

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CELOBIASE COM MODELAGEM DA
CINÉTICA DE HIDRÓLISE DA CELOBIOSE**

Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara
Eng^a Química, UEM, 1984
Orientadora: Prof^a Dr^a Gisella Maria Zanin

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química, área de
Desenvolvimento de Processos.

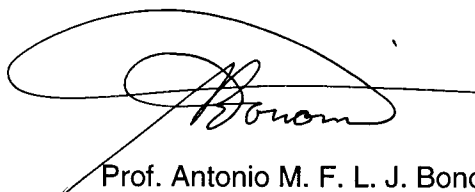
Maringá - PR - Brasil
Dezembro de 1998

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 08 de dezembro de 1998.

COMISSÃO JULGADORA


Prof^a Gisella Maria Zanin, Dr. Eng.
Orientadora


Prof. Antonio M. F. L. J. Bonomi, Ph.D.
Membro


Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D.
Membro

CALSAVARA, LUIZA PEDRINA VILXENSKI

Caracterização da Enzima Celobiase com Modelagem da Cinética de Hidrólise da Celobiose [Paraná] 1998

XX, 112 p. 29,7 cm (PEQ/UEM, M.Sc., Engenharia Química, 1998)

Dissertação - Universidade Estadual de Maringá-PEQ

1. Enzima Celobiase

I. PEQ/UEM II Título (série)

“Somos o que fazemos, mas principalmente, o que fazemos para mudar o que somos.”

(Eduardo Galeano)

Esta tese é dedicada:

Aos meus pais Judith e Luiz que com seus esforços e amor permitiram que eu aqui chegasse.

*Ao querido Valmir,
Meu grande companheiro de todos os momentos.
Muito deste trabalho devo a Você!*

Aos meus filhos Larissa e Nicolas que são o grande estímulo da minha vida.

A Vocês, o meu amor.

Agradecimentos:

- A Deus que sempre me deu forças, e a quem sempre recorri nos momentos de angústia.
- À Prof^a Dr^a Gisella Maria Zanin pela competente orientação deste trabalho, e por sempre ter me incentivado.
- Ao Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes pela valiosa colaboração. Suas sugestões muito enriqueceram este trabalho.
- Ao Eng^o Químico Lauro Mitsuaki Kambara, o grande amigo com quem sempre pude contar.
- A todos os amigos do mestrado, em especial ao Alexandre, Bia, Douglas e Paulinho por terem conseguido tornar divertidos os momentos tão cansativos de laboratório.
- Aos professores e funcionários do PEQ, pela orientação e atenção dispensadas, em especial à Marilza pelo apoio.
- Aos funcionários e professores do DEQ, pelo bom ambiente de trabalho. Obrigada pela sua amizade.
- Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, à D. Izaura e Sr. Gerson, e em especial aos meus queridos afilhados Alessandro, Caroline e Isabella, pelo carinho e estímulo.
- À CAPES, CNPq, PADCT e DEQ/UEM pelo apoio financeiro.
- A todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CELOBIASE COM MODELAGEM DA CINÉTICA DE HIDRÓLISE DA CELOBIOSE

AUTOR: LUIZA PEDRINA VILXENSKI CALSAVARA

ORIENTADOR: Prof^ª Dr^ª Gisella Maria Zanin

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química;
Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 - 09; CEP: 87020-900 -
Maringá - PR, Brasil, defendida em 08 de dezembro de 1998. 132 p.

RESUMO

A enzima celobiose Novozym 188, que é empregada na hidrólise do bagaço de cana com a finalidade de aumentar a eficiência da hidrólise com celulase, foi caracterizada na sua forma comercial, e modelos cinéticos integrados foram aplicados à hidrólise da celobiose. A atividade específica desta enzima foi determinada para valores de pH de 3 a 7, e temperaturas de 40 a 75 °C, com celobiose 2g/L. A estabilidade térmica foi determinada no pH 4,8 e temperaturas de 40 a 70 °C. A inibição pelo substrato foi estudada no mesmo pH, a 50 °C, e concentrações de celobiose de 0,4 a 20 g/L. A inibição pelo produto foi observada a 40 e 50 °C, pH 4,8, utilizando-se concentrações de celobiose de 2g/L, 20g/L, e 2g/L com adição de 1,8 g/L de glucose no início da reação. Acompanhou-se a reação por meio dos dados de conversão de celobiose em glucose em função do tempo até aproximadamente 100% de conversão.

A enzima apresentou a máxima atividade específica, 17,8 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína, no pH 4,5 a 65 °C. A ativação térmica da enzima seguiu a equação de Arrhenius com valores de energia de ativação da ordem de 11 kcal/mol para valores de pH entre 4 e 5. A desnaturação térmica seguiu o modelo do decaimento exponencial resultando na energia de desnaturação térmica de 81,6 kcal/mol. A enzima apresentou inibição pelo substrato para concentrações de celobiose acima de 10 mM (3,42 g/L). Os parâmetros cinéticos obtidos por meio do ajuste dos pontos experimentais ao modelo de inibição incompetitiva pelo substrato, foram $K_m = 2,42$ mM, $V_{\text{max}} = 16,3$ $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína e $K_s = 54,2$ mM, enquanto para a inibição não-competitiva pelo substrato foram $K_m = 2,54$ mM, $V_{\text{max}} = 17,1$ $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína e $K_s = 51,7$ mM. Os pontos experimentais de conversão em função do tempo da reação de hidrólise ajustaram-se aos modelos cinéticos integrados para os tipos de inibição incompetitiva e não-competitiva pelo substrato e competitiva, não-competitiva ou incompetitiva pelo produto. No entanto, os valores dos parâmetros cinéticos K_i e k_{cat} calculados a partir desses modelos foram inconsistentes, indicando que as hipóteses usadas não foram suficientes para descrever a extensão total da cinética deste tipo de reação de zero a 100% de conversão.

CHARACTERIZATION OF ENZYME CELLOBIASE WITH MODELING OF CELLOBIOSE HYDROLYSIS KINETICS

AUTHOR: LUIZA PEDRINA VILXENSKI CALSAVARA

SUPERVISOR: Prof^a Dr^a Gisella Maria Zanin

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá;
Av. Colombo, 5790, BI E46 – 09; CEP 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, presented on
December 8th 1998. 132 p.

ABSTRACT

The enzyme cellobiase Novozym 188, which is used for improving hydrolysis of bagasse with cellulase, was characterized in its commercial available form and integrated kinetic models were applied to the hydrolysis of cellobiose. The specific activity of this enzyme was determined for pH values from 3 to 7, and temperatures from 40 to 75 °C, with cellobiose at 2 g/L. Thermal stability was measured at pH 4.8 and temperatures from 40 to 70°C. Substrate inhibition was studied at the same pH, at 50°C, and cellobiose concentrations from 0.4 to 20 g/L. Product inhibition was determined at 40 and 50 °C, pH 4.8, cellobiose concentrations of 2 and 20 g/L, and initial glucose concentration nearly zero or 1.8 g/L. The reaction was monitored by means of conversion data of cellobiose into glucose until nearly 100%.

The enzyme has shown the greatest specific activity, 17.8 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ protein, at pH 4.5 and 65°C. Thermal activation of the enzyme followed Arrhenius equation with the energy of activation being equal to 11 kcal/mol for pH values between 4 and 5. Thermal deactivation was adequately modeled by the exponential decay model with energy of deactivation giving 81.6 kcal/mol. Substrate inhibition was clearly observed above 10 mM (3.4 g/L) cellobiose. Kinetic parameters obtained by fitting the experimental points to the substrate uncompetitive inhibition model were $K_m = 2.42$ mM, $V_{\text{max}} = 16.3$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ protein and $K_s = 54.2$ mM, while for the substrate non-competitive inhibition model they were $K_m = 2.54$ mM, $V_{\text{max}} = 17.1$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ protein and $K_s = 51.7$ mM. The conversion versus time experimental points for the hydrolysis reaction were fitted to the integrated kinetics models for the uncompetitive and non-competitive substrate inhibition and for competitive, uncompetitive and non-competitive product inhibition. Nevertheless, the kinetic parameters K_i and k_{cat} calculated by these models were inconsistent, indicating that the hypotheses that were assumed were not able to describe the total extension of the reaction kinetics from zero to 100%.

ÍNDICE DO TEXTO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 CELULOSE	3
2.2 ENZIMAS	5
2.2.1 Celulases.....	6
2.2.2 β -Glucosidase (celobiase).....	8
2.3 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA ENZIMA.....	11
2.3.1 Influência do tempo de reação – método das velocidades iniciais	11
2.3.2 Influência da concentração de enzima	14
2.3.3 Influência da temperatura	14
a) Energia de ativação da reação enzimática.....	15
b) Energia de desnaturação térmica da enzima	18
2.3.4 Influência do pH.....	19
2.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	20
2.4.1 Hipótese do equilíbrio rápido (Henry-Michaelis-Menten).....	22
2.4.2 Hipótese do estado estacionário (Briggs-Haldane)	23
2.4.3 Tipos de inibição enzimática.....	25
2.4.4 Efeito da concentração de substrato	27
2.4.5 Efeito da concentração de produto	29
2.5 MODELAGEM CINÉTICA DA HIDRÓLISE DE CELOBIOSE PELA ENZIMA CELOBIASE	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 MATERIAIS.....	36
3.1.1 Substrato	36
3.1.2 Enzima	36
3.1.3 Reagentes analíticos	36
3.1.4 Reator.....	36
3.1.5 Equipamentos.....	37
3.2 MÉTODOS.....	38
3.2.1 Determinação do teor de proteína	38

3.2.2	Determinação de glucose	39
3.2.3	Preparação da solução de celobiose	39
3.2.4	Propriedades catalíticas da enzima	40
a)	Determinação da concentração de enzima	42
b)	Teste de interferência do conservante benzoato de sódio.....	43
c)	Atividade em função do pH e da temperatura	43
d)	Estabilidade térmica da enzima celobiase.....	44
e)	Influência da concentração inicial de substrato	45
f)	Conversão em função do tempo	46
g)	Estabilidade térmica no ensaio de conversão em função do tempo	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLUCOSE E PROTEÍNA	49
4.2	PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA ENZIMA CELOBIASE	50
4.2.1	Determinação da concentração de enzima	50
4.2.2	Teste de interferência do conservante benzoato de sódio	52
4.2.3	Atividade em função do pH e da temperatura	53
4.2.4	Energia de ativação da enzima na reação de hidrólise da celobiose	55
4.2.5	Estabilidade térmica da enzima celobiase	57
4.2.6	Energia de desnaturação térmica da enzima celobiase	59
4.2.7	Modelo cinético para a hidrólise enzimática da celobiose.....	61
4.2.8	Influência da concentração inicial de substrato e cálculo das constantes cinéticas K_m , V_{max} e K_s	64
4.2.9	Conversão de celobiose em glucose em função do tempo com modelagem da cinética em reator batelada	67
4.3	MODELAGEM DA CINÉTICA DE HIDRÓLISE.....	77
5	CONCLUSÕES	84
6	SUGESTÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8	ANEXOS	93
8.1	ANEXO I - Atividade em função da temperatura e pH	93
8.2	ANEXO II - Testes de estabilidade térmica da celobiase	102
8.3	ANEXO III - Influência da concentração inicial de substrato	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	- Unidades de glucose na celulose (CAMPOS,1998)	3
Figura 2.2	- Unidade de celobiose (CAMPOS,1998)	3
Figura 2.3	- Representação de uma curva típica de reação enzimática	13
Figura 3.1	- Esquema do reator tipo batelada	37
Figura 3.2	- Método das velocidades iniciais	42
Figura 4.1	- Reta ajustada para a determinação do teor de proteína, pelo método de Lowry (item 3.2.1)	49
Figura 4.2	- Reta ajustada para a determinação de glucose pelo método GOD-PAP (item 3.2.2)	49
Figura 4.3	- Velocidade inicial da reação em função da quantidade de proteína utilizada	51
Figura 4.4	- Glucose produzida na ausência de benzoato de sódio. Celobiose na concentração de 2 g/L, pH 4,8. Temperatura de ensaio 50°C. Concentração da enzima: 95 µL/L	52
Figura 4.5	- Glucose produzida na presença de 1 g/L de benzoato de sódio. Celobiose na concentração de 2 g/L, pH 4,8. Temperatura de ensaio 50°C. Concentração da enzima: 95 µL/L	52
Figura 4.6	- Atividade específica em função do pH e da temperatura para a celobiase NOVOZYM 188 na concentração de 95 µL/L em celobiose 2 g/L	54
Figura 4.7	- Gráfico de Arrhenius para a celobiase na concentração de 95 µL/L, para celobiose 2 g/L nos valores de pH: 4,0 ; 4,5 ; 4,8 e 5,0	55
Figura 4.8	- Gráfico de Arrhenius para a celobiase na concentração de 95 µL/L, para celobiose 2 g/L nos valores de pH: 3,0 ; 6,0 e 7,0	56
Figura 4.9	- Energia de ativação para a hidrólise enzimática da celobiose 2 g/L, 95 µL de enzima / L de solução.....	57
Figura 4.10	- Atividade enzimática residual para a celobiase 95 µL/L incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8	58
Figura 4.11	- Gráfico de Arrhenius para a energia de desnaturação térmica da celobiase 95 µL/L incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8	60

- Figura 4.12 - Esquema geral para a hidrólise da celobiose. E = enzima livre; ES = complexo produtivo enzima-substrato; G = glucose (produto); GE = complexo enzima-glucose; GES = complexo glucose-enzima-substrato; K_m = constante de dissociação para o complexo ES; K_{ic} = constante de dissociação para o complexo GE; K_{in} = constante de dissociação para o complexo GES; K_{sn} = constante de dissociação para o complexo SE; K_{su} = constante de dissociação para o complexo SES; S = concentração de substrato (celobiose), SE = complexo enzima-substrato não-produtivo; SES = complexo não produtivo substrato-enzima-substrato..... 62
- Figura 4.13 - Velocidade inicial da reação em função da concentração de celobiose. Condições de reação: 50°C, pH 4,8, 95 µL de enzima/L de substrato 66
- Figura 4.14 - Ajuste parabólico de S/V em função de S para a obtenção dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e K_s , onde S é a concentração molar de substrato e V é a velocidade inicial molar de reação 66
- Figura 4.15 - Conversão enzimática de celobiose em glucose a 40 e 50°C, pH 4,8, celobiase 95 µL/L. Substrato: **A** = celobiose 2 g/L, **B** = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L, **C** = celobiose 20 g/L..... 70
- Figura 4.16 - Teste de atividade da enzima após a incubação em celobiose 2 g/L a 40 e 50°C pelo tempo de 24 horas e para a enzima sem incubação. Os testes de atividade residual foram conduzidos a 50°C e pH 4,8 em celobiose 2 g/L e celobiase 95µL/L 71
- Figura 4.17 - Teste de atividade da celobiase após a incubação em celobiose 20 g/L a 40°C pelo tempo de 100 horas, a 50°C pelo tempo de 73 horas e para a enzima sem incubação. Os testes de atividade residual foram conduzidos a 50°C e pH 4,8 em celobiose 2 g/L e celobiase 95µL/L..... 72
- Figura 4.18 - Conversão enzimática da celobiose em glucose, em reator batelada nas seguintes condições: 2 g/L de celobiose, 95 µL/L de celobiase Novozym 188, 40 e 50°C, pH 4,8, sem adição de glucose (o) e com adição de 1,8 g/L de glucose (10 mM) (♦)..... 75

Figura 4.19 - Conversão enzimática da celobiose em glucose, em reator batelada nas seguintes condições: 20 g/L de celobiose, 95 µL/L de celobiase Novozym 188, 40 e 50°C, pH 4,8, sem adição de glucose.....	76
Figura 4.20 - Conversão enzimática de celobiose em glucose em reator batelada nas seguintes condições: 95 µL/L de celobiase, 50°C, pH 4,8; Substrato: A = celobiose 2 g/L, B = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L.....	81
Figura 4.21 - Conversão enzimática de celobiose em glucose em reator batelada nas seguintes condições: 20 g/L de celobiose, 95 µL/L de celobiase, 50°C, pH 4,8, sem adição de glucose no início da reação.....	81
Figura 8.1.1 - Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 40°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	94
Figura 8.1.2 - Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 45°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	95
Figura 8.1.3 - Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 50°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	96
Figura 8.1.4 - Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 55°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	97

Figura 8.1.5- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 60°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	98
Figura 8.1.6- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 65°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	99
Figura 8.1.7- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 70°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	100
Figura 8.1.8- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 75°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiase: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	101
Figura 8.2.1- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 40°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	103
Figura 8.2.2- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 45°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	104
Figura 8.2.3- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 50°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R ² = coeficiente de correlação da reta ajustada).....	105

- Figura 8.2.4- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 55°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada)..... 106
- Figura 8.2.5- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 60°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada)..... 107
- Figura 8.2.6- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 65°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada)..... 108
- Figura 8.2.7- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 70°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada)..... 109
- Figura 8.3.1- Glucose formada em função do tempo de reação, para concentrações iniciais de celobiose de 0,4 a 4,0 g/L. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C, pH 4,8, celobiose 2g/L e celobiase 95µL. (y = glucose formada (g/L), x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada). 111
- Figura 8.3.2- Glucose formada em função do tempo de reação, para concentrações iniciais de celobiose de 5,0 a 20,0 g/L. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C, pH 4,8, celobiose 2g/L e celobiase 95µL. (y = glucose formada (g/L), x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada). 112

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1	- Distribuição de celulose, hemicelulose e lignina em biomassas e resíduos celulósicos (BAILEY & OLLIS, 1986).	4
Tabela 2.2	- Microrganismos selecionados pela habilidade de produzir maiores quantidades de celobiase (crescimento em frascos com agitação). (STERNBERG et al., 1977).	9
Tabela 2.3	- Estabilidade térmica da enzima celobiase livre e imobilizada.....	12
Tabela 2.4	- Temperatura ótima, estabilidade térmica e energia de ativação para a enzima celobiase originária de vários microrganismos.....	16
Tabela 2.5	- Temperatura ótima, estabilidade térmica e energia de ativação para a enzima celobiase NOVO 250L (Novozym 188), proveniente do microrganismo <i>Aspergillus niger</i>	17
Tabela 2.6	- Estabilidade ao pH e pH ótimo para a enzima celobiase.	21
Tabela 2.7	- Valores das constantes de Michaelis-Menten (K_m); de inibição pelo substrato (K_s) e pelo produto (K_G); e da velocidade máxima de reação (V_{max}), para a enzima celobiase utilizando-se celobiose como substrato.....	34
Tabela 2.8	- Valores das constantes de Michaelis-Menten (K_m); de inibição pelo substrato (K_s) e pelo produto (K_G); e da velocidade máxima de reação (V_{max}), para a enzima celobiase NOVO 250L (Novozym 188), proveniente do microrganismo <i>Aspergillus niger</i> , utilizando-se celobiose como substrato.	35
Tabela 3.1	- Tempo de amostragem para as diversas concentrações de celobiose.....	46
Tabela 3.2	- Mistura reacional e condições para o teste de conversão.	47
Tabela 4.1	- Velocidade inicial da reação em função da quantidade de proteína utilizada.....	50
Tabela 4.2	- Teste de conversão em função do tempo para a hidrólise de 20 mL de celobiose 2g/L , pH 4,8, a 50°C, utilizando 1 mL da enzima celobiase diluída a 1:500.....	51
Tabela 4.3	- Atividade específica da celobiase em função do pH e da temperatura. Teor de proteína da enzima: 176,61 mg/mL da enzima original.....	53

Tabela 4.4 - Valores de energia de ativação da reação enzimática para diferentes valores de pH calculados a partir dos coeficientes angulares das retas ajustadas para as curvas traçadas nas Figuras 4.7 e 4.8. A_e = atividade específica da enzima; A_r = constante de Arrhenius; E_a = energia de ativação da enzima.....	56
Tabela 4.5 - Atividade específica em função do tempo, para a celobiase incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8. Teor de proteína da enzima: 176,6 g/L.....	58
Tabela 4.6 - Evolução da atividade residual da celobiase em função do tempo de incubação em cada temperatura. Celobiose 2g/L no pH 4,8.	59
Tabela 4.7 - Coeficiente de desnaturação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da celobiase (95 μ L/L) incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8.....	60
Tabela 4.8 - Equações de velocidade de reação para vários modelos cinéticos com diferentes tipos de inibição. Equações simplificadas da equação geral (4.4)	63
Tabela 4.9 - Velocidade inicial de reação (V) em função da concentração de substrato. Condições de reação: pH 4,8 , 50°C, 95 μ L de enzima/L solução.....	65
Tabela 4.10 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise da celobiose.....	67
Tabela 4.11 - Conversão enzimática de celobiose em glucose (X_A) em reator batelada a 40°C e 50°C, pH 4,8, celobiase 95 μ L/L. Substrato: A = celobiose 2 g/L, B = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L, C = celobiose 20 g/L.....	68
Tabela 4.12 - Valores de conversão em função do tempo utilizados na modelagem da cinética de hidrólise da celobiose pela celobiase. Substrato: A = celobiose 2 g/L, B = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L.....	73
Tabela 4.13 - Valores de conversão em função do tempo utilizados na modelagem da cinética de hidrólise da celobiose pela celobiase. Substrato: C = celobiose 20 g/L.....	74
Tabela 4.14 - Equações para os parâmetros α , β e γ da equação (4.12), para vários modelos cinéticos	79

Tabela 4.15 - Equações obtidas pelo ajuste dos pontos experimentais de tempo (t) em função da conversão de celobiose em glucose (X_A) com a equação (4.12), para a temperatura de 50°C. Substrato: A = celobiose 2 g/L, B = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L, C = celobiose 20 g/L.....	80
Tabela 4.16 - Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo cinético integrado, aplicado aos dados de conversão em função do tempo, Figuras 4.20 e 4.21 (Temperatura 50°C, pH 4,8).....	82

NOMENCLATURA

- A_b - absorvância da amostra
 A_e - atividade específica da enzima celobiase ($\mu\text{mol} / \text{min. mg proteína}$)
 A_{in} - atividade enzimática residual observada no reator, após um certo período de incubação ($\mu\text{mol} / \text{min. mg proteína}$)
 A_{in}° - atividade enzimática observada no reator no instante inicial de incubação da enzima ($\mu\text{mol} / \text{min. mg proteína}$)
 A_r - constante de Arrhenius
 b_1 - coeficiente angular da reta de glucose produzida em função do tempo ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
 C - concentração de glucose conhecida (g/L)
 C_0^* - concentração inicial de celobiose (g/L)
 C_{A_0} - concentração inicial real de celobiose (mol/L) = $(C_0^* - C_{gc}^*)/342$
 C_g^* - concentração de glucose num tempo "t"(g/L)
 C_{ga} - concentração de glucose adicionada na solução (mol/L)
 C_{gc} - concentração de glucose proveniente de contaminação da celobiose com glucose (mol/L)
 C_{gc}^* - concentração de glucose proveniente de contaminação da celobiose com glucose (g/L)
 C_p - concentração de proteína na solução de enzima (g/L)
 C_p^* - teor de proteína em 20 mL de substrato (mg/20 mL s substrato)
 E - concentração de enzima ativa (g/L)
 E_a - energia de ativação da reação enzimática (cal/mol)
 E_d - energia de desnaturação térmica da enzima (cal/mol)
 E_I - complexo enzima-inibidor
 E_o - concentração inicial da enzima ativa (g/L)
 ES - complexo produtivo enzima-substrato;
 ESI - complexo não-produtivo enzima-substrato-inibidor
 E_T - concentração total de enzima (mg proteína/L solução)
 G - concentração de glucose em função do tempo (mol/L)
 G - concentração de glucose num tempo "t"(mol/L)
 GE - complexo enzima-glucose
 GES - complexo glucose-enzima-substrato
 G_i - concentração inicial de glucose = $C_{gc} + C_{ga}$ (mol/L)
 G_p - glucose produzida no tempo "t" (μmol)

- k_{cat} - constante da reação de formação de produto, $k_{cat} = V_{m\acute{a}x} / E_T$ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
 K_d - constante de desnaturação da enzima em uma determinada temperatura, modelo exponencial (h^{-1})
 K_d^0 - fator exponencial (h^{-1})
 K_{eq} - constante de dissociação do complexo ES
 K_G - constante de inibição por produto
 K_I - constante de inibição genérica
 K_i - constante de inibição por produto
 K_{ic} - constante de dissociação para o complexo GE
 K_{in} - constante de dissociação para o complexo GES
 K_m - constante de Michaelis-Menten (mM); constante de dissociação para o complexo ES
 K_s - constante de inibição pelo substrato (mM)
 K_{sn} - constante de dissociação para o complexo SE
 K_{su} - constante de dissociação para o complexo SES
 M - peso molecular da glucose (0,180 mg/ μmol)
 MP - proteína utilizada no ensaio (mg)
 P - concentração de produto
 r - coeficiente de correlação da reta ajustada
 R - constante da lei dos gases (1,987 cal/mol.K)
 r_d - velocidade de desnaturação térmica da enzima (g/Lh)
 S - concentração de substrato (mol/L)
 S_0 - concentração inicial real de celobiose descontada a glucose contaminante
 $= (C_0^* - C_{gc}^*) / 342$ (mol/L)
 SE - complexo enzima-substrato não-produtivo
 SES - complexo não produtivo substrato-enzima-substrato
 SES - complexo não-produtivo substrato-enzima-substrato
 T - temperatura absoluta (K)
 t - tempo de reação (min ou h)
 $t_{1/2}$ - tempo de meia-vida da enzima (h)
 v - velocidade inicial da reação ($\mu\text{mol} / \text{min}$)
 V - velocidade molar de reação (mol/Lh)
 V_{max} - velocidade máxima de reação, $V_{max} = k_{cat} E_T$ ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)
 V_r - volume de reação (L)
 X_A - conversão de celobiose em glucose

1. INTRODUÇÃO

Resíduos celulósicos têm despertado crescente interesse como fonte alternativa de energia e de matéria-prima para as indústrias, porque são abundantes e renováveis. Apesar da celulose ser sintetizada diariamente em quantidades não excedidas por nenhuma outra molécula orgânica, o seu aproveitamento é muito escasso e uma parte significativa faz parte dos resíduos agrícolas urbanos, com nenhum ou deficiente aproveitamento. A celulose corresponde a 38% dos resíduos agrícolas e 45% dos resíduos municipais (BEZERRA, 1995).

