \times d$$

em que V é a viscosidade da solução (cP); k_v é a constante do viscosímetro ($\text{cP} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$); t é o tempo de escoamento (s); d é a densidade da solução de celulose a $25^\circ\text{C} - 1,052 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$

A eficiência de deslignificação e a seletividade do processo de branqueamento são determinadas através das seguintes relações:

$$\text{(Equação 16.4)}$$

$$\% \text{ Eficiência de deslignificação} = \frac{n^\circ \text{ kappa inicial} - n^\circ \text{ kappa final}}{n^\circ \text{ kappa inicial}}$$

$$\text{(Equação 16.5)} \quad \text{Seletividade} = \frac{\text{eficiência de deslignificação}}{\% \text{ de redução da viscosidade da polpa}}$$

As polpas tratadas com as enzimas de *C. subvermispora* em geral apresentam aumento da viscosidade em relação ao controle. O aumento da viscosidade é uma propriedade desejável, pois se relaciona com o grau de polimerização da celulose e, indiretamente, com a resistência do papel. O aumento da viscosidade após o branqueamento é observado pela ação enzimática nas xilanas e lignina da superfície das fibras, enriquecendo a polpa em celulose. Dessa forma, o grau de polimerização final da polpa é aumentado.

O número kappa das polpas é reduzido em até 10% após o tratamento com extratos quando se utiliza a carga de 2 UI/g de manganês peroxidase, com 3 horas de reação. A perda da lignina após o tratamento enzimático tem sido atribuída à redução dos complexos de lignina-carbohidrato. Ocorrem também mudanças morfológicas na superfície das fibras, como fendas, filamentos e desfibramento devido ao tratamento enzimático. Essas fendas facilitam a difusão das macromoléculas de lignina degradada da parede das fibras, proporcionando uma diminuição mais acentuada do número kappa das polpas branqueadas.

O extrato enzimático de *C. subvermispora* apresenta um efeito biobranqueador significativo e mostra-se bastante seletivo, em razão da composição de seu complexo enzimático compreender as lacases, as MnPs, o complexo xilanolítico completo e um pouco eficiente complexo celulolítico.

16.5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Fungos de degradação branca são os principais decompositores dos materiais lignocelulósicos, e alguns deles podem ter um impacto importante na indústria que visa ao processamento de materiais lignocelulósicos. Alguns exemplos mostram que espécies dessa classe de fungos inoculadas sobre polpa celulósica não branqueada causam o aumento da alvura e a diminuição do número kappa dessa polpa⁴⁸. Outro exemplo importante da aplicação biotecnológica de fungos de degradação branca refere-se à biopolpação de cavacos de *Eucalyptus* com *C. subvermispora*. Os resultados mostram uma redução de até 40% no consumo de energia durante a polpação termomecânica²⁴. Mais recentemente, a combinação de um pré-tratamento biológico de palha de trigo com *Irpex lacteus* e *Poria subvermispora* seguido de uma extração alcalina aumentou significativamente a acessibilidade enzimática à celulose e a produção de etanol a partir da glicose formada³³.

Obviamente, o tratamento de materiais lignocelulósicos com fungos está muito distante dos propósitos industriais, por apresentarem longos tempos

de incubação e o inevitável consumo de polissacarídeos. Esse tem sido um problema que pode ser resolvido com o emprego direto das enzimas produzidas por esses fungos. Entretanto, o emprego de enzimas oxidativas nesses processos ainda está limitado à elevada demanda, mas esse aspecto não parece ser crítico, pois em curto espaço de tempo haverá a possibilidade da produção comercial dessas enzimas a partir de organismos recombinantes. Por exemplo, um trabalho não muito recente mostrou que é viável a secreção de MnP por uma levedura transformada geneticamente, que foi capaz de produzir níveis de MnP da ordem de 2,5 U/mL em cultivos submersos em fermentador⁴⁹. A enzima produzida foi parcialmente purificada e também se mostrou efetiva para a deslignificação de polpas *kraft*.

REFERÊNCIAS

1. Kirk TK, Cullen D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Young R, Akhtar M, editors. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley & Sons; 1998. p. 273-308.
2. Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro PJC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*. 2010;49:3305-16.
3. Horn SJ, Vaaje-Kolstd G, Westereng B, Eijsink VG. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2012;5:45.
4. Vries RP, Visser J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001;65:497-522.
5. Kuhad RC, Singh A, Eriksson KEL. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: Eriksson KEL, editor. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1997;57:45-126.
6. Martinez AT. Molecular biology and structure-function of lignin- degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30:425-44.
7. Kersten PJ, Kirk TK. Involvement of a new enzyme, glyoxaloxidase, in Extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*. 1987;169:2195-201.
8. Schwarze FWMR. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*. 2007;21:133-70.
9. Sethuraman A, Akin DE, Eriksson K-EL. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 1998;27:37-47.
10. Fernandez-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, et al. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispota* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109:5458-63.
11. Souza-Cruz PB, Freer J, Siika-Aho M, Ferraz A. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of Pinus taeda wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004;34:228-34.
12. Vicentim MP, Ferraz A. Enzyme production and chemical alterations of Eucalyptus grandis wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispota* cultures supplemented with Mn²⁺, corn steep liquor and glucose. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:645-52.