No Brasil, o etanol produzido, da ordem de 12 bilhões de litros por ano, é oriundo do processamento da cana-de-açúcar, que gera anualmente um grande excedente de bagaço de cana. Aproximadamente 75% do bagaço é utilizado para a co-geração de energia, e pequenas quantidades são vendidas para suprir a energia de outras indústrias, ou como alimentação animal. O bagaço remanescente não é utilizado, e este poderia ser aproveitado para a produção de açúcares fermentescíveis para serem empregados na fabricação de produtos químicos.

A celulose pode ser hidrolisada por ação de enzimas celulolíticas ou por ácidos e bases, e o produto da reação (glucose) pode ser metabolizado biologicamente em produtos químicos com grande valor agregado: etanol, ácido láctico, xaropes edulcorantes, proteína, etc. As enzimas celulolíticas catalisam a hidrólise da celulose a 40/50°C sem formação de produtos de degradação indesejáveis, ao contrário do que acontece com outros processos químicos de hidrólise (BEZERRA, 1995).

A formação de glucose a partir da hidrólise enzimática de substratos celulósicos é um processo catalisado pelos componentes do complexo celulase: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases, trabalhando em um mecanismo sinérgico (CANTARELLA et al., 1984; WOODWARD, 1991). A enzima β -glucosidase (EC 3.2.1.21), também conhecida como celobiase, hidrolisa as ligações β -glucosídicas da celobiose produzindo duas moléculas de glucose. Na hidrólise da celulose, a celobiase é essencial para a conversão do intermediário celobiose, que é um forte inibidor dos outros componentes da celulase. A celobiose exerce ainda, inibição pelo substrato sobre a β -glucosidase (HSUANYU & LAIDLER, 1984; AGUADO et al., 1995).

O fato de as enzimas celulolíticas serem rapidamente adsorvidas na celulose foi sugerido como base para um sistema de recuperação das enzimas, por meio de um contato contra-corrente entre o efluente do reator de hidrólise e o material celulolítico que está sendo alimentado. No entanto, a celobiase não é tão fortemente adsorvida, além do

fato de as celulasas em uso corrente não conterem suficientes concentrações de celobiase, o que faz com que a celobiose se acumule no meio reacional. Assim, alguns autores sugeriram um suplemento dessa enzima ao meio reacional na forma imobilizada, normalmente em uma coluna adjacente ao reator principal. (GONG et al., 1977; ZANIN & MORAES, 1985; WOODWARD & CAPPAS, 1992).

A hidrólise da celobiose depende das condições de reação e da atividade catalítica da enzima (AGUADO et al., 1995). Portanto, o conhecimento das melhores condições de reação como pH, temperatura, desnaturação térmica e inibição por substrato e/ou produto é um pré-requisito para obter-se equações de projeto úteis ao processo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi a caracterização da enzima celobiase NOVOZYM 188 quanto à sua atividade em função dos parâmetros: concentração de enzima, temperatura e pH, concentração de substrato e de produto, e ainda o desenvolvimento de um modelo cinético aplicável ao projeto do reator batelada. Este trabalho desenvolveu-se sobre tentativas prévias direcionadas, principalmente, a uma cinética de taxa inicial e considerou a presença de inibição por substrato e produto em seis modelos cinéticos integrados alternativos. O objetivo foi comparar a cinética integrada de cada caso com dados experimentais abrangendo conversões de celobiose a partir de baixos valores até aproximadamente 100%. Para os propósitos industriais, seria desejável que o modelo cinético integrado da hidrólise de celobiose fosse capaz de descrever a conversão como uma função do tempo, a partir do tempo zero até bem próximo da conversão completa do substrato.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CELULOSE

O maior componente estrutural de todas as células vegetais, é o mais abundante componente orgânico na Terra. Estima-se em 10^{11} toneladas por ano a quantidade de celulose formada na biosfera. Cada molécula de celulose é uma cadeia longa e não-ramificada de sub-unidades de D-glucose, como representado na Figura 2.1, com um peso molecular variando de 50 000 a 2,5 milhões nas diferentes espécies, equivalendo de 300 a 15 mil resíduos de glucose (LEHNINGER, 1976 ; BAILEY & OLLIS, 1986).

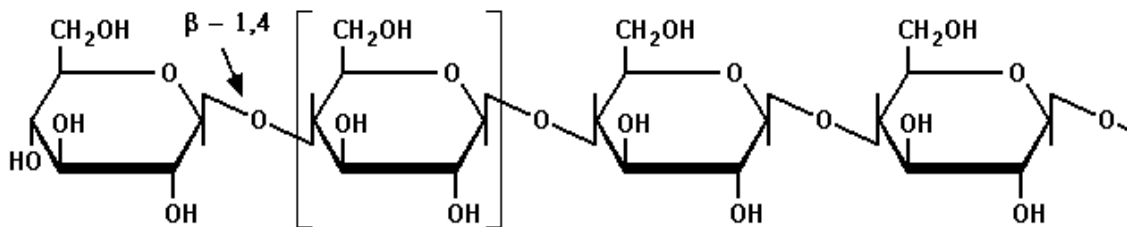


Figura 2.1 - Unidades de glucose na celulose (CAMPOS,1998).

Embora a ligação glicosídica na celulose ocorra entre os carbonos 1 e 4 de sucessivas unidades de glucose, estas unidades são ligadas de maneira diferente em relação à amilose. Esta diferença na estrutura é significativa. Enquanto muitos microrganismos, plantas e animais possuem as enzimas necessárias para hidrolisar as ligações α -1,4 encontradas no amido ou glucogênio, poucos seres vivos podem hidrolisar as ligações β -1,4 da celulose. Um dos produtos da hidrólise enzimática da celulose é a celobiose (O- β -D-glucopiranosil-1,4- β -D-glucopiranoose), um dímero formado por unidades de glucose unidas por uma ligação β -1,4 (BAILEY & OLLIS, 1986), como representado na Figura 2.2.

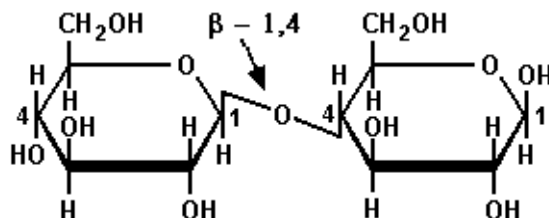


Figura 2.2 - Unidade de celobiose (CAMPOS,1998).

A resistência da celulose à degradação deve-se mais à sua estrutura cristalina e ao seu empacotamento do que às ligações glicosídicas β -1,4. A maior parte da celulose

está organizada em regiões cristalinas altamente ordenadas, nas quais as cadeias de celulose ou fibrilas encontram-se tão firmemente compactadas que moléculas de água raramente penetram. Assim, a celulose é insolúvel na água. Porções menos ordenadas, chamadas regiões amorfas, compreendem aproximadamente 15% da microestrutura celulósica. As regiões amorfas são facilmente hidrolisadas por ácidos, por exemplo; as regiões cristalinas, por outro lado, são muito mais difíceis de decompor. As fibrilas de celulose são agrupadas em microfibrilas. Os grupos de microfibrilas são envolvidos por moléculas de hemicelulose, e estas estruturas estão revestidas por uma camada de lignina que se une por ligação cruzada. Devido a este empacotamento, o termo lignocelulose é freqüentemente usado para descrever estes materiais. Na Tabela 2.1, pode-se notar que as proporções de celulose, hemicelulose e lignina variam consideravelmente com o tipo de material celulósico (BAILEY & OLLIS, 1986).

Tabela 2.1 - Distribuição de celulose, hemicelulose e lignina em biomassas e resíduos celulósicos (BAILEY & OLLIS, 1986).

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
tronco de madeira dura	40 - 45	24 - 40	18 - 25
tronco de madeira mole	45 - 50	25 - 35	25 - 35
pastagem (grama)	25 - 40	25 - 50	10 - 30
folhas	15 - 20	80 - 85	~ 0
papel	40 - 45	25 - 40	18 - 30
resíduos de papel da indústria de polpação	60 - 70	10 - 20	5 - 10

Hemiceluloses são polímeros pequenos e ramificados de pentoses (xilose e arabinose) e algumas hexoses (glucose, galactose e manose). Estas unidades, que tipicamente contêm um grande número de grupos acetila, estão unidas por ligações glucosídicas 1,3-, 1,6- e 1,4-. A hemicelulose pode ser solubilizada com relativa facilidade utilizando-se, por exemplo, ácido sulfúrico (0,05 a 3 por cento) ou eventualmente, com água quente. Já a lignina, que envolve os componentes polissacarídicos da biomassa, é mais difícil de solubilizar, sendo formada por um material polifenólico de composição

irregular. O arranjo randômico de seus diferentes blocos estruturais resiste fortemente ao ataque químico e enzimático (BAILEY & OLLIS, 1986).

Devido ao selo de lignina e à sua cristalinidade, a hidrólise da celulose a glucose não é fácil, sendo necessário altas temperaturas e ácidos minerais fortes para obter-se satisfatório grau de hidrólise. Além disso, a glucose resultante pode estar parcialmente alterada devido às condições drásticas. Embora as enzimas celulase não possam penetrar rapidamente a barreira de lignina e sejam lentas no ataque à cristalinidade da celulose, podem converter a celulose em glucose de forma mais seletiva que o ataque ácido, com a formação de poucos sub-produtos (além das condições mais brandas de processo). Em conseqüência, a hidrólise enzimática da biomassa normalmente envolve o pré-tratamento para quebrar o selo de lignina e destruir a cristalinidade da celulose (SUNDSTROM et al., 1981; FADDA et al., 1994).

Existem numerosos pré-tratamentos que podem aumentar significativamente a taxa e extensão da hidrólise da celulose pura, assim como da celulose encontrada nos materiais biomássicos, como por exemplo: tratamentos físicos como moagem e trituração; por solventes ou produtos químicos; térmicos com vapor; ou microbianos (LADISCH et al., 1983).

2.2 ENZIMAS

As enzimas são moléculas de proteínas altamente especializadas, sintetizadas pelas células a partir de simples unidades fundamentais de aminoácidos. Cada tipo de enzima pode catalisar apenas um tipo específico de reação química. São muito superiores aos catalisadores químicos pois são mais específicas, possuem maior eficiência catalítica e podem funcionar sob condições mais brandas de temperatura e pH (LEHNINGER, 1984).

As enzimas têm sido definidas como catalisadores biológicos e por outro lado, catalisadores são descritos como agentes que facilitam ou aceleram a velocidade de reação, sem serem permanentemente transformados ou consumidos na reação. Deve-se ser prudente na interpretação, contudo, já que materiais biológicos deste tipo são facilmente danificados por condições desfavoráveis (WEBB, 1964).

2.2.1 Celulases

O termo celulase engloba um conjunto de enzimas que atuam na degradação da celulose em glucose. Vários pesquisadores têm sugerido a ação combinada dessas enzimas (LEE & FAN, 1980; GOYAL et al., 1991):

- ENDOGLUCANASES (1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.4), também chamadas de C_x , que têm ação aleatória sobre regiões paracristalinas da celulose.
- EXOGLUCANASES, presentes em várias formas: (i) Celobiohidrolases (1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase, EC 3.2.1.91), também chamadas de C_1 , têm maior afinidade por celulose. Embora sejam incapazes de atacar a celulose cristalina numa extensão significativa, podem degradar substratos celulósicos removendo sucessivamente resíduos de celobiose a partir dos extremos da cadeia. (ii) Exoglucohidrolases (1,4- β -D-glucana-glucohidrolase, EC 3.2.1.74), que removem unidades de glucose das extremidades não-redutoras da cadeia, atuando sobre cadeias de celodextrinas com quatro a sete unidades, produzidas pela ação das endoglucanases, sobre celulose amorfa e sobre derivados solúveis da celulose.
- β -GLUCOSIDASE (β -D-glucosídio-glucohidrolase, EC 3.2.1.21), também chamada celobiase, que hidrolisa celobiose e pequenas cadeias de celooligossacarídeos em glucose mas não atua sobre a celulose. Embora hidrolise rapidamente a celobiose e celotriose, sua taxa de ataque decresce acentuadamente com o aumento do grau de polimerização, contrariamente às exoglucohidrolases, que atuam preferencialmente sobre longos celooligossacarídeos.

A celobiose inibe a ação da endoglucanase e da celobiohidrolase, causando o decréscimo da taxa de sacarificação de celulose (STERNBERG, 1976). Exerce ainda, inibição pelo substrato para a β -glucosidase. Aumentando-se a quantidade de β -glucosidase no complexo enzimático celulase pode-se baixar ou prevenir o acúmulo de celobiose, melhorando o rendimento de glucose assim como aumentando a taxa de reação (SUNDSTROM et al., 1981).

Comparando-se a inibição pela celobiose e pela glucose, é fácil perceber o importante papel da β -glucosidase no sistema celulase. HOLTZAPPLE et al. (1990), relataram que a celulase proveniente do microrganismo *Thermomonospora sp.* teve inibição pela celobiose 14 vezes maior que pela glucose; com *T. reesei* foi 6 vezes maior; e com *T. longibrachiatum* foi 3 vezes maior.

Os principais microrganismos produtores do complexo celulase, que são conhecidos, são os microfungos *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger*. O melhor

componente β -glucosidase é o que está presente na celulase proveniente do *A. niger*, enquanto as endo- e exoglucanases, a partir do *T. viride*, são as que apresentam atividade balanceada e estabilidade térmica satisfatórias (CANTARELLA et al., 1984).

Na literatura, discute-se se a designação correta do conjunto das enzimas envolvidas na hidrólise da celulose deve ser complexo enzimático ou sistema enzimático. Pelo fato das celulasas atuarem com algumas características de um complexo, alguns autores defendem a utilização do primeiro termo. Outros, pelo contrário, preferem a designação de sistema considerando que as enzimas têm existência individualizada como preconizado por GILBERT et al., (1992), e BEZERRA (1995).

Efeito cooperativo e sinergismo

A ação combinada de dois ou mais componentes da celulase pode aumentar a eficiência da atividade catalítica de hidrólise da celulose, em comparação com a simples soma das atividades catalíticas de hidrólise verificadas quando esses componentes atuam separadamente. Este fenômeno é chamado sinergismo. No entanto, esta designação deve ficar reservada para o caso do incremento de atividade observado estar relacionado com a presença de pelo menos duas enzimas, que em conjunto, numa nova estrutura quaternária, proporcionem o efeito descrito (por exemplo: a formação de complexos entre celobiohidrolases e endoglucanases). Nos casos em que o incremento da atividade resulta da ação das enzimas sem a formação de nova estrutura quaternária, é proposta a designação de efeito cooperativo. Neste caso, ambas as enzimas, atuam independentemente mas a atividade de uma aumenta a atividade da outra, quer pela diminuição da inibição de um produto da reação (exemplo: a hidrólise da celobiose catalisada pela β -glucosidase), quer proporcionando novos locais de hidrólise (exemplo: a endoglucanase ao catalisar a hidrólise da celulose origina novos locais de atuação das celobiohidrolases). No entanto, na maioria das atividades experimentais efetuadas não é possível distinguir sinergismo de efeito cooperativo de forma definida (BEZERRA, 1995).

O grau de sinergismo observado parece depender de vários fatores, incluindo o tipo de substrato e a natureza de um componente particular da celulase. Sinergismo cruzado entre celobiohidrolases e endoglucanases, a partir de diferentes origens, também ocorre. O mecanismo de sinergismo entre os componentes não está ainda bem entendido, mas há uma clara relação entre a habilidade de um componente endoglucanase ser adsorvido sobre a superfície da celulose e seu potencial de interagir com a celobiohidrolase. Em altas concentrações dos componentes da celulase, o sinergismo será mínimo porque todos os pontos de ligação do substrato (incluindo os comuns a todos os componentes) estarão saturados, e existirá competição entre

componentes por estes pontos. Assim, o grau de sinergismo é maior quando o substrato não está saturado com a enzima (WOODWARD, 1991).

2.2.2 β -Glucosidase (celobiase)

A enzima celobiase (β -glucosidase) pode catalisar a hidrólise de alquil- e aril- β -D-glucosídeos como metil- β -D-glucosídeo e p-nitrofenil- β -D-glucosídeo, assim como glucosídeos contendo apenas resíduos carboidratos como a celobiose. A afinidade da enzima por um substrato particular é dependente do microrganismo que a originou. Seu peso molecular é de aproximadamente 300 000; no entanto este valor pode variar bastante de um microrganismo produtor para outro, como é o caso do *Aspergillus fumigatus* que produz celobiase com peso molecular de 41 000 (WOODWARD & WISEMAN, 1982).

Após estudar o crescimento de 200 linhagens de fungos e 15 linhagens de bactérias, STERNBERG et al. (1977) concluíram que os melhores produtores de celobiase para a hidrólise da celulose são o *Aspergillus niger* e o *Aspergillus phoenicis*. Alta atividade sobre a celobiose é a característica das enzimas produzidas por esses microrganismos. Os organismos mais produtivos estão listados na Tabela 2.2.

Uma das propriedades das celobiasas provenientes dos microrganismos *Aspergillus* é que elas são inibidas pela glucose. O mecanismo pelo qual isso ocorre não está claro, mas inibição competitiva e não-competitiva têm sido reportadas (WOODWARD & WISEMAN, 1982).

Segundo SAHA et al. (1994) a inibição pelo produto glucose e a desativação térmica da celobiase são duas grandes barreiras no desenvolvimento de um processo comercial de hidrólise enzimática da celulose.

O problema da inibição da celobiase pela glucose pode ser resolvido se a glucose for removida da mistura reacional assim que for formada. Isto é possível, por exemplo, quando a hidrólise da celulose e a conversão de glucose a etanol são feitas simultaneamente.

Tabela 2.2 - Microrganismos selecionados pela habilidade de produzir maiores quantidades de celobiase (crescimento em frascos com agitação). (STERNBERG et al., 1977).

Microrganismo	Rendimento em Celobiase (U/mL)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	11,6
<i>A. niger</i>	7,4
<i>A. luchuensis</i>	2,6
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2,4
<i>Chloridium viride</i>	1,1
<i>Cladosporium viride</i>	3,7
<i>Fusarium moniliforme</i>	2,3
<i>Penicillium variable</i>	2,6
<i>P. brefeldianum</i>	1,9
<i>P. wortmanni</i>	5,6
<i>P. parvum</i>	0,6
<i>Pestalotiopsis westerdijkii</i>	1,0

As propriedades do substrato, das enzimas e do microrganismo são consideradas os fatores chaves no processo SFS (sacarificação e fermentação simultâneas) que devem ser manipulados para melhorar seu desempenho (PHILIPPIDIS & SMITH, 1995). Estes pesquisadores realizaram experimentos em vasos fermentadores anaeróbios (38°C, pH 5,0 e agitação de 150 rpm), utilizando como substrato madeira mole da espécie *Populus eugenii* DN 34 moída, peneirada em tela 9 mesh e pré-tratada com ácido sulfúrico diluído (0,73% p/p) a 160°C por 10 minutos. Utilizaram o substrato pré-tratado na concentração de 60g/L; enzima celulolítica sintetizada pelo microrganismo *Trichoderma reesei* de nome comercial Laminex na concentração de 25 IFPU/g de celulose; e microrganismo fermentativo *Saccharomyces cerevisiae* D₅A na concentração de 10% v/v. Após 80 horas, a produtividade em etanol se tornou desprezível, apesar de apenas 65% do conteúdo celulósico na biomassa ter sido convertido. Para elucidar a causa da paralisação da fermentação foram então realizados testes de controle em que os sistemas em fermentação foram perturbados no ponto em que atingiram 80 horas,

pela adição de: substrato (20 g/L); ou enzima (10 IFPU/g celulose); ou levedura (1 g/L); ou nutrientes. A única adição que deu resultado estatisticamente diferenciado das outras foi a adição de celulose fresca, que aumentou a produção de etanol em 16%. Concluíram então, que o declínio da produção de etanol durante o processo SFS foi causado principalmente por uma fração de material celulósico contido na biomassa, que permaneceu indisponível para a hidrólise, e ainda que, para aumentar a produtividade do processo, seria necessário melhorar a eficiência do método de pré-tratamento e a cinética da reação SFS.

Várias cepas de leveduras podem assimilar celobiose mas poucas podem fermentar este substrato. GONDÉ et al. (1982) estudaram nove cepas: *Bretanomyces anomalus*, *B. clausenii*, *B. custersii*, *B. intermedius*, *Candida freyschussii*, *C. lusitanae*, *C. obtusa*, *Torulopsis wickerhamii* e *Dekkera intermedia*. Oito das nove cepas conseguiram fermentar celobiose (120g/L e 180 g/L) a etanol, e glucose (200 g/L) a etanol. No entanto, a fermentação da mistura contendo celobiose (90 g/L) e glucose (90 g/L) foi retardada consideravelmente por um fenômeno diáuxico na maioria das cepas testadas. A levedura *Torulopsis wickerhamii*, com seu reduzido efeito diáuxico, seria a melhor a ser usada industrialmente podendo produzir soluções alcoólicas com concentrações acima de 64 g/L. A importante habilidade de fermentação das cepas estudadas deveria garantir bom rendimento e produtividade em álcool. Entretanto, estas ainda precisam ser geneticamente melhoradas já que sua característica diáuxica representa um sério problema para a produção industrial de álcool.

WOODWARD & ARNOLD (1981) sugerem que a glucose formada seja convertida a frutose por meio do uso da glucose isomerase (que possui alta atividade e estabilidade no pH 5,0), uma vez que a frutose na concentração de 2 a 100 mM é um fraco inibidor da celobiase. Assim, uma alta concentração de xarope de frutose poderia ser obtida e usada como aditivo alimentar, ou para gerar combustíveis por processos fermentativos.

Quanto à desativação térmica da enzima, têm sido buscados microrganismos que produzam celobiasas termorresistentes, assim como tratamentos que consigam aumentar a estabilidade térmica das enzimas já conhecidas, como pode-se observar a seguir.

Por meio de um tratamento químico com o reagente glutaraldeído, WOODWARD et al. (1981) aumentaram a estabilidade térmica da celobiase NOVO 250L (Novozym 188). O tratamento consistiu em adicionar 1,0 mL de celobiase e 0,2 mL de glutaraldeído (Sigma, 25%) a 8,8 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 8,0. A solução era deixada à temperatura ambiente por 1 hora e submetida à diálise, por aproximadamente 12 horas, com tampão acetato de sódio pH 4,8 a 4 °C para remover o glutaraldeído não

reagido. Com o tratamento, 25% da atividade original da enzima foi perdida. No entanto, houve um aumento da estabilidade térmica: após 1 hora a 65°C, a enzima tratada apresentou 85% de atividade residual, enquanto a enzima sem pré-tratamento apresentou apenas 55%.

LENDERS et al. (1985) acoplaram a celobiase NOVO 250L (Novozym 188) a uma dextrana dialdeídica por alquilação redutiva, sem perda da atividade. A temperatura ótima da enzima passou de 65°C para 70-75°C. A estabilidade térmica também aumentou: sua atividade a 60°C foi mantida por 100 horas, enquanto a enzima original era desativada após 45 horas.

SAHA et al. (1994) obtiveram uma celobiase a partir do microrganismo *Aureobasidium pullulans* com peso molecular 340 000, com atividade de 315 μ moles/min.mg proteína a 75°C e pH 4,5 utilizando *p*-nitrofenil- β -D-glucosídeo como substrato. A enzima apresentou alta tolerância à concentração de substrato não apresentando inibição até o valor de 175 mM de celobiose na mistura reacional.

Diversos autores obtiveram aumento significativo da estabilidade térmica da celobiase por meio da imobilização da enzima, como pode ser verificado na Tabela 2.3.

2.3 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA ENZIMA

Uma vez que a catálise de reações químicas e biológicas é a principal característica das enzimas, o estudo do seu desempenho catalítico baseia-se na medida quantitativa da velocidade da reação da qual participam. Devido à sua natureza protéica, as enzimas são muito sensíveis às condições em que a reação ocorre como pH e temperatura, podendo sofrer ainda a influência da concentração do substrato, do produto, e da própria enzima. Assim, para uma melhor utilização das propriedades catalíticas, é necessária a caracterização da enzima quanto a esses parâmetros (ZANIN, 1989).

2.3.1 Influência do tempo de reação – método das velocidades iniciais

As curvas de progresso da maioria das reações enzimáticas são da forma apresentada na Figura 2.3, na qual a velocidade de reação diminui com o tempo. Vários fatores podem causar esta diminuição: **(a)** os produtos da reação podem inibir a atividade da enzima; **(b)** o grau de saturação da enzima com o substrato pode diminuir, devido ao

Tabela 2.3 - Estabilidade térmica da enzima celobiase livre e imobilizada.

Origem da enzima	Suporte	Método de imobilização	Estabilidade térmica					Referência	
			Condições de incubação			Atividade residual (%)			
			Solução	pH	Tempo	T (°C)	Enzima livre		Enzima imobilizada
<i>Aspergillus phoenicis</i>	quitina, usando-se	ligação	tampão citrato	4,8	30 min	65	80	95	BISSET & STERNBERG (1978)
	glutaraldeído	covalente	50 mM			70	15	97	
<i>Aspergillus niger</i> (Novozym 188)	esferas de gelatina de osso/alginato de propileno glicol	encapsulamento	celobiose 1 mM	5,0	30 min	80	9	25	WOODWARD et al. (1993)
	<i>Aspergillus niger</i> B1	matriz em gel/alginato-silicato	tampão citrato/fosfato 50 mM	5,0	1 h	70	0,01	55	HEICHAL-SEGAL et al. (1995)
<i>Penicillium funiculosum</i>	pó de nylon	ligação	tampão citrato	4,8	25 h	50	35	100	AGUADO et al. (1995)
		covalente			10 h	60	27	73	

decréscimo da concentração de substrato à medida que a reação ocorre; **(c)** a reação reversa pode tornar-se mais importante conforme a concentração de produtos aumenta; **(d)** a enzima ou uma coenzima podem sofrer desativação térmica ou pelo pH. Estes fatores podem ainda, agir ao mesmo tempo. Por esta razão, as curvas de progresso das reações enzimáticas normalmente não seguem as equações das reações químicas homogêneas (DIXON & WEBB, 1979).

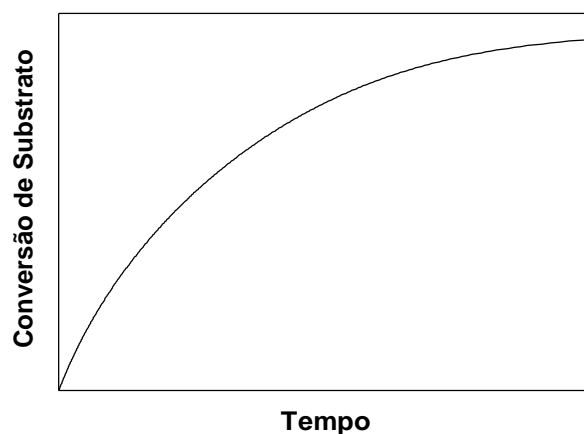


Figura 2.3 - Representação de uma curva típica de reação enzimática.

Uma vez que no início da reação os fatores acima mencionados não tiveram tempo de se manifestar, e as condições são exatamente conhecidas, a atividade enzimática pode ser determinada a partir da velocidade inicial de reação. Assim, para se determinar o efeito da variação de um dos fatores sobre a velocidade inicial da reação basta variar o mesmo e manter os outros constantes. Para se obter a velocidade inicial é necessário apenas determinar a primeira parte da curva de progresso da reação e traçar uma tangente a ela a partir da origem. As curvas, na maioria dos casos, são praticamente lineares desde que a conversão de substrato em produto não exceda 20% (DIXON & WEBB, 1979).

Ainda segundo estes autores, a reação enzimática pode ser acompanhada de duas maneiras: **(a)** pelo método de amostragem, no qual as análises são realizadas nas amostras retiradas em vários intervalos de tempo, de modo que se obtenha, na curva de progresso, uma série de pontos separados. Neste método, geralmente determina-se a concentração de substrato ou de produto formado. Por ser um método descontínuo, necessita-se no mínimo de três amostras, uma no tempo zero da reação, outra depois de um tempo previamente estabelecido e a terceira, aproximadamente, num tempo duas vezes o da segunda amostra. Isto permite verificar a linearidade da curva no intervalo de tempo considerado; e **(b)** pelo método contínuo, no qual as observações são feitas na

mistura durante a reação por meio de um grande número de leituras, ou por meio de registradores automáticos, obtendo-se neste caso, curvas contínuas.

2.3.2 Influência da concentração de enzima

Na maioria dos casos a velocidade com que a enzima transforma substrato em produto é proporcional à concentração da mesma. No entanto, desvios podem ocorrer, e uma relação linear entre velocidade de reação e concentração de enzima na faixa utilizada tem que ser estabelecida antes de qualquer estudo cinético ou cálculo de atividades específicas. Desvios da linearidade podem ocorrer devido a: **(a)** presença de inibidores na própria solução de enzima; **(b)** presença de pequenas quantidades de substâncias tóxicas; **(c)** presença de um ativador dissociável da enzima; e **(d)** limitações impostas pelo método de análise. A fim de se evitar o efeito causado por estes fatores recomenda-se utilizar nos ensaios cinéticos, sempre que possível: enzimas com alto grau de pureza, substratos puros, e método de análise confiável (DIXON & WEBB, 1979).

2.3.3 Influência da temperatura

Tal como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas geralmente aumenta com a temperatura, dentro de certa faixa na qual a enzima é estável e mantém atividade integral. As reações catalisadas por enzimas normalmente apresentam uma temperatura ótima. O pico do gráfico de atividade catalítica em função da temperatura surge porque as enzimas, sendo proteínas, são desnaturadas pelo calor, e se tornam inativas à medida que a temperatura é elevada além de um certo ponto. O ponto ótimo aparente de temperatura é, assim, resultante de dois processos: **(a)** o aumento usual na velocidade de reação com a temperatura, e **(b)** o valor crescente de desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica. Observa-se ainda, que quanto menor o tempo de exposição maior é a temperatura ótima da enzima. Ainda que muitas enzimas sejam desativadas em temperaturas acima de 55°C, algumas são bastante estáveis e mantêm a atividade em temperaturas muito mais elevadas, como por exemplo as enzimas de várias espécies de bactérias termofílicas que apresentam atividade em temperaturas superiores a 85°C (LEHNINGER, 1976).

A temperatura ótima para uma determinação é a temperatura máxima, na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo pelo menos tão longo quanto o tempo de determinação. Essa temperatura pode ser facilmente estabelecida pela incubação prévia da enzima, em temperaturas diferentes por uma ou duas vezes o

tempo escolhido para a realização das determinações, e aí medindo-se a atividade a uma temperatura suficientemente baixa para não causar desnaturação da enzima. O efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima, depende de um número de fatores que incluem o pH, a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos frequentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor. As enzimas de baixo peso molecular, compostas de uma única cadeia polipeptídica e possuindo pontes dissulfeto são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alto peso molecular. Em geral, as enzimas serão mais estáveis ao calor em preparações que não contenham altas concentrações de outras proteínas (SEGEL, 1979). Dados de estabilidade térmica, assim como de temperatura ótima para a celobiase são apresentados nas Tabelas 2.4 e 2.5.

a) Energia de ativação da reação enzimática

A energia mínima necessária para que uma reação ocorra é chamada de *energia de ativação* (E_a). Há duas maneiras de aumentar a velocidade de uma reação. Uma delas consiste em aumentar a temperatura e a outra em abaixar a energia de ativação. As enzimas são catalisadores biológicos, que abaixam seletivamente as energias de ativação das reações bioquímicas. Uma reação catalisada por enzima, pode se processar a 25°C, até 10⁶ vezes mais rapidamente que a mesma reação não catalisada. Os dados de atividade em função da temperatura, são úteis para se estudar o efeito da temperatura sobre uma reação enzimática. Estes podem ser analisados com o auxílio da relação de Arrhenius, onde o logaritmo da atividade ou da velocidade de reação, é plotado em função do inverso da temperatura absoluta (SEGEL, 1979):

$$v = A_r \cdot \exp (-E_a/RT) \quad (2.1)$$

onde,

A_r - constante de Arrhenius

E_a - energia de ativação da reação enzimática (cal/mol)

R - constante da lei dos gases (1,987 cal/mol.K)

T - temperatura absoluta (K)

v - velocidade inicial da reação (μ moles/min)

A energia de ativação para a celobiase está na faixa de 10 a 13 kcal/mol como pode ser observado nas Tabelas 2.4 e 2.5.

Tabela 2.4 - Temperatura ótima, estabilidade térmica e energia de ativação para a enzima celobiase originária de vários microrganismos.

Origem da enzima	Substrato; tampão; pH	Temperatura ótima (°C)	Energia de ativação (kcal/mol)	Estabilidade térmica			Referência
				Condições de incubação			
				pH	T (°C)	Tempo residual (%)	
<i>Trichoderma viride</i>	Celbiose 30 mM;	...	10,2	MAGUIRE (1977)
	Acetato 50 mM; pH 5,13	
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Celbiose 7,5 mM	60	...	4,8	50	67 dias	BISSET & STERNBERG (1978)
	Citrato 50 mM; pH 4,8	
<i>Aspergillus niger</i>	Celbiose 7,5 mM;	...	11,0	SUNDSTROM et al. (1981)
	Acetato; pH 4,8	
<i>Trichoderma sp.</i>	Celbiose;	...	10,3	4,8	50	40 h	ALFANI et al. (1987)
	Acetato 50 mM; pH 4,8	5,0	60	1 h	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Celbiose 20mM;	65	...	5,0	60	1 h	FADDA et al. (1994)
	Acetato 100 mM; pH 5,0	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>p</i> -NPG ^(a) 4mM;	75	...	5,0	80	1 h	SAHA et al. (1994)
	Acetato 50 mM; pH 5,0	85	85	17	

(a) *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo

Tabela 2.5 - Temperatura ótima, estabilidade térmica e energia de ativação para a enzima celobiase NOVO 250L (Novozym 188), proveniente do microrganismo *Aspergillus niger*.

Substrato; tampão; pH	Temperatura ótima (°C)	Energia de ativação (kcal/mol)	Estabilidade térmica			Referência	
			Condições de incubação				
			pH	T (°C)	Tempo		Atividade residual (%)
Celbiose 10 mM; Acetato 10 mM; pH 4,8	4,8	65	1 h	56	WOODWARD et al. (1981)
Celbiose 14,62 mM Acetato 50 mM; pH 4,8	...	10,8	BELTRAME et al. (1983)
<i>p</i> -NPG ^(a) Acetato 100 mM; pH 4,75	65	...	4,75	70	10 min 40 min	50 0	LENDERS et al. (1985)
Celbiose 50 mM; Acetato 50 mM; pH 5,0	60 -70	12,5	5,0	50	48 h 120 h	83 22	DEKKER (1986)
Celbiose 10mM; Acetato 50 mM; pH 5,0	5,0	70	5 min 10 min 15 min	48 30 0	WOODWARD & CAPPS (1992)
Celbiose 10mM; Acetato 50 mM; pH 5,0	65	WOODWARD et al. (1993)

(a) *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo

b) Energia de desnaturação térmica da enzima

Com os dados de estabilidade térmica obtidos incubando-se a enzima por um certo período de tempo, em condições previamente determinadas, e dosando-se sua atividade após cada intervalo de incubação, calcula-se a energia de desnaturação térmica da enzima. Para isso, supõe-se que a velocidade de desnaturação é de primeira ordem em relação à concentração de enzima ativa e segue uma lei do tipo Arrhenius (CHAPLIN & BUCKE, 1992):

$$r_d = (dE/dt) = -K_d \cdot E \quad (2.2)$$

que integrando conduz a:

$$E = E_o \exp (-K_d \cdot t) \quad (2.3)$$

sendo,

$$K_d = K_d^o \exp (-E_d/RT) \quad (2.4)$$

onde,

E - concentração de enzima ativa (g/L)

E_o - concentração inicial da enzima ativa (g/L)

E_d - energia de desnaturação térmica da enzima (cal/mol)

K_d - constante de desnaturação da enzima em uma determinada temperatura, modelo exponencial (h⁻¹)

K_d^o - fator exponencial (h⁻¹)

r_d - velocidade de desnaturação térmica da enzima (g/L.h)

t - tempo de reação (h)

Considerando-se que as atividades enzimáticas iniciais são diretamente proporcionais à quantidade de enzima ativa (DIXON & WEBB, 1979), tem-se:

$$E/E_o = A_{in}/A_{in}^o \quad (2.5)$$

onde,

A_{in} - atividade enzimática residual observada no reator, após um certo período de incubação (μmol /min. mg proteína)

A_{in}^o - atividade enzimática observada no reator no instante inicial de incubação da enzima (μmol /min. mg proteína)

A relação entre a atividade inicial e a residual num determinado tempo é, portanto, do tipo exponencial:

$$A_{in} = A_{in}^{\circ} \cdot \exp(-K_d \cdot t) \quad (2.6)$$

A partir das curvas de $\ln(A_{in}/A_{in}^{\circ})$ em função do tempo, pode-se obter o valor da constante de desnaturação (K_d) para uma determinada temperatura. Observa-se que quanto mais elevada é a temperatura, maior é o valor de K_d .

Com o auxílio de um gráfico do logaritmo de K_d em função do inverso da temperatura absoluta, pode-se calcular, utilizando a equação (2.4), a energia de desnaturação térmica da enzima.

Outra característica importante da estabilidade da enzima, é o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), que representa o tempo necessário para que a atividade seja reduzida à metade do seu valor inicial num determinado conjunto de condições. Se a atividade decresce de acordo com a equação (2.6), há uma relação inversamente proporcional entre o tempo de meia-vida e a constante de desnaturação (ZANIN, 1989):

$$t_{1/2} = \ln 0,5 / (-K_d) = 0,693/K_d \quad (2.7)$$

A energia de desnaturação da maioria das enzimas, normalmente, encontra-se entre 47 e 96 kcal/mol, sensivelmente maior do que a energia de ativação que geralmente é inferior a 25 kcal/mol. Esta diferença entre a energia de ativação e desnaturação deve-se ao fato de as enzimas serem ativas a baixas temperaturas e desnaturadas a temperaturas mais elevadas (Hartmeier, 1988), citado por ZANIN, 1989.

2.3.4 Influência do pH

Geralmente as enzimas são ativas somente numa faixa limitada de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido. Este ótimo pode ser devido ao: **(a)** efeito de reversibilidade na própria velocidade da reação; **(b)** efeito do pH sobre a afinidade enzima-substrato, devido ao decréscimo da saturação da enzima com o substrato; **(c)** efeito do pH sobre a estabilidade da enzima, que pode destruí-la irreversivelmente. Estes efeitos normalmente ocorrem ao mesmo tempo e podem ser facilmente observados experimentalmente (DIXON & WEBB, 1979).

A ocorrência da destruição irreversível pode ser testada expondo-se a enzima a uma ampla faixa de pH, e em seguida medindo-se a atividade após reajustar o pH ao valor padrão. A estabilidade é função do tempo em que a enzima é mantida no pH desfavorável.

O efeito do pH sobre a afinidade pode ser eliminado utilizando-se altas concentrações de substrato de modo a se saturar a enzima em todos os valores de pH.

O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas que contêm muitos grupos ionizáveis, elas existem em diferentes estados de ionização. Por isso, como a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH, parece que somente uma forma iônica do centro ativo da enzima é cataliticamente ativa.

Como a enzima é ativa somente num determinado estado de ionização, tem-se que a ionização de dois grupos próximos ao centro ativo determina a atividade, e estes são conhecidos como os grupos ácido e básico da enzima. Os efeitos do pH sobre a velocidade da reação enzimática, normalmente são discutidos em termos de dois grupos ionizáveis utilizando-se as equações aplicáveis aos ácidos dibásicos (DIXON & WEBB, 1979).

O perfil de atividade em função do pH, varia usualmente com a concentração do substrato. Este perfil será mais significativo, se a enzima for mantida saturada com o substrato em todos os valores de pH testados. Em muitos estudos de cinética enzimática, o pH é mantido constante no ótimo ou próximo deste (LEHNINGER, 1976).

Na Tabela 2.6 pode-se observar que o pH ótimo da celobiase varia de acordo com sua origem, estando numa faixa ácida de 3 a 5,5.

2.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é o ramo da enzimologia que estuda os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Os fatores mais importantes são a concentração de enzima, concentrações de ligantes (substratos, inibidores e ativadores), pH e temperatura. Quando todos esses fatores são analisados apropriadamente, é possível conhecer-se sobre muitos aspectos relativos à natureza da reação enzimática. Uma análise cinética pode levar a um modelo para uma reação enzimática e, reciprocamente, os princípios da cinética enzimática podem ser usados para escrever a equação de velocidade para um modelo proposto, o qual poderá ser então testado experimentalmente (SEGEL, 1979).

Neste item serão analisados os efeitos da concentração de substrato e produto na reação, uma vez que a influência da concentração de enzima, da temperatura e do pH já foram abordados no item 2.3.

Tabela 2.6 - Estabilidade ao pH e pH ótimo para a enzima celobiase.

Origem da enzima	Substrato; tampão; temperatura	pH ótimo	Estabilidade ao pH	Referência
<i>Aspergillus niger</i> NOVO 250L (Novozym 188)	Celobiose 10 mM; Citrato 10 mM; 50°C	4,8	3,5 – 5,5 (a)	WOODWARD & WOHLPART (1982)
	Celobiose 50 mM; Acetato 50 mM; 50°C	4,5	4,0 – 4,5 (b)	DEKKER (1986)
	Celobiose 10 mM; Acetato 50 mM; 40°C	4,5	...	WOODWARD et al.(1993)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Celobiose 7,5 mM; Citrato 50 mM; 50°C	4,3	5,5 (c)	STERNBERG et al.(1977)
	Celobiose 7,5 mM; Citrato 50 mM; 50°C	4,5	...	BISSET & STERNBERG (1978)
<i>Trichoderma viride</i>	Celobiose 30 mM; Acetato 50 mM; 25°C	5,1	...	MAGUIRE (1977)
<i>Trichoderma sp.</i>	Celobiose 20 mM; Acetato 100 mM; 50°C	3,5 – 5,0	...	FADDA et al.(1994)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>p</i> -NPG ^(e) 4 mM; Acetato 50 mM; 50°C	4,5	4,0 – 6,5 (d)	SAHA et al.(1994)

(a) enzima incubada 20 min a 65°C nos tampões: acetato 10 mM (pH 3,5-6,0) e fosfato de sódio 10 mM (pH 6,5-7,5).

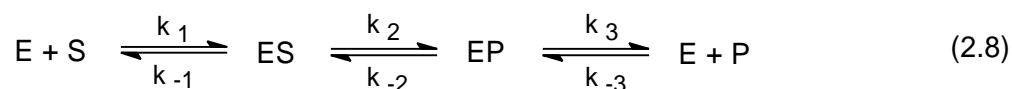
(b) enzima incubada 30 min a 50°C nos tampões pH 3,0 a 6,5.

(c) enzima incubada por 22 h a 50°C. Apresentou ótima estabilidade em pH 5,5 e 50% de desativação em pH 3,7 e 6,1.

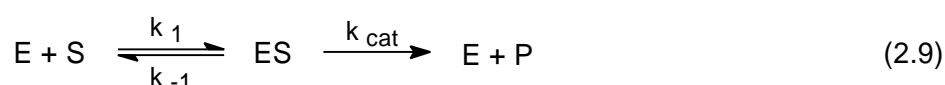
(d) tampões utilizados: acetato (pH 3,0 a 6,0) e fosfato (pH 6,5 a 8,0). Após incubar-se a enzima por 1 hora nos tampões 50 mM, ajustava-se o pH em 5,0 e dosava-se a atividade residual a 50°C.

(e) *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo

A reação enzimática mais simples envolve um único substrato (S) se transformando em um único produto (P). A seqüência da reação é (SEGEL,1975; SEGEL,1979):



ES e EP são chamados *complexos centrais*. Para simplificar, considera-se que existe apenas um complexo central e que a reação inversa é desprezível. Esta última consideração é válida ao se levar em conta a *velocidade inicial* da reação no sentido de formação de produto antes que uma concentração significativa do mesmo tenha se acumulado. Assim a reação estudada pode ser escrita como:



A equação de velocidade pode ser deduzida por dois caminhos: hipótese do equilíbrio rápido e hipótese do estado estacionário (SEGEL,1975).

2.4.1 Hipótese do equilíbrio rápido (Henry-Michaelis-Menten)

Este método é mais simples e considera que E, S e ES alcançam o equilíbrio muito rapidamente em comparação com a velocidade com a qual ES se transforma em E+P. A velocidade instantânea em qualquer tempo depende da concentração de ES:

$$V = k_{cat} \cdot ES \quad (2.10)$$

onde k_{cat} é chamada de constante de velocidade catalítica. A concentração total de enzima (E_T) está distribuída entre as formas E e ES:

$$E_T = E + ES \quad (2.11)$$

Dividindo-se a equação (2.10) pela (2.11) obtém-se:

$$V/E_T = k_{cat} ES / (E + ES) \quad (2.12)$$

No equilíbrio, como foi considerado, ES pode ser expressa em termos de S, E, e K_{eq} , onde K_{eq} é a constante de dissociação do complexo ES:

$$K_{eq} = E \cdot S / ES = k_{-1} / k_1 \quad (2.13)$$

Portanto,

$$ES = (S / K_{eq}) \cdot E \quad (2.14)$$

Substituindo-se a equação (2.14) na equação (2.12):

$$V/E_T = (k_{cat} \cdot E \cdot S / K_{eq}) / E (1 + S / K_{eq}) \quad (2.15)$$

Se $V = k_{cat} \cdot ES$, então $k_{cat} \cdot E_T = V_{max}$, que é a velocidade máxima que será observada quando toda a enzima estiver presente sob forma de ES (SEGEL,1979).

Portanto,

$$V / V_{max} = (S / K_{eq}) / (1 + S / K_{eq}) \quad (2.16)$$

Todas as equações de velocidade para sistemas em equilíbrio rápido podem ser deduzidas pelo método acima. A equação de velocidade para este sistema unirreacional simples pode sofrer um rearranjo, fornecendo a equação mais familiar de Henri-Michaelis-Menten:

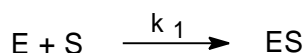
$$V / V_{max} = S / (K_{eq} + S) \quad (2.17)$$

A equação (2.17) fornece a velocidade *instantânea* ou *inicial* relativa a V_{max} para uma dada concentração de substrato. A equação só é válida se V é medida num tempo pequeno o suficiente para que S permaneça praticamente constante. Para isto, não mais do que 5% do substrato devem ser utilizados durante o tempo do ensaio (SEGEL,1979).

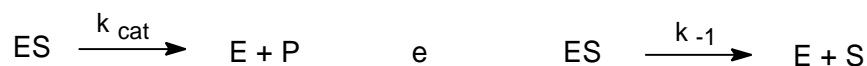
2.4.2 Hipótese do estado estacionário (Briggs-Haldane)

Se a velocidade com a qual ES forma $E + P$ é alta quando comparada com a velocidade com a qual ES se dissocia em $E + S$, então E , S e ES não estão em equilíbrio. Se a enzima estiver presente em quantidades “catalíticas” (isto é: $S \gg E_T$), logo após a mistura de E e S , será estabelecido um *estado estacionário* no qual a concentração de ES permanece praticamente constante num certo período de tempo. A equação da velocidade é a mesma desenvolvida no item anterior, equação (2.12), e a concentração de ES é obtida a partir de equações de estado estacionário ao invés de expressões de equilíbrio (SEGEL,1979).

Se a concentração de ES for constante, então a velocidade com a qual ele se forma é igual à velocidade com a qual se decompõe. ES se forma apenas de uma maneira:



e se decompõe de duas maneiras:



As velocidades de formação e de decomposição de ES são iguais a $(k_1 \cdot E \cdot S)$ e $(k_{-1} + k_{cat}) \cdot ES$, respectivamente.