13. Heidorne FO, Magalhães PO, Ferraz A, Milagres AMF. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;38:436-42.
14. Hofrichter M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30:454-66.
15. Urzúa U, Larrondo LF, Lobos S, Larraín J, Vicuña R. Oxidation reaction catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispota*. *FEBS Letters*. 1995;371:132-6.
16. Carvalho W, Ferraz A, Milagres AMF. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispota*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43:193-8.
17. Carvalho W, Ferraz A, Milagres AMF. Uso de carvão ativado e resina de troca iônica para limpeza e concentração de enzimas em extratos de madeira biodegradada. *Acta Scientiarum Technology*. 2010;32:347-54.
18. Domingos M, Silva JM, Prata AMR, Ferraz A, inventors. Biorreator com sistema de agitação e aeração específico para cultivo de células aderentes e/ou sensíveis ao cisalhamento. Patente brasileira. PI 1003119-7A2; 2010.
19. Mendonça R, Guerra A, Ferraz A. Delignification of *Pinustaeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispota* for preparing high-yield kraft pulps. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2002;77:411-8.
20. Leatham GF, Forrester IT, Mishra C. Enzymes from solid substrates recovering extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures grown on commercial wood medium. Leatham GL, Himmel, ME, editors. *Enzymes in Biomass Conversion*, ACS Symposium Series. 1991;8:95-110.
21. Silva EM, Martins SF, Milagres AMF. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. *Bioresource Technology*. 2008;99:2471-5.
22. Dawson-Andoh BE, Morrell JJ. Extraction of proteins from wood wafers colonized by decay fungi. *Holzforschung* 1992;46:117-20.
23. Arantes V, Silva EM, Milagres AMF. Optimal recovery process conditions for manganese-peroxidase obtained by solid-state fermentation of eucalyptus residue using *Lentinula edodes*. *Biomass and Bioenergy*. 2011;35:4040-4.
24. Ferraz A, Guerra A, Mendonça R, Masarin F, Vicentim MP, Aguiar A, Pavan PC. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008;43:178-85.
25. Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM. Biotechnological production of xylitol: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. 1998;66:25-40.

26. Rubia T, Linares A, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Romera J, Martínez J. Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavidolorata*. *Research in Microbiology*. 2002;153:547-54.
27. Lobos S, Larraín J, Salas L, Cullen D, Vicuña R. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology*. 1994;140:2691-8.
28. Santos HB. Estudo da recuperação das enzimas produzidas por *Ceriporiopsis subvermispora* em cavacos de eucalipto extraídos com água ou etanol [Dissertação de Mestrado]. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo; 2008. 116f.
29. Magalhães PO. Purificação de hemicelulases e de uma B-glicosidase de *Ceriporiopsis subvermispora* produzidas em condições de biopolpação. [Tese de Doutorado]. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo; 2005. 133f.
30. Alfenas AC, Peters I, Brune W, Passador GC. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa; 1991. 242 p.
31. Ragnar M, Lindgren CT, Nilvebrant NO. pK_a -values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2000;20:277-305.
32. Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Del Río JC, Gutiérrez A. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion Biotechnology*. 2009;20:348-57.
33. Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez AT, Martínez MJ. Fungal pretreatment. An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*. 2011;102:7500-6.
34. Ferraz A, Córdova AM, Machuca A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32:59-65.
35. Christov LP, Prior BA. Bleaching response of sulfite pulps to pretreatment with xylanases. *Biotechnology Progress*. 1997;13:695-8.
36. Morozova OV, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev SV, Yaropolov AI. Blue Laccases. *Biochemistry* 2007;72:1136-50.
37. Eggert C, Temp U, Eriksson KE. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:1151-8.
38. Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:1775-84.
39. Bourbonnais R, Paice MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 1990;267:99-102.

40. Call HP, Mucke I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology*. 1997;53:163-202.
41. Couto SR, Toca-Herrera JL. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 2007;25:558-69.
42. Ibarra D, Camarero S, Romero J, Martínez MJ, Martínez AT. Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006;81:1159-65.
43. Camarero S, Ibarra D, Martínez AT, Romero J, Gutierrez A, del Río JC. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40:1264-71.
44. Sasaki T, Kajino T, Li B, Sugiyama H, Takahashi H. New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67:2208-12.
45. Feijoo G, Moreira MT, Álvarez P, Lu-Chau TA, Lema JM. Evaluation of the enzyme manganese peroxidase in an industrial sequence for the lignin oxidation and bleaching of eucalyptus kraftpulp. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008;109:1319-27.
46. Fang J, Huang F, Gao P. Optimization of cellobiose dehydrogenase production by *Schizophyllum commune* and effect of the enzyme on kraft pulp bleaching by ligninases. *Process Biochemistry*. 1999;34:957-61.
47. Antonopouloos VT, Hernandez M, Arias ME, Mavrakos E, Ball AS. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2001;57:92-9.
48. Reid ID. Bleaching Kraft Pulps with White-Rot Fungi. In: Young RA, Aktar M, editors. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York: J. Wiley; 1998. 577p.