No estado estacionário $dES/dt = 0$, ou $k_1 \cdot E \cdot S = (k_{-1} + k_{cat}) \cdot ES$

Resolvendo para ES:

$$ES = k_1 \cdot E \cdot S / (k_{-1} + k_{cat}) \quad (2.18)$$

O grupo de três constantes de velocidade pode ser definido por uma única constante, K_m , chamada “constante de Michaelis-Menten”:

$$K_m = (k_{-1} + k_{cat}) / k_1 \quad (2.19)$$

Substituindo-se em (2.18):

$$ES = S \cdot E / K_m \quad (2.20)$$

Após substituição na equação da velocidade (2.12), tem-se:

$$V / V_{max} = S / (K_m + S) \quad (2.21)$$

Como pode-se observar, a forma da equação de velocidade é idêntica à deduzida para condições de equilíbrio rápido. Apenas as constantes de velocidade que compõem a constante final K são diferentes.

A constante de Michaelis-Menten, K_m , na equação (2.19), é uma constante dinâmica, ou de pseudoequilíbrio, que expressa a relação entre as concentrações no equilíbrio. Se k_{cat} é muito pequena quando comparada com k_{-1} , K_m se reduz a K_{eq} . Um tratamento de estado estacionário para a seqüência de reação mais realista $E+S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E+P$, fornece a mesma equação final de velocidade, embora K_m seja agora uma função mais complexa, composta pelas constantes de velocidade de todas as etapas. Assim, o significado físico de K_m não pode ser estabelecido com absoluta certeza na ausência de outros dados, com relação à grandeza relativa das várias constantes de velocidade. Entretanto, K_m representa uma constante muito valiosa, que relaciona a velocidade de uma reação enzimática com a concentração de substrato. A equação de Henry-Michaelis-Menten, indica que K_m é equivalente à concentração de substrato, que fornece metade da velocidade máxima.

Assim, na equação (2.21), quando $S = K_m$, tem-se:

$$V = V_{max} / 2 \quad (2.22)$$

2.4.3 Tipos de inibição enzimática

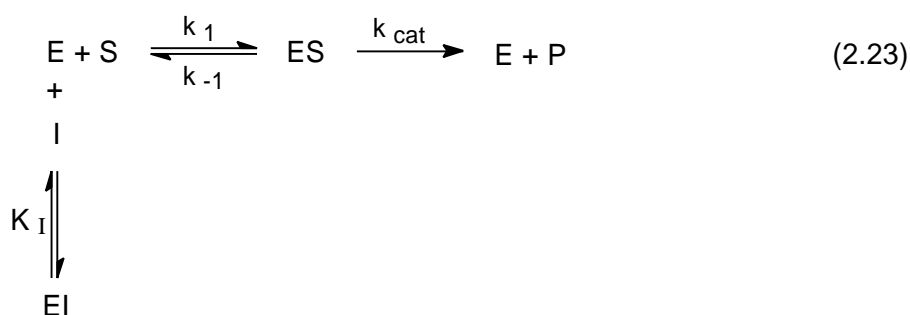
Qualquer substância que reduz a velocidade de uma reação enzimática pode ser considerada como sendo um "inibidor". Uma situação freqüente é a inibição pelos produtos da reação ou pela alta concentração de substrato, cujo efeito é reduzir a velocidade da reação catalisada. Estudos de inibição freqüentemente indicam algo com relação à especificidade de uma enzima, a arquitetura química e física do sítio ativo e o mecanismo cinético da reação (SEGEL, 1979).

Os principais tipos de inibição são (LEHNINGER, 1976; DIXON & WEBB, 1979; SEGEL, 1979):

Inibição competitiva

Na inibição competitiva, o inibidor **I** pode se combinar com a enzima livre, de tal maneira que ele compete com o substrato normal pela ligação ao sítio ativo. Um inibidor competitivo reage reversivelmente com a enzima, para formar um complexo "enzima-inibidor" **EI** aumentando a K_m aparente do substrato enquanto a V_{max} permanece a mesma; no entanto, na presença de um inibidor competitivo, uma concentração muito maior de substrato é necessária para atingir qualquer fração de V_{max} .

O esquema de reação que descreve a inibição competitiva pode ser representado pela equação (2.23).



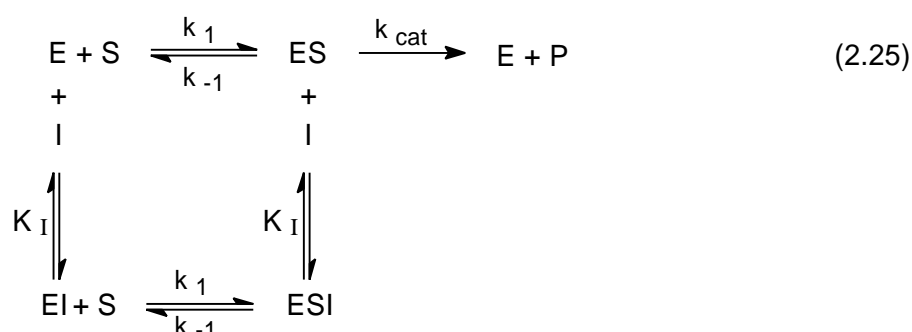
A equação final de velocidade deduzida pelas condições de estado estacionário é da forma apresentada pela equação (2.24).

$$V = V_{max} S / [K_m (1 + I/K_I + S)] \quad (2.24)$$

Inibição não-competitiva

Neste tipo de inibição o substrato **S** e o inibidor **I** se ligam reversível, aleatória e independentemente em sítios diferentes. Isto é, **I** se liga a **E** e a **ES**; **S** se liga a **E** e a **EI**. Muitas vezes os inibidores não-competitivos causam uma deformação da enzima, de

modo que ela não forma o complexo **ES** na velocidade usual e, uma vez que ele se forma, o complexo **ES** não se desdobra na velocidade normal, para originar os produtos. Esses efeitos não são revertidos pelo aumento da concentração de substrato. Nesta inibição, a reação com o inibidor produz duas formas inativas, **EI** e **ESI**. Em qualquer concentração de **I** uma parte da enzima permanecerá sob a forma de complexo não produtivo **ESI**, diminuindo o valor de V_{max} . O valor de K_m (medido a uma concentração de substrato quando a velocidade V é igual a $0,5 V_{max}$) permanece o mesmo na presença do inibidor não-competitivo porque, qualquer que seja a concentração de inibidor, as formas da enzima que podem combinar com **S** (**E** e **EI**) apresentam a mesma afinidade para com o substrato. O efeito final de um inibidor não-competitivo é fazer com que pareça que haja menor quantidade de enzima presente.

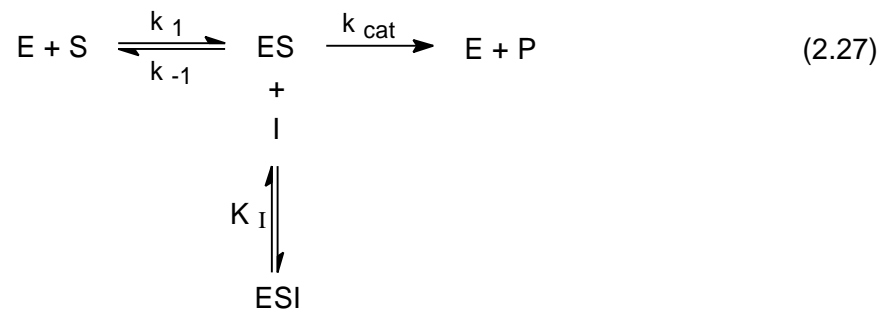


A equação final de velocidade para as condições de estado estacionário é a mostrada pela equação (2.26).

$$V = V_{max} S / [K_m (1 + I/K_I) + S(1 + I/K_I)] \quad (2.26)$$

Inibição incompetitiva (incompetitiva)

Este tipo de inibição se caracteriza pela ausência de um sítio para se ligar ao inibidor **I**, o qual só é formado depois que a enzima se uniu ao substrato **ES**. Portanto, o inibidor só pode formar complexos terciários **EIS** ou **ESI** inativos. Qualquer que seja a concentração do inibidor, uma concentração infinitamente grande de substrato não levará toda a enzima à forma de complexo **ES**; parte do complexo **ESI** não produtivo estará sempre presente, diminuindo assim o valor de V_{max} . A K_m aparente também diminui devido à reação $ES + I \rightleftharpoons ESI$, a qual utiliza parte do complexo **ES**, fazendo com que a reação de ligação do substrato $E + S \rightleftharpoons ES$ se desloque mais para a direita.



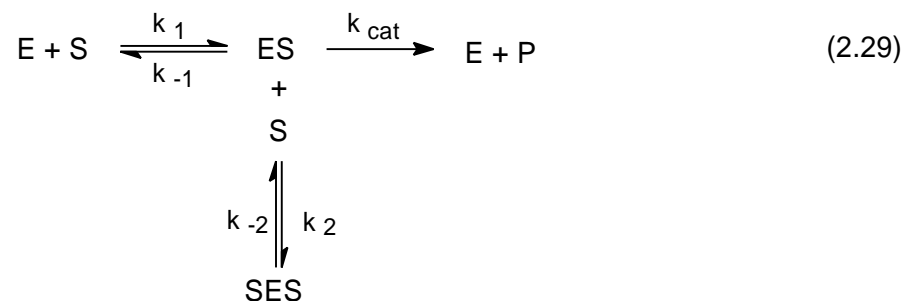
A equação final de velocidade para as condições de estado estacionário é:

$$V = V_{max} S / [K_m + S(1 + I/K_I)] \quad (2.28)$$

2.4.4 Efeito da concentração de substrato

Embora a equação de Michaelis-Menten, equação (2.21), normalmente seja obedecida a baixas concentrações de substrato, é bastante freqüente encontrar-se situações em que, à medida que se aumenta a concentração de substrato, a velocidade da reação diminui.

Estudos sobre a especificidade das enzimas sugerem que a maioria das enzimas possuem diversos grupos, sendo que cada um combina-se com uma determinada parte da molécula de substrato. Na formação do complexo ativo enzima-substrato **ES** uma molécula de substrato combina-se com todos os grupos, mas também é possível imaginar-se a formação de um complexo inativo no qual alguns dos grupos ligantes combinam-se com uma molécula de substrato e os outros grupos com uma outra molécula. Em altas concentrações de substrato, onde estas moléculas comprimem a enzima, as chances de formação do complexo inativo, com duas ou mais moléculas de substrato combinando-se com um sítio ativo, aumentam. Esta possibilidade pode ser representada pelo seguinte esquema de reações (DIXON & WEBB, 1979):



Este sistema foi analisado por Haldane, citado por DIXON & WEBB (1979), pelas hipóteses do equilíbrio rápido; porém, o tratamento pelo método do estado estacionário

também se aplica conduzindo a uma equação de forma idêntica à obtida pelo método do equilíbrio rápido, equação (2.30).

$$V = V_{\max} / (1 + K_m/S + S/K_s) \quad (2.30)$$

onde $V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot E_T$; a constante de Michaelis-Menten K_m é igual a k_{-1} / k_1 nas condições de equilíbrio e $(k_{-1} + k_{\text{cat}}) / k_1$ nas condições do estado estacionário; e sob ambas as condições k_{-2} / k_2 é igual a K_s (constante de inibição pelo substrato).

A equação de Michaelis-Menten (equação (2.21)) pode ser plotada de diversos modos, com o objetivo de se determinar V_{\max} e K_m a partir de um conjunto de medidas de velocidade em diferentes concentrações de substrato, como por exemplo:

- (i) gráfico de Lineweaver-Burk – ($1/V$ em função de $1/S$): $1/V = 1/V_{\max} + (K_m/V_{\max}) \cdot 1/S$;
- (ii) gráfico de Hanes – (S/V em função de S): $S/V = K_m/V_{\max} + (1/V_{\max}) \cdot S$;
- (iii) gráfico de Woolf-Hofstee – (V em função de V/S): $V = V_{\max} - K_m \cdot (V/S)$.

Uma comparação desses três métodos, conduziu ao seguinte: o método de Lineweaver-Burk foi o menos seguro dos três, não prevendo estimativas precisas mesmo quando o erro experimental era pequeno. A escolha entre os métodos de Hanes e Woolf-Hofstee depende, até certo ponto, da confiabilidade da medida de V . Embora o método de Woolf-Hofstee seja ligeiramente superior, é o mais sensível aos desvios da linearidade. Naturalmente nenhum destes métodos fornece resultados tão precisos quanto aqueles obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais por meio de métodos estatísticos, como o método dos mínimos quadrados (DIXON & WEBB, 1979).

Os métodos acima comentados são apropriados para a determinação das constantes cinéticas K_m e V_{\max} quando a equação de Michaelis-Menten é obedecida. Porém, nos casos onde há, por exemplo, inibição pelo substrato a obtenção destes parâmetros é mais complexa. A relação entre concentração de substrato (S) e velocidade de reação (V) para cinéticas com inibição pelo substrato pode ser modelada usando-se uma aproximação de Michaelis-Menten. Para o cálculo das constantes K_m , K_s e V_{\max} (equação 2.30) pode-se utilizar um gráfico de $1/V$ em função de S onde obtém-se: (i) uma porção linear que representa a região na qual (K_m/S) é desprezada; e, (ii) uma parte que se alinha ao longo do eixo vertical que corresponde à região em que o termo S/K_s é desprezado (BAILEY & OLLIS, 1986).

Entretanto, um rearranjo adequado da equação (2.30), como o feito por Haldane, citado por ZANIN (1989), permite o cálculo mais preciso das constantes cinéticas a partir do ajuste de uma parábola ($y = a + bx + cx^2$), como mostrado na equação (2.31):

$$(S/V) = (K_m / V_{max}) + (1/V_{max}) S + [1/(K_s \cdot V_{max})] S^2 \quad (2.31)$$

2.4.5 Efeito da concentração de produto

Da mesma forma que o substrato, também o produto formado na reação pode alterar a velocidade da reação quando presente em concentrações relativamente elevadas. Esta inibição pode ser do tipo puramente competitivo, não-competitivo, incompetitivo ou combinação dessas formas.

2.5 MODELAGEM CINÉTICA DA HIDRÓLISE DE CELOBIOSE PELA ENZIMA CELOBIASE

Na literatura, alguns autores relatam que a hidrólise da celulose pelas enzimas do sistema celulase (endoglucanase, exoglucanase e celobiase) compreende um mecanismo cinético mais complexo que aquele envolvido na hidrólise do amido. O amido hidrolisado apresenta uma alta tendência à retrogradação (recristalização) quando comparado com a celulose. Os grânulos naturais ou recristalizados do amido são lentamente atacados pela enzima α -amilase. Porém se estes são adequadamente pré-tratados, isto é, submetidos a alta temperatura na presença de ácidos ou enzimas para formar dextrinas solúveis, uma alta taxa de hidrólise é conseguida. O mesmo princípio se aplica ao caso da celulose, e o que se pode concluir é que o pré-tratamento é o parâmetro fundamental nos dois processos. Para o caso da hidrólise da celulose o sinergismo de ação entre as enzimas do sistema celulase parece ser o ponto chave para se compreender o processo (LADISCH et al., 1983).

Para descrever a ação do sistema celulase sobre a celulose, foram propostos vários mecanismos, que na maioria dos casos fundamentam-se em observações de dados de reação obtidos a partir de velocidades iniciais, de hidrólise ao longo do tempo e/ou observações qualitativas das características da enzima. Seqüências de reações e combinações entre elas procuram explicar o comportamento global das celulases na hidrólise da celulose. A modelagem desta cinética é importante para possibilitar a compreensão do mecanismo de ação das celulases, bem como para permitir a identificação das etapas controladoras do processo de hidrólise e desse modo estabelecer os parâmetros básicos necessários ao projeto do reator, como: tempo, volume, concentração, mistura, entre outros (LADISCH et al., 1983).

Segundo LADISCH et al., (1983), a modelagem cinética da celulase requer componentes do sistema celulase puros obtidos de fontes bem definidas e reprodutíveis,

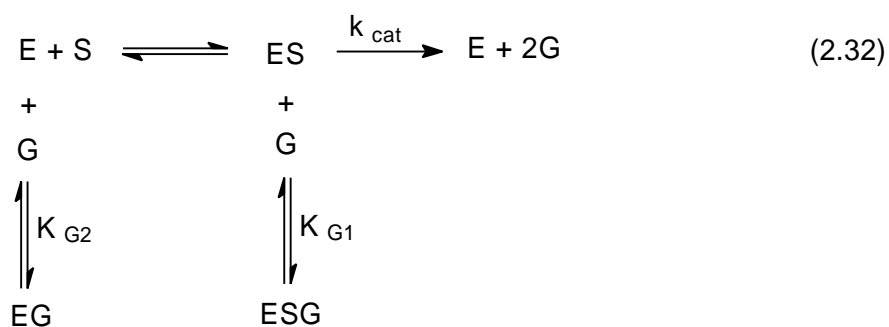
um substrato bem representativo, métodos analíticos adequados e sensíveis, bom controle de temperatura e pH, bem como paciência. Em relação a outras áreas de pesquisa envolvendo as celulasas, dados cinéticos e modelos tendo uma forte fundamentação experimental ainda são limitados, e muito há por fazer.

Uma revisão da literatura mostra que há pontos sobre a cinética da hidrólise da celulose, que são observados por muitos autores, como por exemplo, o fato que a celobiose e a glucose exercem significativos efeitos inibidores sobre as enzimas do sistema celulase (LADISCH et al., 1983; LEE & WOODWARD, 1983; BELTRAME et al., 1983; GROUS et al., 1985; DEKKER, 1986).

A celobiose exerce um efeito inibidor sobre a exoglucanase ($K_i \approx 0,06$ a $1,1$ mM) e sobre a celobiase ($K_i = 27$ a 41 mM). A glucose inibe a ação da celobiase ($K_i = 1,2$ a $4,3$ mM). De modo geral, a inibição pela celobiose é mais significativa do que a inibição pela glucose (LADISCH et al., 1983). Neste contexto, o presente trabalho limita-se a estudar a cinética da hidrólise da celobiose pela ação da celobiase comercial (NOVOZYM 188).

Os estudos cinéticos realizados com a celobiase mostraram que esta enzima sofre inibição não-competitiva pela glucose. Isto foi observado para a enzima originária de *Lenzites trabea*, *Thermonospora* e *T. reesei*. Embora tenham sido indicados a presença de dois sítios ativos, uma outra possível explicação para este tipo de inibição não-competitiva, está associada à lenta difusão do substrato (celobiose) em relação ao produto (glucose) no mesmo sítio ativo da enzima (LADISCH et al., 1983).

A enzima celobiase de *Trichoderma viride* comercial purificada por GONG et al. (1977), demonstrou possuir três frações ativas. Estudos cinéticos realizados com celobiose como substrato (2 a 20 mM) mostraram que a fração 1 apresentou um efeito de inibição pelo substrato, que o autor não incluiu em seu trabalho. As frações 2 e 3 exibiram um efeito de inibição não-competitiva pelo produto (glucose), sendo que o autor sugeriu a seqüência de reações apresentadas pela equação (2.32).



A expressão da velocidade de reação para o esquema apresentado pela equação (2.32) pode ser dada pela equação (2.33) (GONG et al., 1977):

$$V = \frac{V_{\max} S}{\left(1 + \frac{G}{K_{G1}}\right)S + \left(1 + \frac{G}{K_{G2}}\right)K_m} \quad (2.33)$$

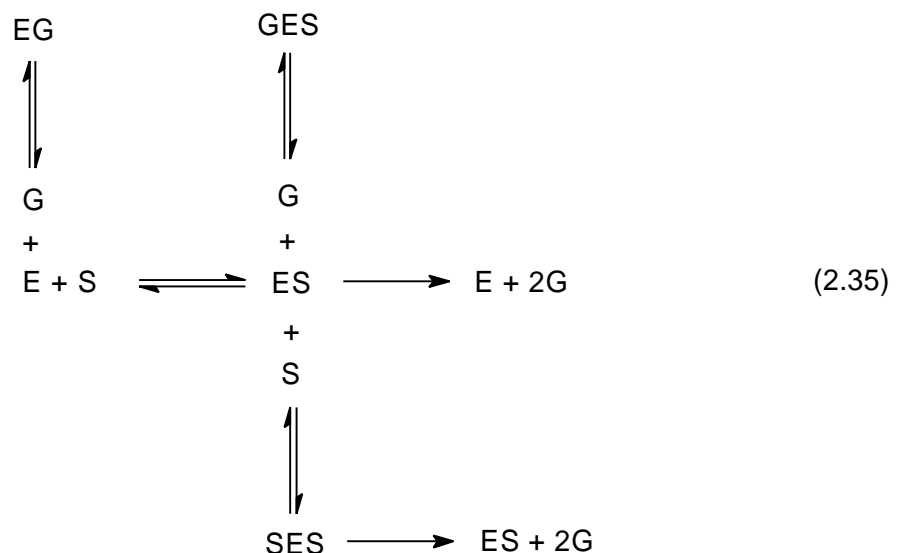
onde,

K_{G1} e K_{G2} são as constantes de dissociação dos complexos ESG e EG respectivamente, e $V_{\max} = 2 k_{\text{cat}} E_T$.

GONG et al. (1977), também obtiveram uma expressão integrada que permitiu o cálculo do tempo necessário para se obter conversões de celobiose em glucose para uma ampla faixa de concentrações de substrato (5 a 40 mM) e conversões. O autor substituiu, na equação (2.33): $V = dG/dt$ e $S = S_0 - G/2$, obtendo dessa forma a equação (2.34), onde S_0 representa a concentração inicial de substrato.

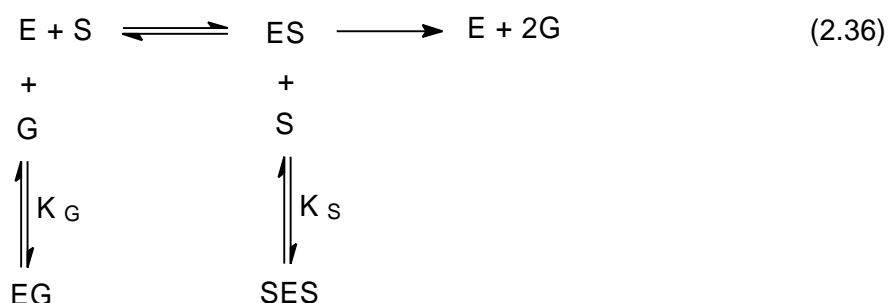
$$t.V_{\max} = \frac{G^2}{2K_{G1}} + \left(1 - \frac{2K_m}{K_{G1}}\right)G - K_m \left(2 + \frac{4S_0}{K_{G2}}\right) \ln \left(1 - \frac{G}{2S_0}\right) \quad (2.34)$$

Em seu trabalho de revisão LADISCH et al. (1983), mostraram que a celobiase sofre inibição pelo substrato e inibição não-competitiva pelo produto, por um mecanismo como o proposto na equação (2.35), onde o complexo SES foi considerado como produtivo.



BELTRAME et al. (1983), propuseram um mecanismo cinético para a hidrólise da celobiose com a celobiase comercial (NOVO 250L) e demonstraram que a enzima

apresentou inibição pelo substrato a 26°C e 50°C, com menor intensidade a 50°C, bem como competitiva pelo produto de acordo com a seqüência apresentada pela equação (2.36), onde o complexo SES foi considerado não-produtivo como EG.



A expressão da velocidade de reação para a seqüência apresentada pela equação (2.36), e utilizada por BELTRAME et al. (1983) para representar seus dados de hidrólise em diferentes concentrações de substrato (0,15 a 0,60 mg/mL a 50°C) é da forma mostrada na equação (2.37).

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m \left(1 + \frac{G}{K_G}\right) + S \left(1 + \frac{G}{K_G}\right) + \frac{S^2}{K_S}} \quad (2.37)$$

A inibição pelo substrato foi constatada para concentrações de celobiose maiores que 10 mM por LEE & WOODWARD (1983); GROUS et al. (1985) e DEKKER (1986). Estes autores trabalharam com a enzima NOVO 250L (NOVOZYM 188) e celobiose como substrato, utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk para a análise dos resultados. GROUS et al., (1985), observaram que este tipo de gráfico não prediz os resultados para concentrações de substrato de 11 a 28mM. Para esta mesma enzima e substrato BELTRAME et al. (1983) utilizaram o gráfico de Lineweaver-Burk para constatar a inibição pelo substrato mas utilizaram o modelo de Haldane no cálculo das constantes K_m , K_s e V_{\max} (vide Tabela 2.8). Nenhum desses autores sugeriu o tipo de inibição que o substrato exerce sobre a enzima, e exceto por DEKKER (1986), que purificou-a por meio de diálise, todos trabalharam com a enzima comercial.

WOODWARD & WOHLPART (1982) observaram que, para a concentração de 10 mM de celobiose, a inibição pela glucose era menor que para concentrações de 2 mM, sugerindo inibição competitiva pelo produto. Com base nos dados experimentais obtidos e nos dados da literatura, BELTRAME et al. (1983) observaram que parece ocorrer uma mudança no mecanismo de inibição pelo produto, que passaria do competitivo para o não-competitivo com a purificação da enzima e propuseram um mecanismo competitivo para a inibição pelo produto. GROUS et al. (1985) também observaram inibição

competitiva pelo produto utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk. Nesses trabalhos a enzima NOVO 250L (NOVOZYM 188) foi utilizada sem purificação e o substrato utilizado foi a celobiose.

DEKKER (1986), trabalhando com a NOVO 250L (NOVOZYM 188) purificada ϕ -NPG como substrato para este experimento, constatou inibição parcialmente competitiva pelo produto. GONG et al. (1977) purificaram a enzima proveniente do microrganismo *Trichoderma viride* e observaram mecanismo não-competitivo. Ambos utilizaram o gráfico de Lineweaver-Burk. Por outro lado, BISSET & STERNBERG (1978), utilizando a enzima purificada obtida do *Aspergillus phoenicis*, observaram inibição competitiva pelo gráfico de Dixon.

Como pode-se observar do exposto, ainda não existe na literatura uma concordância, entre os vários autores, sobre o tipo de inibição exercida pela celobiose (substrato) e pela glucose (produto) na reação de hidrólise da celobiose pela enzima celobiase.

Nas Tabelas 2.7 e 2.8 são apresentados os valores obtidos na literatura para as constantes K_m , K_s , K_G e V_{max} .

Tabela 2.7 - Valores das constantes de Michaelis-Menten (K_m); de inibição pelo substrato (K_s) e pelo produto (K_G); e da velocidade máxima de reação (V_{max}), para a enzima celobiase utilizando-se celobiose como substrato.

Origem da enzima	Temperatura (°C)	K_m (mM)	K_s (mM)	K_G (mM)	V_{max}	Referência
<i>Trichoderma viride</i>	40	1,5	33,0	BERGHEM & PETERSSON (1974)
	25	2,68	74,4	
<i>Aspergillus phoenicis</i>	50	0,75	164,0	STERNBERG et al. (1977)
	50	0,8	...	1,8	...	
<i>Trichoderma reesei</i> C30	50	1,9	...	0,5	0,109	WOODWARD & ARNOLD (1981)
					(c)	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	75	1,0	...	5,65	800,0	SAHA et al. (1994)

(a) $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ enzima

(b) $\mu\text{mol}/\text{min}$

(c) $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mL}$ enzima

(d) K_G foi determinado utilizando-se *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato.

Tabela 2.8 - Valores das constantes de Michaelis-Menten (K_m); de inibição pelo substrato (K_s) e pelo produto (K_G); e da velocidade máxima de reação (V_{max}), para a enzima celobiase NOVO 250L (Novozym 188), proveniente do microorganismo *Aspergillus niger*, utilizando-se celobiose como substrato.

Temperatura (°C)	K_m (mM)	K_s (mM)	K_G (mM)	V_{max}	Referência
...	2,7	0,29 (a)	WOODWARD & WOHLPART (1982)
30	3,6	0,25 (b)	WOODWARD et al. (1982)
50	2,7	43,0	3,3	1,7 (c)	BELTRAME et al. (1983)
50	1,66	43,4	2,87	...	GROUS et al. (1985)
50	5,63	...	3,0 (d)	33,74 (c)	DEKKER (1986)

(a) $\mu\text{mol}/\text{min}$

(b) $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ enzima

(c) $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ enzima

(d) K_G foi determinado com 0,5-8 mM de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato, na presença de 0-8 mM de glucose inicial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Substrato

Como substrato foi utilizada a D-celobiose da Sigma, C-7252.

3.1.2 Enzima

A enzima utilizada foi a celobiase NOVOZYM 188 produzida pela Novo Nordisk A/S, a partir do microrganismo *Aspergillus niger*, com atividade específica de 9,5 μ moles de glucose / min. mg de proteína a 50°C e pH 4,8, e teor de proteína médio de 156 mg proteína/mL de enzima.

3.1.3 Reagentes analíticos

Nas determinações do teor de proteína da enzima celobiase, o padrão utilizado foi a albumina bovina da SIGMA, A-2153, e o reagente de Folin-Ciocalteu foi o do laboratório Laborclin.

Para a determinação da glucose contida nas amostras, foi utilizado o reagente GOD-PAP dos laboratórios: In Vitro Diagnóstica, Bio Diagnóstica e Merck. A glucose utilizada como padrão foi a do laboratório Reagen.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico P.A.

3.1.4 Reator

Para a determinação da atividade enzimática foram utilizados reatores tipo batelada, de vidro, com camisa para circulação de água na temperatura de ensaio. Havia dois reatores à disposição, para que fosse possível realizar dois testes de atividade simultaneamente. A capacidade de cada reator era de 80 mL, mas o volume útil foi de 21 mL. A agitação da solução foi realizada por um agitador magnético, e a

temperatura da água de circulação era mantida por um banho termostático. Um esquema do reator é mostrado na Figura 3.1.

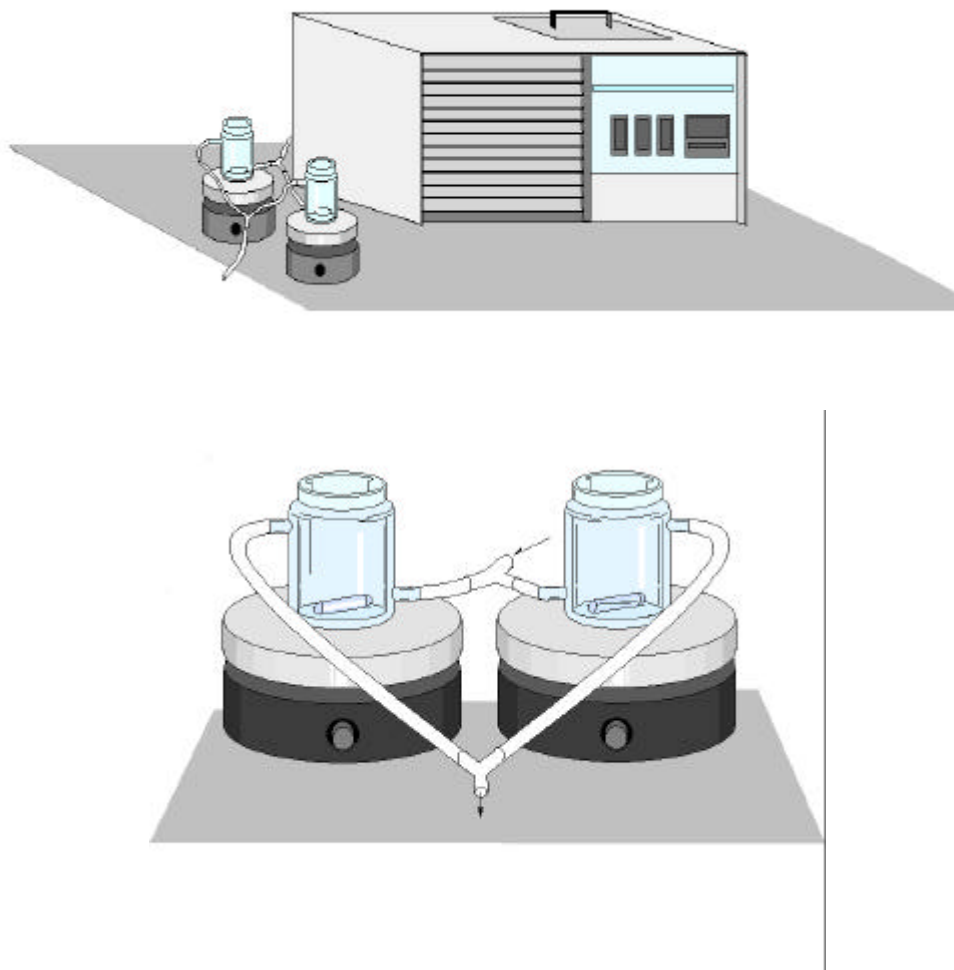


Figura 3.1 - Esquema dos reatores tipo batelada.

3.1.5 Equipamentos

- . Banho-maria com agitação orbital MA 093 – Marconi
- . Espectrofotômetro UV-1203 – Shimadzu
- . Medidor de pH DMPH-1 – Digimed
- . Agitador de tubos (Vórtex) AT 56 – Phoenix
- . Banho termostático TE-184 – Tecnal
- . Agitador magnético 257 – Fanen.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Determinação do teor de proteína

O teor de proteína da enzima celobiase foi determinado pelo método colorimétrico de LOWRY et al. (1951), utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu e a albumina padrão indicados no item 3.1.3.

Princípio do método

A coloração azul final é resultante da: **(i)** reação da proteína com o íon cobre em meio alcalino, e, **(ii)** redução do reagente fosfomolibdico-fosfotungstênico pela tirosina e triptofano presentes na proteína (LAYNE, 1957).

Procedimento

As amostras de enzima eram diluídas com água destilada para se adequarem à faixa de operação do método (0,1 – 0,9 g/L).

Em tubos de ensaio colocava-se 0,1 mL da amostra, adicionava-se 0,4 mL de água destilada e 5 mL do reagente de cobre (preparado no dia de uso pela adição de 2 mL de sulfato de cobre a 2% sobre 2 mL de solução de tartarato de sódio e potássio a 4%, completando-se o volume para 100 mL com solução de carbonato de sódio a 2% em hidróxido de sódio 0,1 N). Deixava-se reagir durante 10 minutos e adicionava-se 0,5 mL do reagente de fenol (reagente de Folin-Ciocalteu) diluído 1:3 com água destilada. Após agitação em “vórtex” aguardavam-se 10 minutos e lia-se a absorbância em espectrofotômetro a 625 nm, utilizando-se cubetas de plástico de 1 cm de caminho óptico. O teste era conduzido à temperatura ambiente.

A calibração do zero no aparelho era feita mediante um teste em branco, preparado pela adição de 5 mL de reagente de cobre a 0,5 mL de água destilada, que era submetido ao mesmo tratamento das amostras.

A concentração de proteína era calculada a partir de uma curva de calibração obtida a partir da determinação das absorbâncias de uma série de 10 concentrações padrões de albumina na faixa de 0,1 g/L a 1,0 g/L. Para estas concentrações as absorbâncias lidas no aparelho estavam na faixa de 0,004 a 0,260.

3.2.2 Determinação de glucose

Para a determinação da glucose produzida durante a reação de hidrólise da celobiose, foi utilizado o método enzimático GOD PAP (TRINDER, 1969) .

Princípio do método

A glucose é oxidada a ácido glucônico pela enzima glucose oxidase, com produção de peróxido de hidrogênio. Este sofre a ação da enzima peroxidase que em presença de 4-amino-antipirina e um reagente fenólico produz um cromogênio (antipirilquinonimina) cuja absorção em 505 nm é diretamente proporcional à concentração de glucose na amostra (folheto IN VITRO DIAGNÓSTICA).

A reação é específica para a glucose. A cor róseo-avermelhada é proporcional à concentração de glucose, apresentando boa linearidade de 0,1 a 1,0 mg de glucose/mL de solução.

Procedimento

As amostras obtidas nos ensaios, quando necessário, foram diluídas com água destilada para se adequarem à faixa de concentração da curva padrão de glucose (0,1 a 1,0 g/L).

Em tubos de ensaio colocava-se 0,1 mL da amostra, à qual adicionavam-se 2 mL do reagente GOD-PAP e levava-se a um banho termostático a 37°C por 15 minutos. Resfriavam-se os tubos em um banho com água à temperatura ambiente, diluía-se com 3 mL de água destilada, agitava-se em “vórtex” e efetuava-se a leitura no espectrofotômetro a 505 nm.

A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando-se um teste em branco, preparado pela adição de 2 mL de GOD-PAP a 0,1 mL de água destilada, que passava pelo mesmo procedimento das demais amostras.

A concentração de glucose foi calculada utilizando-se uma curva de calibração obtida a partir da determinação das absorbâncias de uma série de 20 concentrações padrão de glucose na faixa de 0,1 a 1,0 g/L.

3.2.3 Preparação da solução de celobiose

A solução de celobiose na concentração de 2,0 g/L (0,2% p/v) era preparada conforme apresentado a seguir, para os testes de atividade em função do pH e da temperatura:

1. Pesava-se 0,2 g de celobiose em um béquer.
2. Adicionava-se 0,1 g de benzoato de sódio.
3. Diluía-se com aproximadamente 60 mL de água destilada.
4. Ajustava-se o pH da solução com o ácido ou o sal do tampão Mc Ilvaine 0,1M (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1972).
5. Adicionavam-se 10 mL do tampão no pH desejado (concentração final de tampão na solução: 10 mM).
6. Completava-se o volume, em balão volumétrico de 100 mL, com água destilada.
7. Armazenava-se em geladeira.

Para os demais experimentos a metodologia de preparação da solução de celobiose foi a seguinte:

1. Pesava-se a celobiose de acordo com a concentração desejada, em um béquer.
2. Adicionava-se 0,1 g de benzoato de sódio.
3. Diluía-se com aproximadamente 60 mL de água destilada.
4. Adicionavam-se 5 mL do tampão acetato de sódio 1M pH 4,8 (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1972), de forma que a concentração final deste tampão na solução fosse de 50 mM, de acordo com a literatura (WOODWARD & WOHLPART, 1982; DEKKER, 1986).
5. Completava-se o volume, em balão volumétrico de 100 mL, com água destilada.
6. Armazenava-se em geladeira.

3.2.4 Propriedades catalíticas da enzima

Previamente, foram realizados ensaios para a determinação da concentração da enzima a ser empregada, bem como do tempo de realização do ensaio de velocidade inicial, tendo em vista a obtenção de no máximo 20% de conversão de celobiose em glucose.

A enzima celobiase foi então caracterizada quanto à sua atividade específica em função do pH e da temperatura, e quanto à sua estabilidade térmica quando incubada em

presença de celobiose 2 g/L no pH 4,8. Estudou-se ainda a influência da concentração inicial de substrato e da concentração de produto.

Em todos os ensaios a atividade enzimática foi determinada pelo método das velocidades iniciais (item 2.3.1). Acompanhava-se o progresso da reação por meio da curva de glucose produzida (micromoles) em função do tempo de reação (minutos) em reator batelada com agitação magnética (Figura 3.1). O procedimento padrão para todos os testes foi o seguinte:

1. Aquecia-se o banho termostático em uma das temperaturas desejadas, e colocavam-se no reator 20 mL de celobiose no pH de teste.
2. Aguardavam-se 5 minutos para que o equilíbrio térmico fosse atingido. Retirava-se então uma amostra de 0,5 mL, que era colocada em um tubo de ensaio com tampa e fervida por 5 minutos em um banho-maria em ebulição. Em seguida resfriava-se esta amostra em um banho-maria à temperatura ambiente e armazenava-se a mesma em geladeira a 4 °C. Este era o branco do teste.
3. Adicionava-se 1 mL da solução de enzima diluída ao reator, acionava-se o cronômetro e retiravam-se 7 amostras de 0,5 mL nos intervalos previamente determinados. Cada amostra retirada era imediatamente colocada em um tubo de ensaio, que era tampado e colocado por 5 minutos no banho-maria em ebulição para desativação da enzima. Após resfriadas estas amostras eram armazenadas em geladeira.
4. Descartava-se a solução restante. Lavava-se o reator com água destilada, secava-se com papel absorvente e adicionavam-se 20 mL de solução de celobiose para o próximo teste.
5. A glucose era determinada pelo método GOD-PAP descrito no item 3.2.2.

A velocidade inicial da reação foi determinada fazendo-se a regressão linear dos dados de glucose produzida na reação em função do tempo. A glucose produzida foi calculada pela equação (3.1).

$$G_p = (C_g^* - C_{gc}^*)V_r/M \quad (3.1)$$

A atividade específica da enzima (A_e) foi determinada a partir do coeficiente angular b_1 da reta ajustada conforme a Figura 3.2, dividida pelo teor de proteína da enzima.

$$A_e = b_1/MP \quad (3.2)$$

Sendo:

A_e - atividade específica da enzima celobiase ($\mu\text{moles /min. mg proteína}$)

b_1 - coeficiente angular da reta de glucose produzida em função do tempo ($\mu\text{moles/min}$)

C_g^* - concentração de glucose na amostra num tempo "t" (g/L)

C_{gc}^* - concentração de glucose proveniente de contaminação da celobiose com glucose (mol/L) (g/L)

G_p - glucose produzida no tempo "t" (μmoles)

M - peso molecular da glucose (0,180 mg/ μmol)

MP - proteína utilizada no ensaio (mg)

V_r - volume de reação (L)

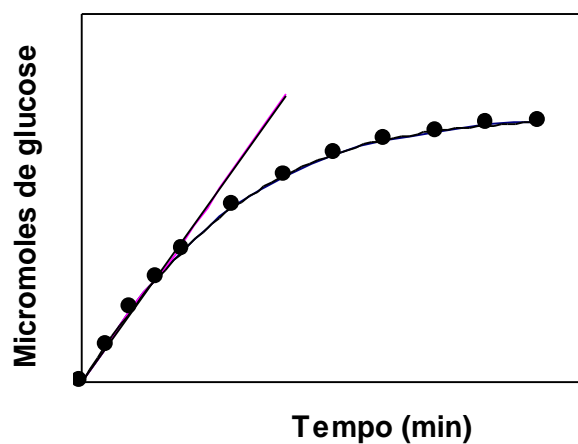


Figura 3.2 - Método das velocidades iniciais.

a) Determinação da concentração de enzima

A influência da concentração de enzima na velocidade de reação foi estudada a 50°C , com solução de celobiose 2 g/L – pH 4,8, conforme descrito a seguir:

1. Foi preparada uma solução estoque de enzima, diluída 1:50 com água destilada.

2. A partir da solução estoque foram feitas outras diluições da solução de enzima: 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, e 1:2000, com água destilada.
3. Após homogeneização das diluições retirou-se uma alíquota para a dosagem do teor de proteína conforme o método descrito no item 3.2.1.
4. A atividade foi então determinada, para cada diluição da enzima, pelo método das velocidades iniciais, sendo que as amostras de 0,5 mL foram retiradas nos seguintes intervalos de tempo:
 - i. De 1 em 1 minuto até 7 minutos para as diluições 1:50, 1:100 e 1:200;
 - ii. De 3 em 3 minutos até 18 minutos para 1:500;
 - iii. De 5 em 5 minutos até 30 minutos para 1:1000 e 1:2000.

Devido à cor escura da solução enzimática determinou-se, para cada diluição da enzima, além do branco do teste, o branco da enzima. Procedia-se da seguinte forma: adicionava-se 1 mL da enzima diluída em 20 mL de água destilada e dosava-se a glucose pelo método GOD-PAP (item 3.2.2). Os valores obtidos para os dois brancos eram então subtraídos das concentrações de glucose obtidas para as amostras, nos cálculos de atividade enzimática.

b) Teste de interferência do conservante benzoato de sódio

Foi realizado um teste de atividade da celobiase na presença de benzoato de sódio na concentração de 1 g/L e outro teste na ausência do mesmo, para observar se ocorreria interferência na ação enzimática.

As condições de ensaio foram: concentração de celobiose 2 g/L, 50 °C, pH 4,8 e concentração de enzima 95 µL/L. O método foi o das velocidades iniciais.

c) Atividade em função do pH e da temperatura

A atividade da enzima celobiase em função do pH e da temperatura foi determinada nas seguintes condições de ensaio:

- Faixa de pH para as soluções de celobiose: 3,0; 4,0; 4,5; 4,8; 5,0; 6,0 e 7,0.
- Temperaturas: 40 a 75 °C, com intervalos de 5 °C.
- Diluição inicial da enzima: 1:500.

O tempo total de ensaio, assim como o intervalo de amostragem, não foram os mesmos para todas as temperaturas e pHs, uma vez que havia a preocupação de não se

afastar da região linear na curva de conversão, de acordo com o método das velocidades iniciais. Assim, para os valores de pH e temperaturas mais favoráveis à reação, tiravam-se amostras de 3 em 3 minutos durante 18 minutos e para os menos favoráveis, de 5 em 5 minutos durante 30 minutos.

Os ensaios foram conduzidos como descrito a seguir:

1. Preparavam-se 200 mL de solução de celobiose 2 g/L para cada pH, conforme descrito no item 3.2.3. Armazenava-se em geladeira.
2. Diluía-se a enzima a 1:500 com água destilada, armazenando-se também em geladeira.
3. Usava-se o procedimento já descrito para o método das velocidades iniciais até que toda a faixa de pH e temperatura fosse testada (item 3.2.4).

d) Estabilidade térmica da enzima celobiase

A estabilidade térmica da enzima celobiase foi determinada nas temperaturas de 40 a 70°C, com um intervalo de 5°C. A atividade residual pelo método das velocidades iniciais foi determinada sempre a 50°C utilizando-se a celobiose na concentração de 2 g/L e pH 4,8. Para cada uma das temperaturas o ensaio era conduzido conforme apresentado a seguir:

1. Aquecia-se um banho termostático auxiliar em uma das temperaturas de teste (40 a 70°C).
2. Preparava-se uma solução 1:50 de enzima celobiase em água destilada, que era armazenada em geladeira.
3. Colocavam-se 20 mL de celobiose 2 g/L no reator conectado ao outro banho termostático e aguardavam-se 5 minutos para atingir o equilíbrio térmico (50°C), para o teste de atividade.
4. Em um tubo de ensaio eram colocados 9 mL de substrato (celobiose 2g/L) e 1 mL da solução 1:50 da enzima. Desta forma obtinha-se a diluição final de 1:500 para a solução enzimática.
5. No momento em que se adicionava a enzima aos 9 mL de substrato, agitava-se rapidamente e coletava-se 1 mL para o teste de atividade no tempo zero. O tubo de ensaio era então tampado e mergulhado no banho à temperatura de teste ao mesmo tempo em que acionava-se o cronômetro. Esta solução estoque de enzima permanecia incubada na temperatura desejada (40 a 70°C), sendo que a intervalos de 40 minutos uma alíquota de 1,0 mL era

retirada para a determinação da atividade, a 50°C, pelo método das velocidades iniciais. A 70°C o tempo de incubação da enzima era menor (realizaram-se testes de atividade para tempos de incubação de 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos), devido à rápida desativação térmica da enzima nesta temperatura.

6. Adicionava-se ao reator batelada (etapa 3), 1,0 mL da solução estoque de enzima (etapa 5), acionava-se o cronômetro, aguardavam-se 10 segundos e tirava-se uma amostra de 0,5 mL que era fervida por 5 min para desativação da enzima. Este era o branco e correspondia ao tempo zero da reação.
7. Prosseguia-se tirando amostras de 0,5 mL a cada 3 minutos até completar-se o tempo de reação.
8. Após 18 minutos de reação, lavava-se o reator com água, secava-se com papel absorvente, adicionavam-se novos 20 mL de solução de celobiose 2,0 g/L, pH 4,8, e aguardavam-se 5 minutos para atingir o equilíbrio térmico (50°C).
9. As etapas 6 a 8 eram repetidas até se atingir 240 minutos de incubação da solução estoque de enzima na temperatura de teste (etapa 5), observando-se que, apenas para a temperatura de 70°C, o período total de incubação da enzima foi de 40 minutos.

Com a realização deste ensaio pode-se obter a energia de desnaturação térmica da enzima (E_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$).

e) Influência da concentração inicial de substrato

As soluções de celobiose foram preparadas nas concentrações indicadas na Tabela 3.1, de acordo com o método descrito no item 3.2.3, em pH 4,8. Para cada concentração de substrato realizou-se um teste de atividade a 50°C, pelo método das velocidades iniciais já descrito. A enzima utilizada foi previamente diluída a 1:500 com água destilada.

Os tempos de amostragem empregados para as diversas concentrações também estão indicados na Tabela 3.1.

A partir destes resultados pode-se obter os parâmetros cinéticos: K_m , K_s e V_{max} .

Tabela 3.1 - Tempo de amostragem para as diversas concentrações de celobiose.

Concentração de celobiose		Intervalo entre amostras	Tempo total de análise
(g/L)	(mM)	(minutos)	(minutos)
0,4	1,17	0,5	3
0,8	2,34	1	6
1,2	3,51	2	12
1,6	4,67	2	12
2,0	5,84	3	18
2,4	7,01	3	18
2,8	8,18	3	18
3,2	9,35	5	30
3,6	10,52	5	30
4,0	11,69	5	30
5,0	14,61	5	30
6,0	17,53	5	30
7,0	20,45	5	30
8,0	23,37	5	30
12,0	35,06	5	30
16,0	46,74	5	30
20,0	58,43	5	30

f) Conversão em função do tempo

Com o objetivo de modelar a hidrólise da celobiose com a enzima celobiase, avaliando a inibição pelo produto e observando a desnaturação térmica da enzima em operação por longos períodos de tempo, a reação de hidrólise foi acompanhada até aproximadamente 100% de conversão de substrato em produto, na presença e ausência de produto adicionado no início do ensaio.

Os testes de conversão em função do tempo de reação foram realizados em frascos erlenmeyers de 500 mL acondicionados em um shaker orbital, com volume inicial de reação de 250 mL. As condições de reação, assim como a mistura reacional inicial, estão apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Mistura reacional e condições para o teste de conversão.

Substrato				Condições de Reação		
Celbiose (g/L)	Glucose adicionada (g/L)	Benzoato de sódio (1 g/L)	Celbiase ($\mu\text{L/L}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Duração (h)
2	0	1	95	40 e 50	4,8	30
2	1,8	1	95	40 e 50	4,8	30
20	0	1	95	40 e 50	4,8	100 e 73

Procedimento:

1. Para cada temperatura, colocavam-se os erlenmeyers contendo os substratos no banho termostático com agitação até a estabilização da temperatura.
2. Retirava-se uma amostra de 0,5 mL (branco do teste).
3. Adicionava-se 0,5 mL de enzima diluída a 1:21 e simultaneamente acionava-se o cronômetro.
4. Retiravam-se então, amostras de 0,5 mL nos intervalos de tempo:
 - A cada 3 minutos durante 30 minutos.
 - A cada 5 minutos de 30 a 60 minutos.
 - A cada 30 minutos de 1 a 5 horas.
 - A cada 60 minutos de 5 a 24 horas.
 - Amostras com intervalos mais prolongados a partir das 24 horas.
5. Toda amostra retirada era fervida, resfriada e armazenada em geladeira para posterior dosagem de glucose pelo método GOD-PAP (item 3.2.2).

A conversão de celbiose em glucose foi determinada pela equação (3.3), desenvolvida a partir da estequiometria da reação, onde um mol de celbiose forma dois moles de glucose.

$$X_A = (G - G_i) / 2C_{A0} \quad (3.3)$$

onde:

- C_{A0} - concentração inicial real de celobiose (moles/L) = $(C_0^* - C_{gc}^*) / 342$
- C_0^* - concentração inicial de celobiose (g/L)
- G - concentração de glucose em função do tempo (mol/L)
- C_{ga} - concentração de glucose adicionada na solução (mol/L)
- C_{gc} - concentração de glucose proveniente da contaminação da celobiose com glucose (mol/L)
- C_{gc}^* - concentração de glucose proveniente da contaminação da celobiose com glucose (g/L)
- G_i - concentração inicial de glucose (mol/L) = $C_{gc} + C_{ga}$
- X_A - conversão de celobiose em glucose

g) Estabilidade térmica no ensaio de conversão em função do tempo

Foram realizados ensaios de estabilidade térmica paralelamente aos testes de conversão, para as concentrações de 2 g/L e de 20 g/L de celobiose nas temperaturas de 40 e de 50°C. Para estes testes adotou-se o seguinte procedimento:

1. Adicionava-se 0,5 mL de enzima original a 249,5 mL de substrato.
2. Retirava-se uma amostra armazenando-a em geladeira.
3. O restante era acondicionado em um erlenmeyer, colocado no *shaker* pelo tempo aproximado de duração do teste de conversão, na temperatura de teste (40 ou 50°C). Para a concentração de 2 g/L de celobiose o tempo de incubação foi de 24 horas para as duas temperaturas. Já para a concentração de 20 g/L, foi de 100 horas a 40°C e 73 horas a 50°C.
4. Determinava-se então a atividade da enzima que ficara em incubação e da amostra original estocada em geladeira, utilizando-se o método das velocidades iniciais, com a enzima na concentração final de 95 μ L/L e utilizando como substrato a celobiose 2g/L, pH 4,8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados alcançados com a realização deste trabalho.

4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE GLUCOSE E PROTEÍNA

Nas Figuras 4.1 e 4.2 apresenta-se um exemplo das várias curvas de calibração utilizadas para a determinação do teor de proteína e da glucose presente nas amostras, respectivamente.

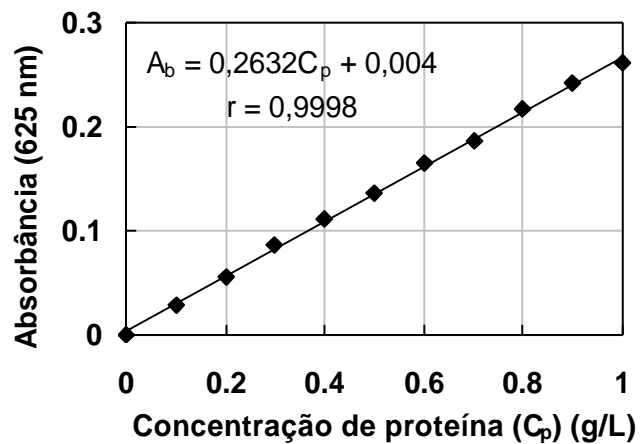


Figura 4.1 - Reto ajustada para a determinação do teor de proteína, pelo método de Lowry (item 3.2.1).

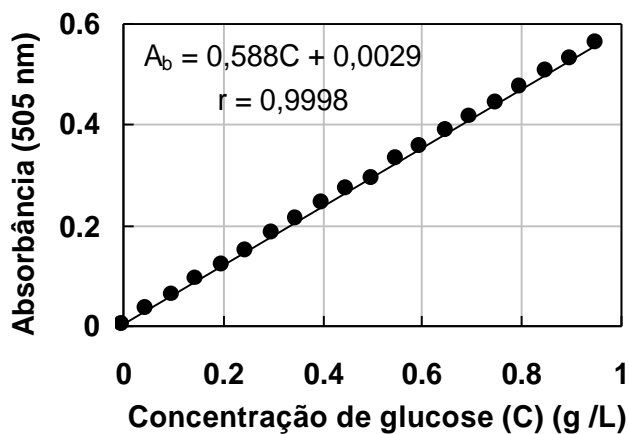


Figura 4.2 - Reto ajustada para a determinação de glucose pelo método GOD-PAP (item 3.2.2).

4.2 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA ENZIMA CELOBIASE

Neste item serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos testes de caracterização da enzima celobiose. Para estes ensaios foi utilizada a metodologia descrita na seção 3.2.4.

4.2.1 Determinação da concentração de enzima

Na Tabela 4.1 e Figura 4.3 é apresentada a velocidade inicial da reação de hidrólise da celobiose, em função da quantidade de proteína utilizada. Os dados de velocidade de reação são apresentados em função da quantidade de proteína utilizada pelo fato desta enzima ter se apresentado estável quando estocada em geladeira, não tendo sido observado decréscimo na atividade da mesma até o final dos experimentos.

O principal objetivo, com a realização deste experimento, foi determinar a quantidade de proteína necessária para que a reação ocorresse com uma velocidade satisfatória e de acordo com o método das velocidades iniciais, onde buscou-se manter a conversão de celobiose em glucose em, no máximo, 20%.

Quando se emprega uma grande quantidade de proteína, a velocidade com que a enzima converte o substrato é alta, o que torna necessária a amostragem em reduzidos intervalos de tempo (da ordem de 30 segundos). Por outro lado, se a quantidade de proteína for muito baixa, ou seja, se a enzima estiver muito diluída, a reação ocorrerá muito lentamente aumentando o tempo necessário para a amostragem, permitindo que outros fatores (como desnaturação térmica e pelo pH) atuem sobre a enzima.

Tabela 4.1 - Velocidade inicial da reação em função da quantidade de proteína utilizada.

Diluição da enzima	Teor de proteína em 20 mL de substrato (mg)	Equação de ajuste $G_p = \text{glucose formada } (\mu\text{moles})$ $t = \text{tempo (min)}$	Velocidade inicial da reação (v) ($\mu\text{moles glucose/min}$)
1:50	3,532	$G_p = 22,695 t + 5,489$, $r = 0,9806$	22,70
1:100	1,766	$G_p = 12,389 t + 2,912$, $r = 0,9820$	12,39
1:200	0,883	$G_p = 6,869 t + 1,681$, $r = 0,9920$	6,87
1:500	0,353	$G_p = 3,505 t + 2,222$, $r = 0,9944$	3,51
1:1000	0,177	$G_p = 1,716 t + 2,634$, $r = 0,9952$	1,72
1:2000	0,088	$G_p = 0,872 t + 1,125$, $r = 0,9970$	0,87

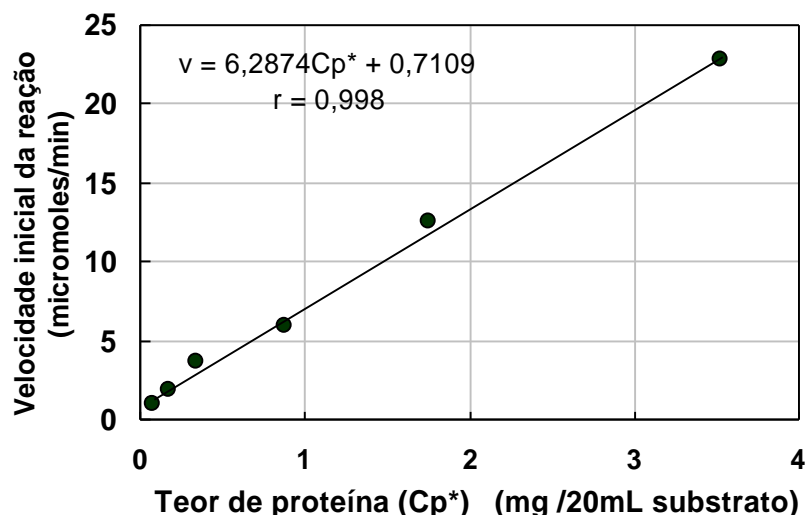


Figura 4.3 - Velocidade inicial da reação em função da quantidade de proteína utilizada.

A diluição inicial de 1:500 para a enzima (0,353 mg de proteína para cada mL de enzima diluída) foi escolhida para a realização dos demais experimentos por ter sido a que apresentou um intervalo de tempo adequado para a conversão de aproximadamente 20% do substrato celobiose 2 g/L (50°C, pH 4,8) em glucose, conforme pode-se observar na Tabela 4.2. Como nos ensaios usava-se 1 mL da enzima já diluída a 1: 500 para cada 20 mL de substrato, a diluição final da enzima era de 1:10 500, equivalendo a 95 μ L de enzima por litro de solução.

Tabela 4.2 - Teste de conversão em função do tempo para a hidrólise de 20 mL de celobiose 2g/L , pH 4,8, a 50°C, utilizando 1 mL da enzima celobiase diluída a 1:500.

Tempo de reação (min)	Volume de reação (mL)	Micromoles de glucose formada	Conversão (%)
0	21,0	0,00	0,00
3	20,5	14,72	6,17
6	20,0	24,75	10,63
9	19,5	33,72	14,85
12	19,0	43,08	19,47
15	18,5	49,64	23,04
18	18,0	57,14	27,26

4.2.2 Teste de interferência do conservante benzoato de sódio

Nas Figuras 4.4 e 4.5 observa-se que o benzoato de sódio na concentração de 1g/L, não causou nenhuma interferência na atividade enzimática, uma vez que as atividades iniciais foram praticamente as mesmas, como pode ser constatado pelo coeficiente angular das retas obtidas. A metodologia para estes ensaios foi descrita no item 3.2.4.b.

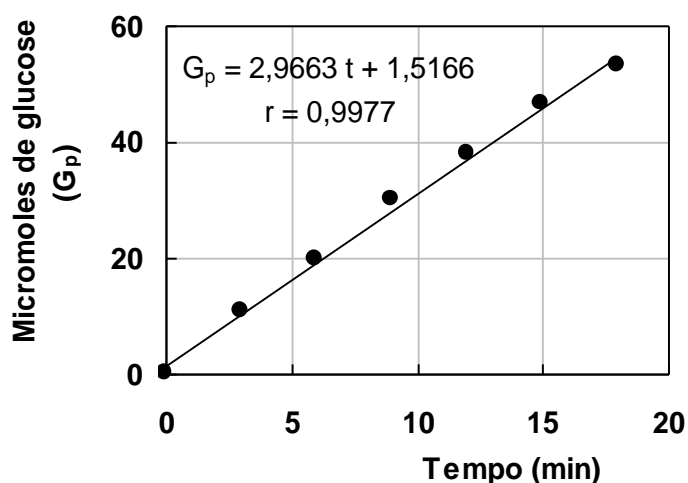


Figura 4.4 - Glucose produzida na ausência de benzoato de sódio. Celobiose na concentração de 2 g/L, pH 4,8. Temperatura de ensaio 50 °C. Concentração da enzima: 95 μ L/L.

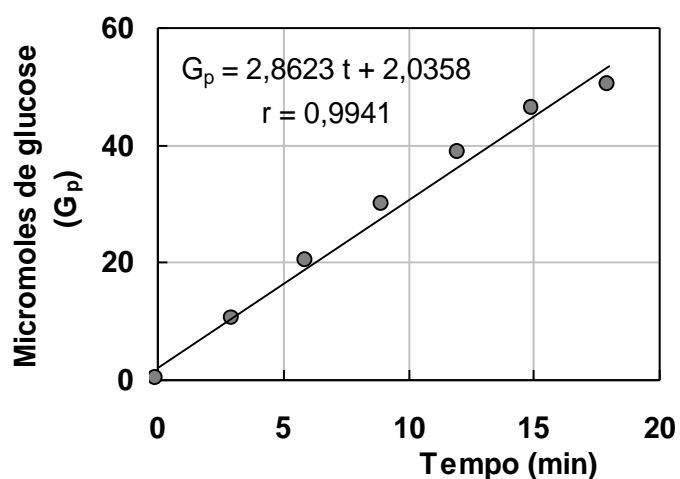


Figura 4.5 - Glucose produzida na presença de 1 g/L de benzoato de sódio. Celobiose na concentração de 2 g/L, pH 4,8. Temperatura de ensaio 50 °C. Concentração da enzima: 95 μ L/L.

4.2.3 Atividade em função do pH e da temperatura

Na Tabela 4.3 e Figura 4.6 apresenta-se a atividade específica da enzima em função do pH e da temperatura. Pode-se observar que a máxima atividade ocorreu na temperatura de 65°C para a faixa de pH 4,0 a 4,8. Nesta temperatura a máxima atividade específica foi encontrada em pH 4,5 atingindo o valor de 17,8 $\mu\text{moles}/\text{min}.\text{mg}$ proteína. A faixa de pH que apresentou a maior atividade foi de 4 a 4,8 notando-se um máximo no pH 4,5 para todas as temperaturas ensaiadas. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por DEKKER (1986) e WOODWARD et al. (1993), que determinaram para esta mesma enzima a temperatura de 65 °C e pH 4,5 como condições ótimas, utilizando celobiose como substrato (vide Tabelas 2.5 e 2.6). Os gráficos de glucose formada (μmoles de glucose) em função do tempo (min) para todas as temperaturas e valores de pH testados são apresentados no Anexo I.

Embora o pH ótimo observado tenha sido o pH 4,5, todos os demais experimentos foram realizados em pH 4,8 por ser esse o pH ótimo para a celulase, conforme diversos autores, como CAMINAL et al. (1984) e CANTARELLA et al. (1984), além do boletim informativo da NOVO (NOVO INDUSTRI, 1996) para a enzima celulase proveniente do microrganismo *Trichoderma viride*. Isto é importante pois na hidrólise da celulose as enzimas estarão atuando no mesmo meio reacional.

Tabela 4.3 - Atividade específica da celobiase em função do pH e da temperatura. Teor de proteína da enzima: 176,61 mg/mL da enzima original.

Temperatura (°C)	Atividade específica ($\mu\text{moles}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína)						
	pH						
	3,0	4,0	4,5	4,8	5,0	6,0	7,0
40	2,29	5,25	5,50	5,49	4,89	2,32	0,40
45	3,32	7,03	7,08	6,96	5,94	2,25	0,44
50	4,05	9,69	10,15	9,63	8,83	3,17	0,56
55	4,87	12,49	12,95	12,40	11,55	7,40	0,30
60	6,13	16,00	16,14	15,50	14,51	3,48	0,14
65	5,00	17,18	17,84	17,03	15,36	1,34	0,05
70	0,35	11,96	13,48	13,13	12,19	0,18	0,03
75	0,16	1,53	4,53	1,88	1,42	0,05	0,03

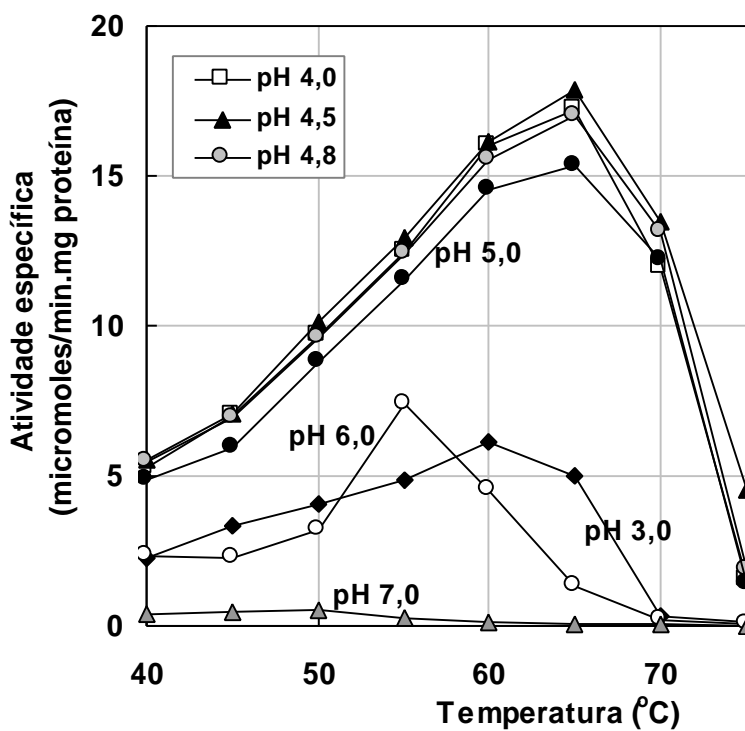
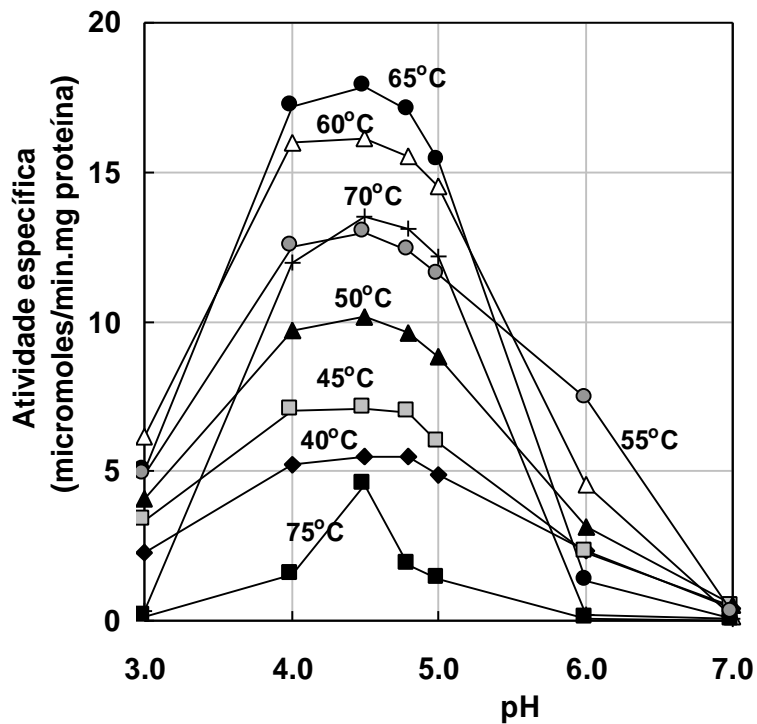


Figura 4.6 - Atividade específica em função do pH e da temperatura para a celobiase NOVOZYM 188 na concentração de 95 μ L/L em celobiose 2 g/L.

4.2.4 Energia de ativação da enzima na reação de hidrólise da celobiose

Com os dados de atividade em função da temperatura, apresentados na Tabela 4.3 foi possível determinar a energia de ativação da enzima para cada pH estudado, a partir da equação (2.1), onde substituiu-se a velocidade inicial de reação (v) pela atividade específica da enzima (A_e). Assim, num gráfico de $\ln v$ em função de $1/T$ (Figuras 4.7 e 4.8), o coeficiente angular da reta traçada na região linear (lado direito do gráfico), equivale a $(-E_a/R)$. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.4 e Figura 4.9. Na Figura 4.9 observa-se que, na faixa de pH de 4,0 a 5,0, a energia de ativação foi da ordem de 11 kcal/mol, concordando com valores encontrados na literatura para esta mesma enzima: 10 a 12,5 kcal/mol (BELTRAME et al., 1983; DEKKER, 1986) apresentados na Tabela 2.5. Nesta mesma faixa estão os valores encontrados por outros autores para celobiasas provenientes de outros microrganismos (MAGUIRE, 1977; SUNDSTROM et al., 1981; ALFANI et al., 1987), como pode ser constatado na Tabela 2.4. Para o pH 4,8 a velocidade de hidrólise (v) pode ser escrita na forma de Arrhenius (Equação 4.1):

$$v = 2,610 \cdot 10^8 \exp(-11\,005/RT), \quad r = 0,9985 \quad (4.1)$$

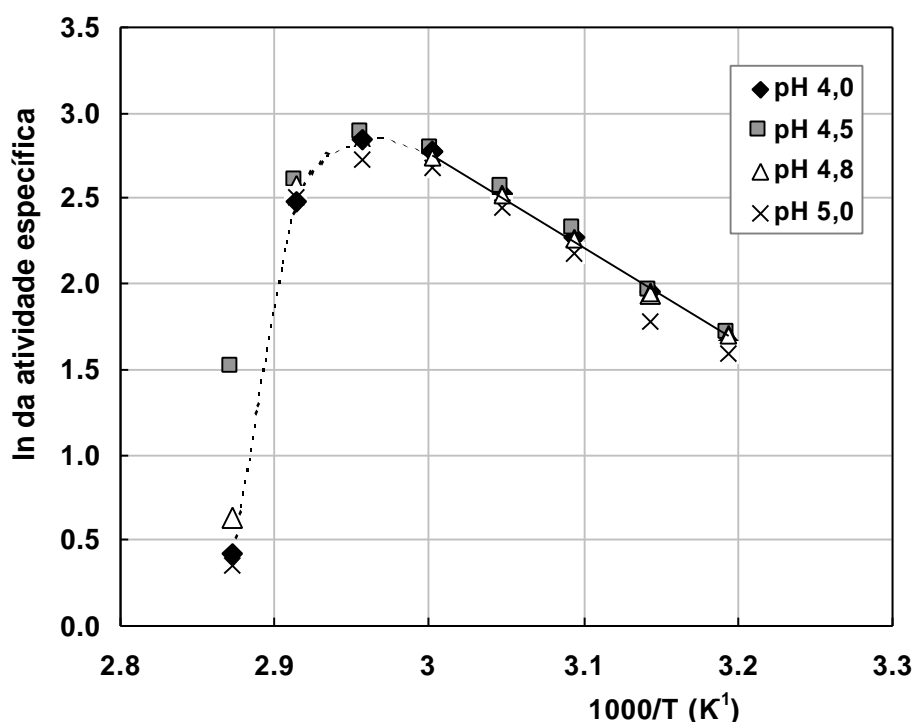


Figura 4.7 - Gráfico de Arrhenius para a celobiase na concentração de 95 $\mu\text{L/L}$, para celobiose 2 g/L nos valores de pH: 4,0 ; 4,5 ; 4,8 e 5,0.

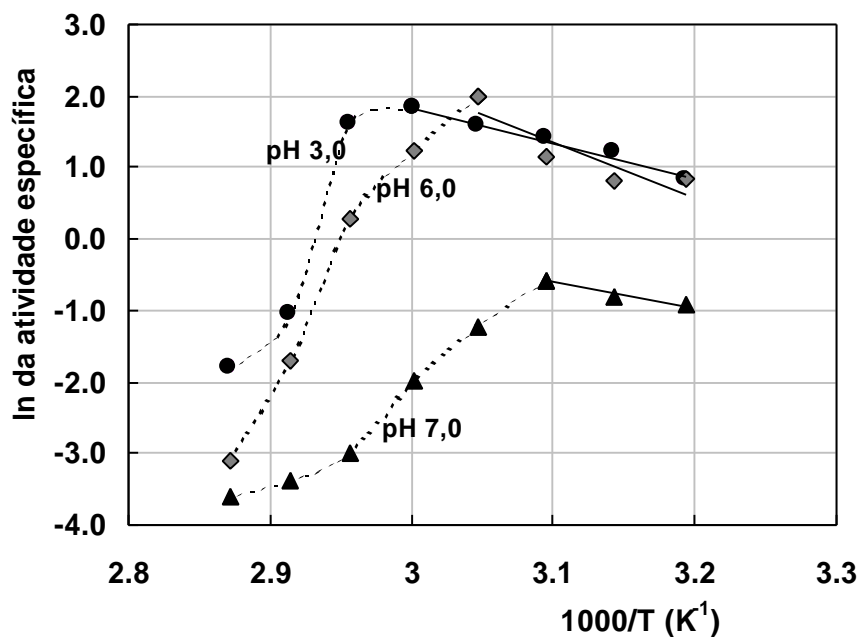


Figura 4.8 - Gráfico de Arrhenius para a celobiase na concentração de 95 $\mu\text{L/L}$, para celobiose 2 g/L nos valores de pH: 3,0 ; 6,0 e 7,0.

Tabela 4.4 - Valores de energia de ativação da reação enzimática para diferentes valores de pH calculados a partir dos coeficientes angulares das retas ajustadas para as curvas traçadas nas Figuras 4.7 e 4.8. A_e = atividade específica da enzima; A_r = constante de Arrhenius; E_a = energia de ativação da enzima.

pH	$A_e = A_r \exp(-E_a/RT)$	Energia de ativação (kcal/mol)
3,0	$A_e = 1,6273 \cdot 10^7 \exp(-9\ 782/RT)$, $r = 0,9917$	9,78
4,0	$A_e = 6,9610 \cdot 10^8 \exp(-11\ 633/RT)$, $r = 0,9993$	11,64
4,5	$A_e = 5,2663 \cdot 10^8 \exp(-11\ 435/RT)$, $r = 0,9972$	11,44
4,8	$A_e = 2,6099 \cdot 10^8 \exp(-11\ 005/RT)$, $r = 0,9985$	11,01
5,0	$A_e = 7,7471 \cdot 10^8 \exp(-11\ 766/RT)$, $r = 0,9948$	11,77
6,0	$A_e = 1,2245 \cdot 10^8 \exp(-15\ 495/RT)$, $r = 0,8830$	15,50
7,0	$A_e = 3,1634 \cdot 10^8 \exp(-7\ 037/RT)$, $r = 0,9806$	7,04

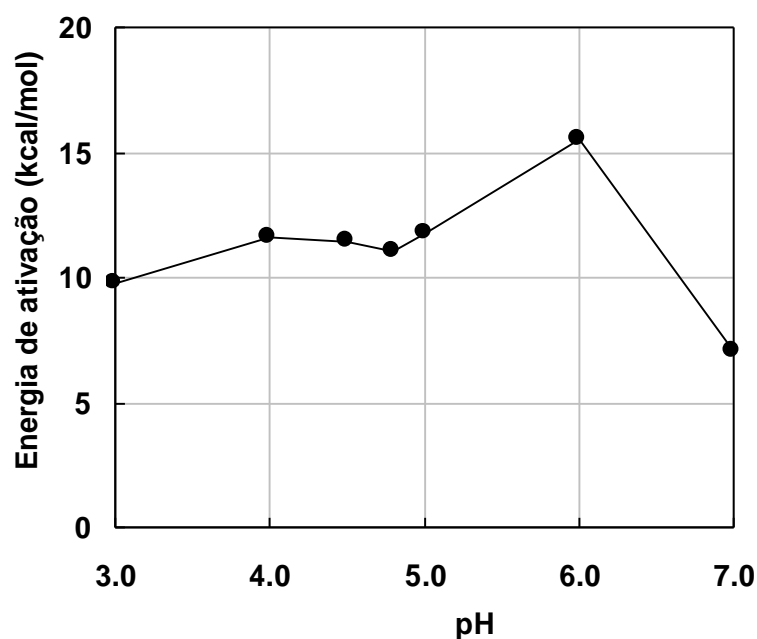


Figura 4.9 - Energia de ativação para a hidrólise enzimática da celobiose 2 g/L, 95 μ L de enzima / L de solução.

4.2.5 Estabilidade térmica da enzima celobiase

Os resultados experimentais do teste de estabilidade térmica são mostrados na Tabela 4.5 e Figura 4.10. Observa-se que a enzima, após 240 minutos de incubação, em solução de celobiose a 2g/L e pH 4,8, reteve 100% da atividade específica inicial para as temperaturas inferiores a 50°C, enquanto a 70°C foi quase completamente desativada em 40 minutos. A partir da análise das Figuras 4.6 e 4.10 nota-se que, apesar da enzima ter apresentado maior atividade a 65°C, sua desnaturação nesta temperatura é muito rápida, conservando apenas 26% da atividade específica inicial após 240 minutos de incubação.

Os gráficos obtidos para a glucose formada (μ moles glucose) em função do tempo (min) para cada temperatura na qual a enzima foi incubada e para os diferentes tempos de incubação, são apresentados no Anexo II.

Tabela 4.5 - Atividade específica em função do tempo, para a celobiase incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8. Teor de proteína da enzima: 176,6 g/L.

T (°C)	Atividade específica ($\mu\text{moles}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína)							Atividade residual após 240 min (%)
	Tempo de incubação da enzima (min)							
	0	40	80	120	160	200	240	
40	9,41	9,23	9,28	8,88	9,15	9,19	9,46	100
45	9,43	9,27	9,11	9,59	9,49	9,39	9,38	100
50	9,47	9,46	9,22	9,13	9,64	8,49	9,05	100
55	9,28	9,50	9,33	9,25	9,30	9,08	8,57	92
60	9,39	9,50	8,54	8,88	7,94	7,84	7,73	82
65	9,18	6,97	5,58	4,40	3,46	3,06	2,41	26
	Tempo de incubação da enzima (min)							
	0	5	10	15	20	30	40	
70	8,67	7,47	5,14	3,07	2,29	1,22	0,59	0

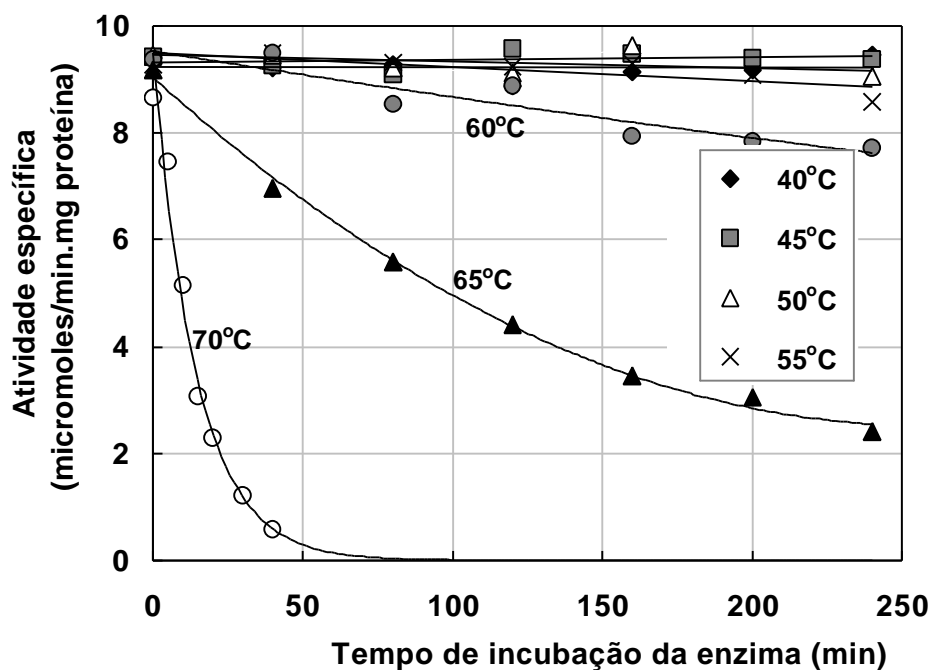


Figura 4.10 - Atividade enzimática residual para a celobiase 95 $\mu\text{L}/\text{L}$ incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8.

4.2.6 Energia de desnaturação térmica da enzima celobiase

Na Tabela 4.6 apresenta-se a evolução da atividade residual da celobiase em função do tempo de incubação, nas temperaturas em que ocorreu desnaturação térmica (55 a 70°C).

Tabela 4.6 - Evolução da atividade residual da celobiase em função do tempo de incubação em cada temperatura. Celobiose 2 g/L no pH 4,8.

T (°C)	A_{in}/A_{in}^0						
	Tempo de incubação da enzima (min)						
	0	40	80	120	160	200	240
55	1	1,0234	1,0054	0,9966	1,0025	0,9788	0,9241
60	1	1,0119	0,9094	0,9462	0,8462	0,8349	0,8235
65	1	0,7596	0,6077	0,4801	0,3769	0,3328	0,2628
	Tempo de incubação da enzima (min)						
	0	5	10	15	20	30	40
70	1	0,8614	0,5932	0,3541	0,2644	0,1401	0,0677

A partir dos dados de estabilidade térmica mostrados na Tabela 4.6 e das equações desenvolvidas no item 2.3.3.b determinou-se:

- a constante de desnaturação térmica experimental da enzima (K_d) para cada temperatura pela equação (2.6), construindo-se gráficos de $\ln(A_{in}/A_{in}^0)$ em função do tempo e escrevendo-se as equações de ajuste.
- o tempo de meia-vida experimental ($t_{1/2}$) para cada temperatura a partir da equação (2.7) aplicando-se os valores obtidos para K_d .
- a equação de ajuste para K_d utilizando-se a forma logarítmica da equação (2.4), a partir do gráfico de $\ln K_d$ em função de $1/T$ (Figura 4.11).
- os valores de K_d , ajustados pela equação mostrada na Figura 4.11.
- o tempo de meia-vida ajustado ($t_{1/2}$), obtido a partir dos valores de K_d ajustados aplicados na equação (2.7).

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.7 e Figura 4.11.

Tabela 4.7 - Coeficiente de desnaturação térmica (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da celobiase (95 $\mu\text{L/L}$) incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8.

T (°C)	Equação de ajuste $y = \ln(A_{in}/A_{in}^0)$ $t = \text{tempo (min)}$	Experimental		Ajustado	
		K_d (h^{-1}) Eq. (2.6)	$t_{1/2}$ (h) Eq. (2.7)	K_d (h^{-1}) Eq. (4.1)	$t_{1/2}$ (h) Eq. (2.7)
55	$y = -0,0003 t + 0,0238, r = 0,8348$	0,0180	38,51	0,0117	59,24
60	$y = -0,0008 t + 0,0158, r = 0,9773$	0,0480	14,44	0,0766	9,05
65	$y = -0,0055 t + 0,0452, r = 0,9969$	0,330	2,10	0,4735	1,46
70	$y = -0,0695 t + 0,0910, r = 0,9969$	4,170	0,17	2,7769	0,250

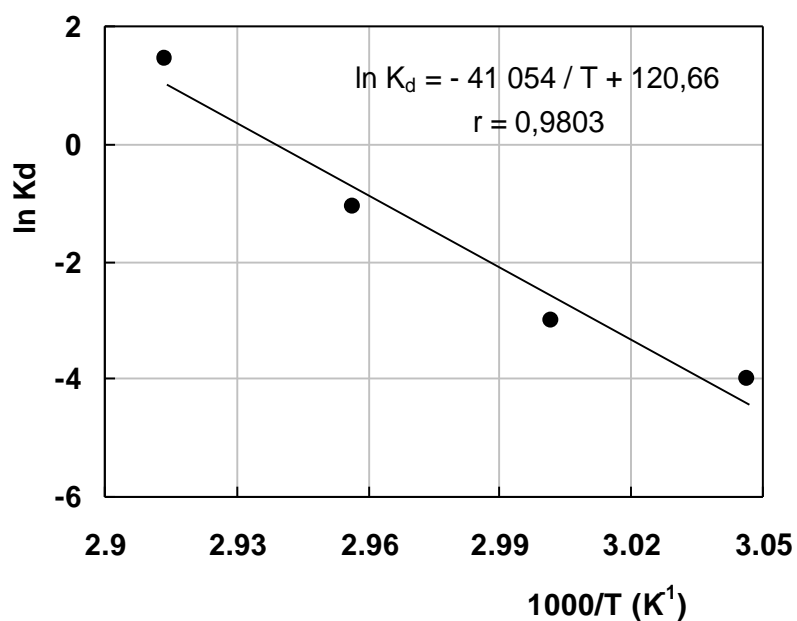


Figura 4.11 - Gráfico de Arrhenius para a energia de desnaturação térmica da celobiase 95 $\mu\text{L/L}$ incubada em celobiose 2 g/L no pH 4,8.

Ainda, foi possível determinar o fator exponencial (K_d^0) e a energia de desnaturação térmica da enzima (E_d), a partir da equação mostrada na Figura 4.11, que pode ser representada pela equação (4.2).

$$K_d = 2,5233 \cdot 10^{52} \cdot \exp(-81\,574,3/RT) \quad r = 0,9803 \quad (4.2)$$

O valor obtido para E_d (81,6 kcal/mol) demonstra que esta enzima é relativamente mais estável que a amiloglicosidase ($E_d = 50,6$ kcal/mol) e a invertase ($E_d = 64,9$ kcal/mol), conforme resultados obtidos, respectivamente por, ZANIN & MORAES (1998) e BASSETTI et al. (1997a).

Quanto aos tempos de meia-vida, BISSET & STERNBERG (1978), obtiveram para a celobiase proveniente do *Aspergillus phoenicis* QM 329, valores iguais a: 216 h (55°C), 8,6 h (60°C), 30 min (65°C) e 2,4 min (70°C) utilizando como substrato celobiose 7,5 mM e tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Portanto, pode-se notar ao comparar os resultados destes pesquisadores com os tempos de meia-vida experimentais obtidos neste trabalho (Tabela 4.7) que a celobiase NOVOZYM 188, para temperaturas maiores ou iguais a 60°C, é mais termoestável do que a oriunda do *Aspergillus phoenicis* QM 329.

4.2.7 Modelo cinético para a hidrólise enzimática da celobiose

Como apresentado no item 2.5, ainda não há uma concordância, entre os vários autores, sobre o tipo de inibição exercida pela celobiose (geralmente do tipo acompetitivo) e pela glucose (competitivo e não-competitivo).

Neste trabalho, propõe-se que a hidrólise da celobiose pela enzima celobiase pode apresentar inibição pelo substrato do tipo acompetitivo e não-competitivo, combinadas com inibição do tipo competitivo, não-competitivo e acompetitivo pelo produto, como indicado pelo esquema geral mostrado na Figura 4.12. A equação geral para a velocidade de reação foi obtida pela hipótese do equilíbrio rápido (apresentada em linhas gerais no item 2.4.1, SEGEL (1979)), empregando as definições das constantes de equilíbrio mostradas na Figura 4.12.

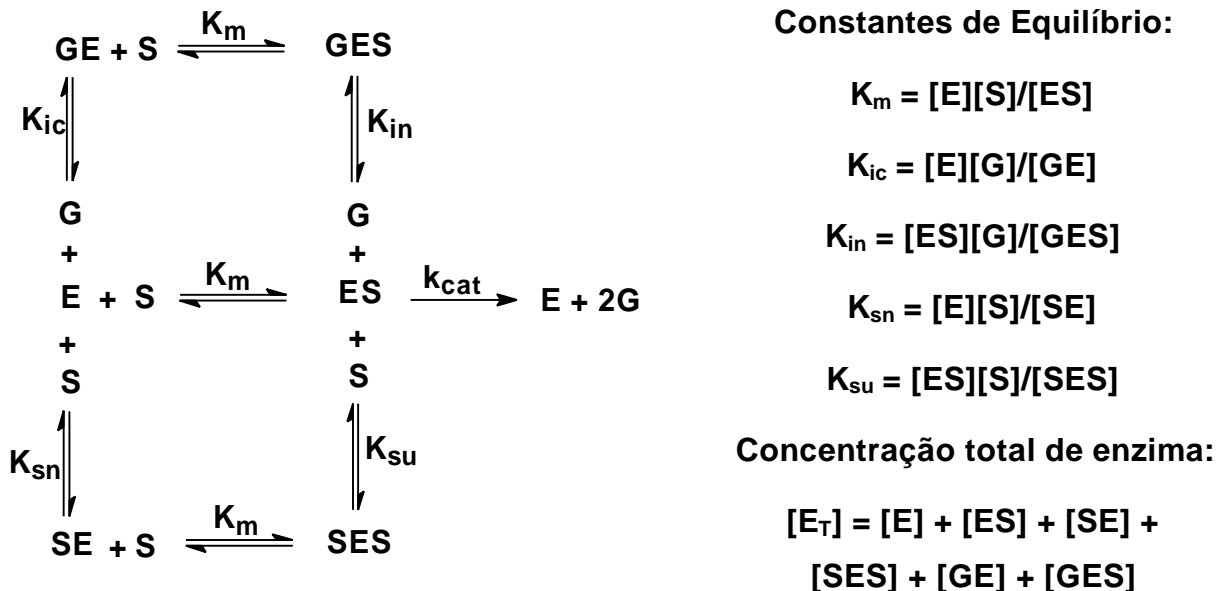
Para o esquema geral de reação representado na Figura 4.12 a expressão para a velocidade de formação do produto (glucose = G) é a mostrada pela equação (4.3).

$$V = -dS/dt = (1/2) dG/dt = (1/2) (2 k_{cat} [ES]) = k_{cat} [ES] \quad (4.3)$$

Dividindo o lado esquerdo da equação (4.3) pela concentração total de enzima $[E_T]$, e o lado direito pela soma das formas de enzima presentes no meio reacional (Figura 4.12), e ainda substituindo as concentrações das formas enzimáticas utilizando as constantes de equilíbrio definidas na Figura 4.12, obtém-se a equação geral para a velocidade de reação, equação (4.4).

$$V = \frac{SV_{\max}}{S \left(1 + \frac{G}{K_{in}} \right) + K_m \left(1 + \frac{S}{K_{sn}} + \frac{G}{K_{ic}} \right) + \frac{S^2}{K_{su}}} \quad (4.4)$$

onde $V_{\max} = k_{cat} [E_T]$ e as outras constantes são definidas na Figura 4.12.



$$[GE] = [E][G]/K_{ic}; \quad [GES] = [ES][G]/K_{in}; \quad [SE] = [E][S]/K_{sn}; \quad [SES] = [ES][S]/K_{su}$$

Figura 4.12 - Esquema geral para a hidrólise da celobiose. E = enzima livre; ES = complexo produtivo enzima-substrato; G = glucose (produto); GE = complexo enzima-glucose; GES = complexo glucose-enzima-substrato; K_m = constante de dissociação para o complexo ES; K_{ic} = constante de dissociação para o complexo GE; K_{in} = constante de dissociação para o complexo GES; K_{sn} = constante de dissociação para o complexo SE; K_{su} = constante de dissociação para o complexo SES; S = concentração de substrato (celobiose), SE = complexo enzima-substrato não-produtivo; SES = complexo não produtivo substrato-enzima-substrato.

Na Tabela 4.8 apresentam-se as várias formas simplificadas da equação (4.4), na qual as constantes cinéticas assumem valores diferentes em função do modelo cinético utilizado, acompetitivo ou não-competitivo para o substrato, e competitivo, não-competitivo ou acompetitivo para o produto.

Tabela 4.8 - Equações de velocidade de reação para vários modelos cinéticos com diferentes tipos de inibição. Equações simplificadas da equação geral (4.4).

Tipo de inibição		Constante de inibição					Equação para a velocidade de reação
Substrato	Produto	K_m	K_{ic}	K_{in}	K_{sn}	K_{su}	
Acompetitivo	$G \rightarrow 0$, Velocidade inicial	K_m	∞	∞	∞	K_s	$V = (S V_{max}) / (S + K_m + S^2 / K_s)$
	Competitivo	K_m	K_i	∞	∞	K_s	$V = (S V_{max}) / [S + (1 + G / K_i) K_m + S^2 / K_s]$
	Não-competitivo	K_m	K_i	K_i	∞	K_s	$V = (S V_{max}) / [S + (1 + G / K_i) K_m + S G / K_i + S^2 / K_s]$
	Acompetitivo	K_m	∞	K_i	∞	K_s	$V = (S V_{max}) / [S(1 + G / K_i) + K_m + S^2 / K_s]$
Não-competitivo	$G \rightarrow 0$, Velocidade inicial	K_m	∞	∞	K_s	K_s	$V = (S V_{max}) / [S + K_m(1 + S / K_s) + S^2 / K_s]$
	Competitivo	K_m	K_i	∞	K_s	K_s	$V = (S V_{max}) / [S + (1 + S / K_s + G / K_i) K_m + S^2 / K_s]$
	Não-competitivo	K_m	K_i	K_i	K_s	K_s	$V = (S V_{max}) / [S(1 + G / K_i) + (1 + S / K_s + G / K_i) K_m + S^2 / K_s]$
	Acompetitivo	K_m	∞	K_i	K_s	K_s	$V = (S V_{max}) / [S(1 + G / K_i) + K_m(1 + S / K_s) + S^2 / K_s]$
Sem inibição	Sem inibição	K_m	∞	∞	∞	∞	$V = (S V_{max}) / (S + K_m)$

4.2.8 Influência da concentração inicial de substrato e cálculo das constantes cinéticas K_m , V_{max} e K_s

Para estudar o efeito da concentração de celobiose sobre a velocidade de hidrólise enzimática na temperatura de 50°C e pH 4,8 utilizou-se os ensaios descritos no item 3.2.4.e. Plotando-se os valores experimentais de velocidade de reação em função da concentração de celobiose apresentados na Tabela 4.9, pode-se observar na Figura 4.13, que ocorre inibição pelo substrato para concentrações de celobiose superiores a 10 mM (3,42 g/L).

Como os ensaios foram realizados aplicando-se o método das velocidades iniciais, e nesta situação a concentração de produto (glucose) é muito pequena ($G \rightarrow 0$), a equação (4.4) reduz-se aos dois casos de inibição pelo substrato com $G \rightarrow 0$ mostrados na Tabela 4.8. A equação para a velocidade de reação pode ser reescrita para assumir a forma de uma parábola, equações (4.5) e (4.6):

- Inibição incompetitiva pelo substrato com $G \rightarrow 0$:

$$S / V = (K_m / V_{max}) + (1 / V_{max}) S + (1 / K_s V_{max}) S^2 \quad (4.5)$$

- Inibição não-competitiva pelo substrato com $G \rightarrow 0$:

$$S / V = (K_m / V_{max}) + (1 / V_{max}) (1 + K_m / K_s) S + [1 / (K_s V_{max})] S^2 \quad (4.6)$$

Com a equação $S/V = 1221,3 S^2 + 66,283 S + 0,1604$, $r = 0,9999$, obtida a partir do gráfico de concentração molar de substrato dividida pela velocidade molar de reação (S/V) em função da concentração molar de substrato (S), mostrado na Figura 4.14, foi possível calcular os parâmetros: constante de Michaelis-Menten (K_m), constante de inibição pelo substrato (K_s) e velocidade máxima de reação (V_{max}) para os dois tipos de inibição pelo substrato, representados pelas equações (4.5) e (4.6). Observe-se que a equação (4.5) é a mesma equação (2.3.1), que é a equação de Haldane (DIXON & WEBB, 1979). Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos são mostrados na Tabela 4.10, onde são comparados aos valores encontrados por outros autores.

Na Tabela 4.10 pode-se, ainda, notar que os valores de K_m , K_s e V_{max} , são muito próximos independente do tipo de inibição pelo substrato: incompetitiva ou não-competitiva.

Na Figura 4.13 apresenta-se o ajuste dos pontos experimentais pelas equações (4.5) e (4.6), bem como pelo modelo de Michaelis-Menten (sem inibição). A equação de Michaelis-Menten (2.21) foi aplicada na região de velocidade crescente dos pontos experimentais (0,4 a 3,6 g/L) obtendo-se a equação $S/V = 74,044 S + 0,169$, $r = 0,9985$,

que gerou a curva ajustada na Figura 4.13. Os pontos ajustados são mostrados na Tabela 4.9. Comparando-se as duas curvas obtidas observa-se que na concentração de celobiose de 20 g/L (58,5 mM) a redução da velocidade da reação devida à inibição pelo substrato é da ordem de 45% da velocidade inicial sem inibição.

Os gráficos obtidos para a glucose formada (g/L) em função do tempo (min) para cada uma das concentrações iniciais de substrato mostradas na Tabela 4.9 são apresentados no Anexo III.

Tabela 4.9 - Velocidade inicial de reação (V) em função da concentração de substrato. Condições de reação: pH 4,8 , 50°C, 95 µL de enzima/L solução.

Concentração de substrato (g/L)	Concentração molar de substrato (S) (mol/L)	Velocidade molar de reação (V) (mol/Lh)	S / V (h)	V Ajustada pela equação obtida na Figura 4.14 (mol/Lh)	V Ajustada pela equação de Michaelis-Menten (mol/Lh)
0,0	0,0000	0,0000	-	0	0
0,4	0,0012	0,0045	0,2580	0,0049	0,0046
0,8	0,0023	0,0069	0,3390	0,0073	0,0068
1,2	0,0035	0,0082	0,4297	0,0086	0,0082
1,6	0,0047	0,0088	0,5296	0,0094	0,0091
2,0	0,0058	0,0096	0,6071	0,0099	0,0097
2,4	0,0070	0,0106	0,6620	0,0102	0,0102
2,8	0,0082	0,0108	0,7604	0,0104	0,0106
3,2	0,0093	0,0108	0,8691	0,0105	0,0109
3,6	0,0105	0,0110	0,9599	0,0106	0,0111
4,0	0,0117	0,0108	1,0796	0,0106	0,0113
5,0	0,0146	0,0107	1,3621	0,0105	0,0117
6,0	0,0175	0,0106	1,6551	0,0103	0,0119
7,0	0,0204	0,0100	2,0400	0,0101	0,0121
8,0	0,0234	0,0096	2,4282	0,0098	0,0123
12,0	0,0351	0,0088	3,9722	0,0088	0,0127
16,0	0,0467	0,0078	5,9980	0,0079	0,0129
20,0	0,0584	0,0072	8,1600	0,0071	0,0130

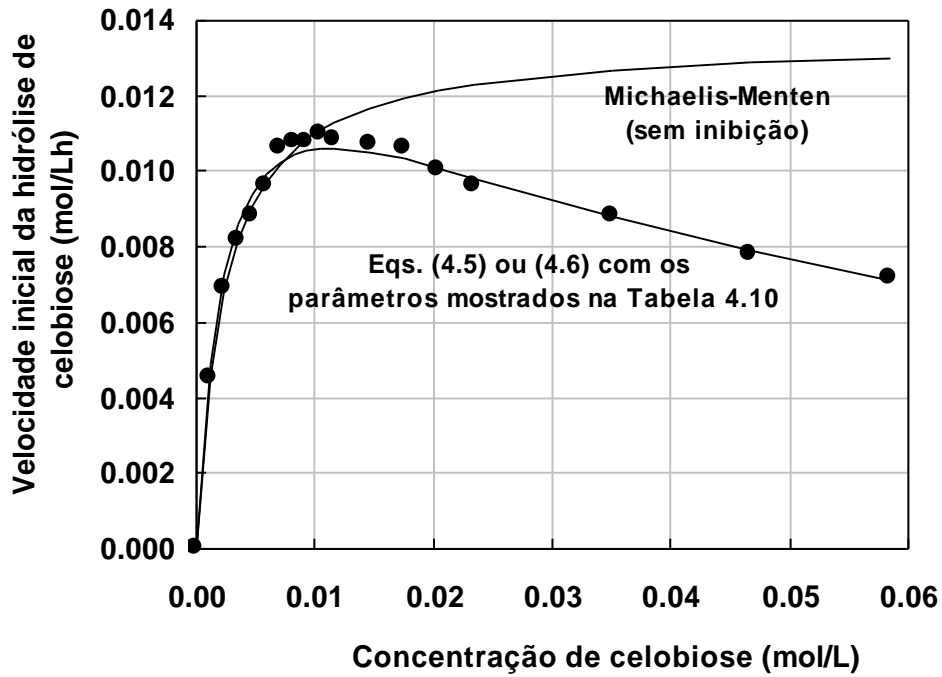


Figura 4.13 - Velocidade inicial da reação em função da concentração de celobiose. Condições de reação: 50°C, pH 4,8, 95 μ L de enzima/L de substrato.

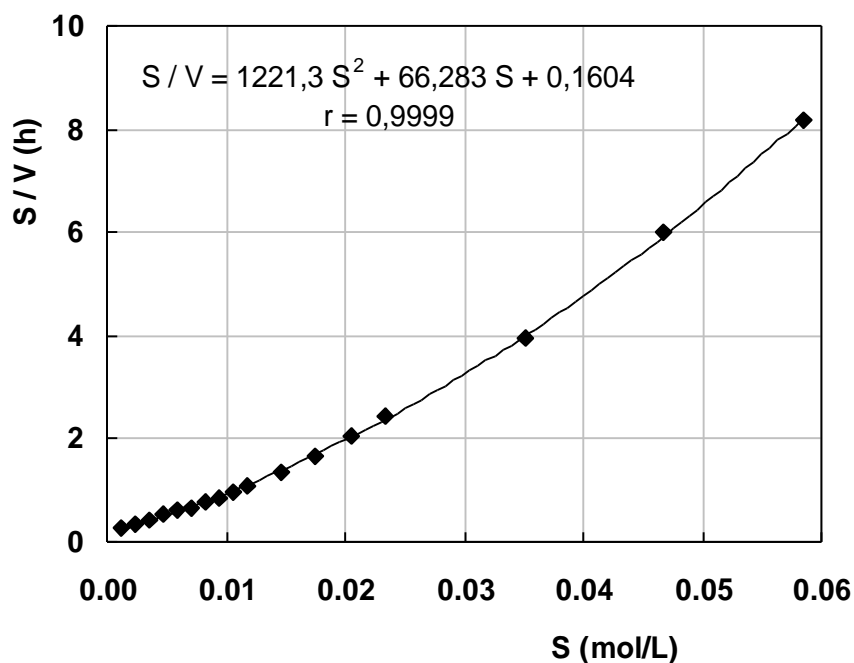


Figura 4.14 - Ajuste parabólico de S/V em função de S para a obtenção dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e K_s , onde S é a concentração molar de substrato e V é a velocidade inicial molar de reação.

Tabela 4.10 - Parâmetros cinéticos para a hidrólise da celobiose.

Autor		K_m (mM)	V_{max} mmol glucose / (min. mg de proteína)	K_s (mM)
Este trabalho (50 °C, pH 4,8)	Substrato acompetitivo	2,4	16,3	54,2
	Substrato não- competitivo	2,5	17,1	51,7
BELTRAME et al. (1983)		2,7	1,7	43
DEKKER (1986)		5,63	33,74	-
GROUS et al. (1985)		1,66	-	43,4

4.2.9 Conversão de celobiose em glucose em função do tempo com modelagem da cinética em reator batelada

Na Tabela 4.11 e Figura 4.15 apresentam-se os resultados experimentais dos testes de conversão de celobiose em glucose em função do tempo, de acordo com a metodologia descrita na seção 3.2.4.f, para as temperaturas de 40 e 50 °C.

Tabela 4.11 - Conversão enzimática de celobiose em glucose (X_A) em reator batelada a 40°C e 50°C, pH 4,8, celobiase 95 $\mu\text{L/L}$. Substrato: **A** = celobiose 2 g/L, **B** = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L, **C** = celobiose 20 g/L.

Tempo (h)	Substrato A		Substrato B		Substrato C			
	X_A		X_A		40°C		50°C	
	40°C	50°C	40°C	50°C	Tempo (h)	X_A	Tempo (h)	X_A
0,00	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00	0,0000	0,00	0,00
0,05	0,0234	0,0394	...	0,0151	0,17	0,0042	0,08	0,0047
0,10	0,0439	0,0772	0,0303	0,0341	0,33	0,0076	0,17	0,0085
0,15	0,0651	0,1151	0,0492	0,0454	0,50	0,0114	0,25	0,0131
0,20	0,0832	0,1552	0,0719	0,0568	0,67	0,0158	0,33	0,0176
0,25	0,1067	0,1931	0,0605	0,1173	1,00	0,0235	0,42	0,0231
0,30	0,1271	0,2317	0,0681	0,1363	1,50	0,0340	0,50	0,0280
0,35	0,1490	0,2665	0,0832	0,1855	2,00	0,0450	0,58	0,3260
0,40	0,1732	0,3044	0,0946	0,1779	2,50	0,0570	0,67	0,0370
0,45	0,1884	0,3370	0,0946	0,2006	3,00	0,0735	0,75	0,0418
0,50	0,2073	0,3718	0,0983	0,2120	3,50	0,0853	0,83	0,0474
0,58	0,2381	0,4185	0,1592	0,2623	4,00	0,0947	0,92	0,0517
0,67	0,2668	0,4594	...	0,3046	4,50	0,1077	1,00	0,0580
0,75	0,3046	0,5033	0,1697	0,3523	5,00	0,1204	1,50	0,0854
0,83	0,3334	0,5382	0,2015	0,3682	6,00	0,1444	2,00	0,1103
0,92	0,3697	0,5821	0,2121	0,3841	7,00	0,1699	2,50	0,1360
1,00	0,3878	0,6078	0,2545	0,4265	8,00	0,1962	3,00	0,1639
1,50	0,5134	0,7623	0,3233	0,5590	9,00	0,2135	3,50	0,1844
2,00	0,6163	0,8502	0,4080	0,7286	10,00	0,2408	4,00	0,2074
2,50	0,7192	0,9150	0,5086	0,7339	11,00	0,2615	4,50	0,2310
3,00	0,7857	0,9469	0,5616	0,8081	12,00	0,2802	5,00	0,2540
3,50	0,6955	0,9809	0,6304	0,8982	13,00	0,3059	6,00	0,3017
4,00	0,8861	0,9809	0,6569	0,9088	15,00	0,3244	7,00	0,3380
4,50	0,9043	1,0014	0,7204	0,9194	16,00	0,3437	8,00	0,3771
5,00	0,9269	1,0059	0,7416	0,9565	17,00	0,3607	9,00	0,4243

continua...

Tabela 4.11 - Conversão enzimática de celobiose em glucose (X_A) em reator batelada a 40 e 50°C, pH 4,8, celobiase 95 $\mu\text{L/L}$. Substrato: **A** = celobiose 2 g/L, **B** = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L, **C** = celobiose 20 g/L (continuação).

Tempo (h)	Substrato A		Substrato B		Substrato C			
	X_A		X_A		40°C		50°C	
	40°C	50°C	40°C	50°C	Tempo (h)	X_A	Tempo (h)	X_A
6,00	0,9746	1,0241	0,8263	0,9406	18,00	0,3800	10,00	0,4669
7,00	0,9859	0,9991	0,8740	0,9671	19,00	0,3959	11,00	0,4886
8,00	1,0177	1,0082	0,8687	0,9830	20,50	0,4164	12,00	0,5188
9,00	1,0200	0,9968	0,9111	1,0148	21,00	0,4323	13,00	0,5521
10,00	1,0109	0,9787	0,9375	0,9989	22,00	0,4437	15,00	0,5678
11,00	1,0086	0,9900	0,9217	0,9724	23,00	0,4596	16,00	0,5859
12,00	1,0154	1,0105	0,9693	0,9777	24,00	0,4720	17,00	0,6064
13,00	1,0132	1,0014	0,9746	0,9883	25,00	0,4834	18,00	0,6245
14,00	1,0064	1,0191	0,9428	0,9944	30,00	0,5391	20,00	0,6608
15,00	1,0158	1,0229	0,9520	0,9793	35,00	0,6591	21,00	0,6858
16,00	1,0233	1,0342	0,9671	1,0247	47,25	0,7738	22,00	0,7062
17,00	1,0422	1,0342	0,9974	1,0398	49,00	0,7662	24,00	0,7130
18,00	1,0384	1,0456	...	1,0626	50,00	0,7700	25,00	0,7448
19,00	1,0158	1,0115	0,9974	1,0247	53,00	0,7927	26,00	0,7630
20,50	1,0158	1,0039	0,9671	0,9944	55,50	0,8003	28,00	0,7675
21,00	1,0195	1,0304	1,0125	1,0398	60,50	0,8343	31,00	0,7948
22,00	1,0384	1,0039	0,9822	0,9944	71,50	0,8646	32,00	0,8034
23,00	1,0158	1,0153	0,9369	1,0096	73,50	0,8949	33,00	0,8185
24,00	1,0460	1,0380	0,9898	1,0247	74,25	0,8987	34,00	0,8223
25,00	1,0195	1,0077	1,0276	0,9869	78,50	0,9101	40,00	0,8563
30,00	1,0422	...	0,9747	...	96,00	0,9404	47,00	0,8942
...	97,00	0,9404	48,00	0,8866
...	98,00	0,9366	49,00	0,9244
...	101,00	0,9404	50,00	0,9282
...	51,00	0,9017
...	52,00	0,9055
...	52,50	0,9017
...	55,50	0,9093
...	56,50	0,9169
...	57,50	0,9207
...	73,00	0,9207

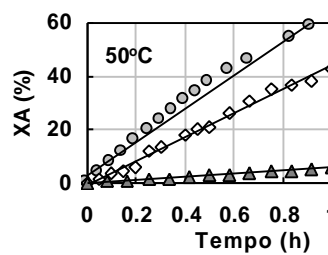
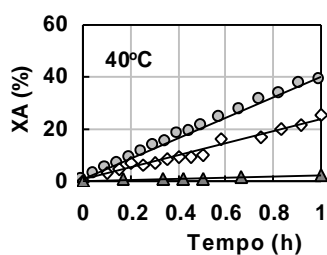
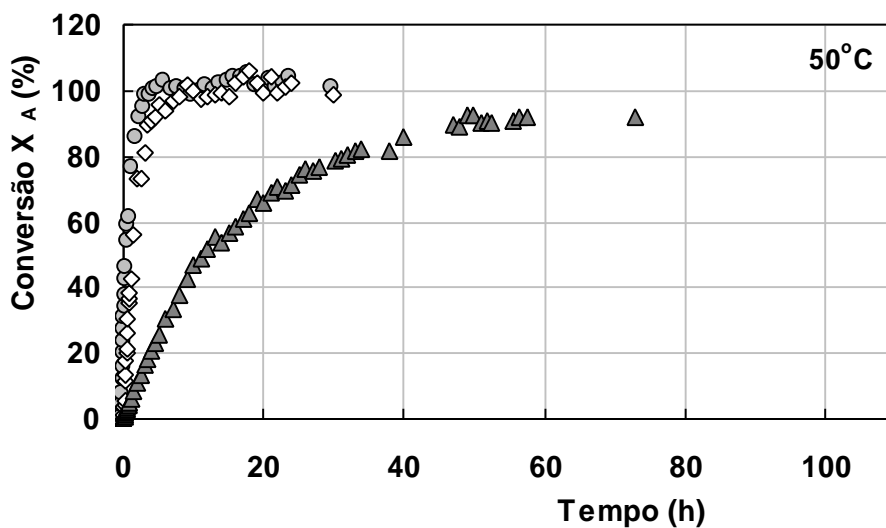
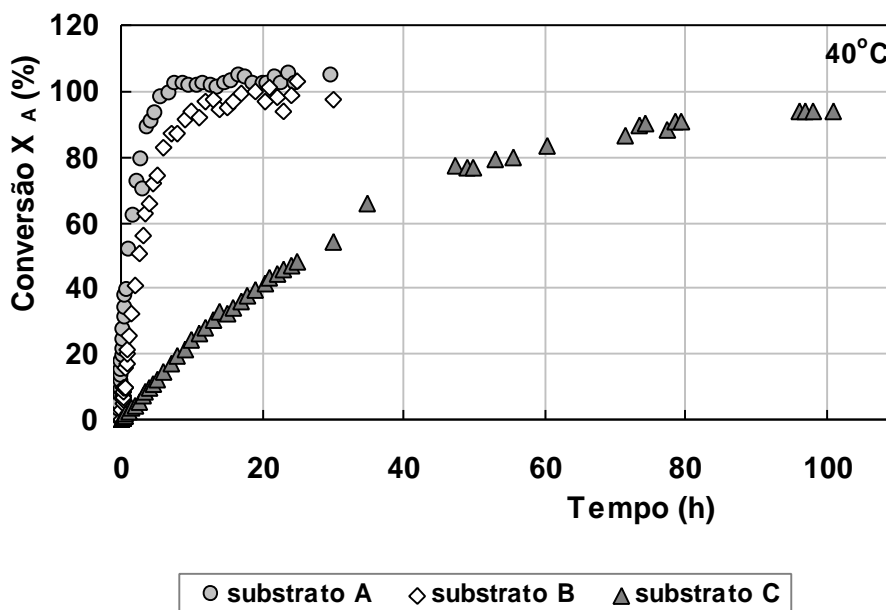


Figura 4.15 - Conversão enzimática de celobiose em glucose a 40 e 50°C, pH 4,8, celobiase 95 μL/L. Substrato: **A** = celobiose 2 g/L, **B** = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L, **C** = celobiose 20 g/L.

Na Figura 4.15 observa-se que durante o tempo em que a hidrólise foi acompanhada não se constatou reversibilidade na reação de formação do produto (glucose), o que teria sido indicado por um platô de conversão abaixo de 100% para longos tempos de reação.

Observando-se as Figuras 4.16 e 4.17 constata-se que não ocorreu desnaturação térmica da enzima durante o teste de conversão em função do tempo nas temperaturas de 40 e 50°C, para a concentração de 2 g/L de celobiose pelo tempo de 24 horas, nem para a concentração de 20 g/L de celobiose pelo tempo de 100 horas a 40 °C e 73 horas a 50°C. A metodologia para a realização deste experimento foi descrita no item 3.2.4.g.

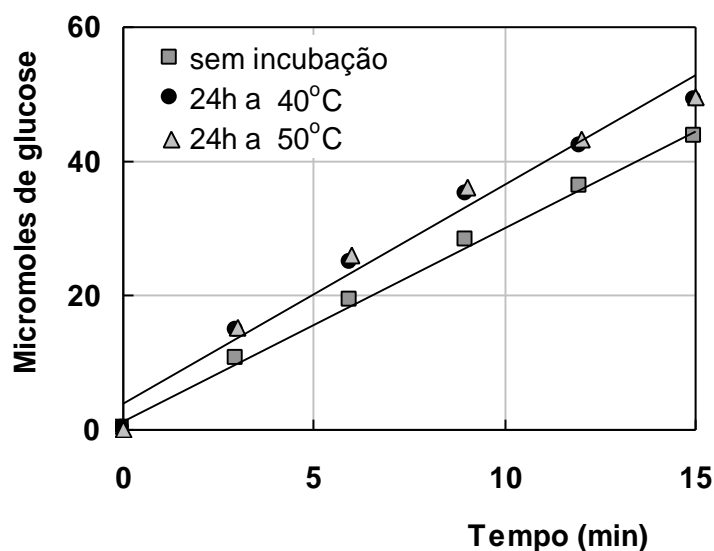


Figura 4.16 - Teste de atividade da enzima após a incubação em celobiose 2 g/L a 40 e 50°C pelo tempo de 24 horas e para a enzima sem incubação. Os testes de atividade residual foram conduzidos a 50°C e pH 4,8 em celobiose 2 g/L e celobiase 95µL/L

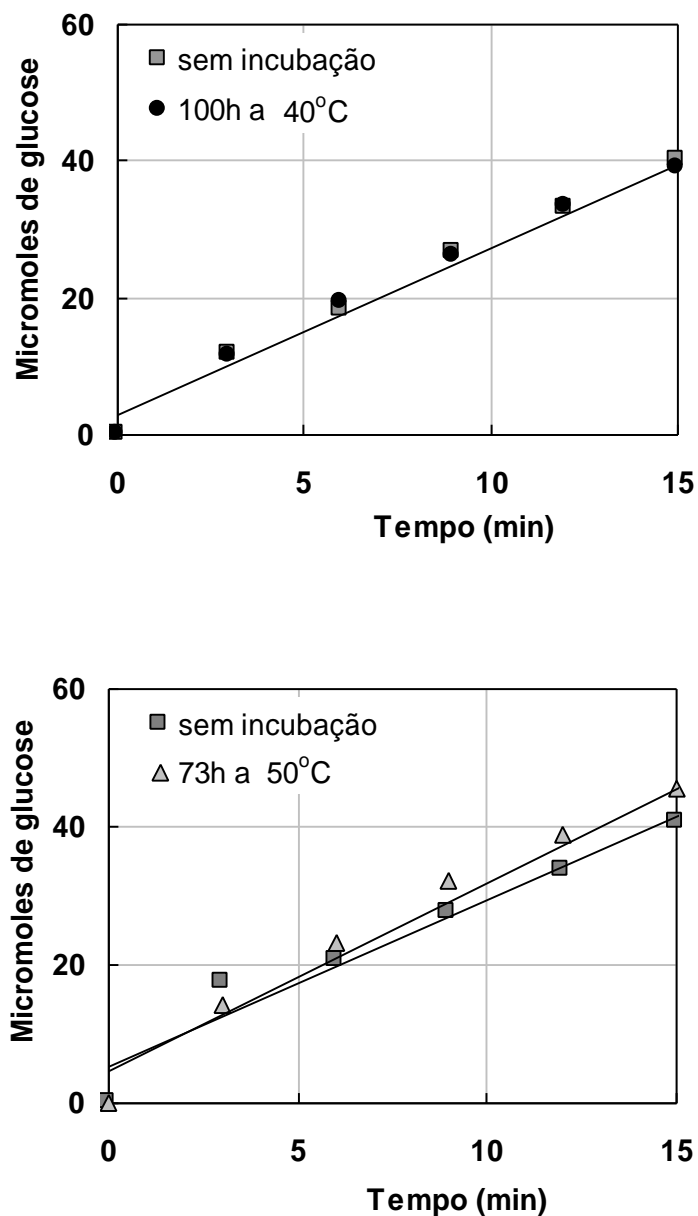


Figura 4.17 - Teste de atividade da celobiase após a incubação em celobiose 20 g/L a 40°C pelo tempo de 100 horas, a 50°C pelo tempo de 73 horas e para a enzima sem incubação. Os testes de atividade residual foram conduzidos a 50°C e pH 4,8 em celobiose 2 g/L e celobiase 95µL/L.

Nas Tabelas 4.12 e 4.13 são apresentados os pontos experimentais empregados na análise dos resultados da reação de hidrólise da celobiose pela enzima celobiase, sendo que estes pontos foram selecionados da Tabela 4.11, até o instante em que a máxima conversão foi atingida para cada um dos substratos. Estes dados são mostrados nas Figuras 4.18 e 4.19.

Tabela 4.12 - Valores de conversão em função do tempo utilizados na modelagem da cinética de hidrólise da celobiose pela celobiase. Substrato: **A** = celobiose 2 g/L, **B** = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L.

Substrato A				Substrato B			
40°C		50°C		40°C		50°C	
Tempo (h)	X _A	Tempo (h)	X _A	Tempo (h)	X _A	Tempo (h)	X _A
0,000	0,0000	0,000	0,0000	0,000	0,0000	0,000	0,0000
0,050	0,0234	0,050	0,0394	0,100	0,0303	0,050	0,0151
0,100	0,0439	0,100	0,0772	0,150	0,0492	0,100	0,0341
0,150	0,0651	0,150	0,1151	0,200	0,0719	0,150	0,0454
0,200	0,0832	0,200	0,1552	0,250	0,0605	0,200	0,0568
0,250	0,1067	0,250	0,1931	0,300	0,0681	0,250	0,1173
0,300	0,1271	0,300	0,2317	0,350	0,0832	0,300	0,1363
0,350	0,1490	0,350	0,2665	0,450	0,0946	0,400	0,1779
0,400	0,1732	0,400	0,3044	0,500	0,0983	0,450	0,2006
0,450	0,1884	0,450	0,3370	0,583	0,1592	0,500	0,2120
0,500	0,2073	0,500	0,3718	0,750	0,1697	0,583	0,2623
0,583	0,2381	0,583	0,4185	0,833	0,2015	0,667	0,3046
0,667	0,2668	0,667	0,4594	0,917	0,2121	0,750	0,3523
0,750	0,3046	0,750	0,5033	1,000	0,2545	0,833	0,3682
0,833	0,3334	0,833	0,5381	1,500	0,3233	0,917	0,3841
0,917	0,3697	0,917	0,5821	2,000	0,4080	1,000	0,4265
1,000	0,3878	1,000	0,6078	2,500	0,5086	1,500	0,5590
1,500	0,5134	1,500	0,7623	3,000	0,5616	2,000	0,7286
2,000	0,6163	2,000	0,8501	3,500	0,6304	2,500	0,7339
2,500	0,7192	2,500	0,9150	4,000	0,6569	3,000	0,8081
3,000	0,7857	3,000	0,9468	4,500	0,7204	3,500	0,8982
4,000	0,8861	3,500	0,9809	5,000	0,7416	4,000	0,9088
4,500	0,9043	6,000	0,8263	4,500	0,9194
5,000	0,9269	8,000	0,8687	5,000	0,9565
6,000	0,9746	9,000	0,9111	6,000	0,9406
7,000	0,9859	10,000	0,9375	7,000	0,9671
...	11,000	0,9217	8,000	0,9830
...	12,000	0,9693	10,000	0,9989
...	13,000	0,9746

Tabela 4.13 - Valores de conversão em função do tempo utilizados na modelagem da cinética de hidrólise da celobiose pela celobiase. Substrato: **C** = celobiose 20 g/L.

40°C				50°C			
Tempo (h)	X _A	Tempo (h)	X _A	Tempo (h)	X _A	Tempo (h)	X _A
0,000	0,0000	18,000	0,3800	0,000	0,0000	10,000	0,4669
0,167	0,0042	19,000	0,3959	0,083	0,0047	11,000	0,4886
0,333	0,0076	20,500	0,4164	0,167	0,0085	12,000	0,5188
0,500	0,0114	21,000	0,4323	0,250	0,0131	13,000	0,5521
0,667	0,0158	22,000	0,4437	0,333	0,0176	15,000	0,5678
1,000	0,0235	23,000	0,4596	0,417	0,0231	16,000	0,5859
1,500	0,0340	24,000	0,4720	0,500	0,0280	17,000	0,6064
2,000	0,0450	25,000	0,4834	0,583	0,0326	18,000	0,6245
2,500	0,0570	30,000	0,5391	0,667	0,0370	20,000	0,6608
3,000	0,0735	35,000	0,6591	0,750	0,0418	21,000	0,6858
3,500	0,0853	47,250	0,7738	0,833	0,0474	22,000	0,7062
4,000	0,0947	49,000	0,7662	0,917	0,0517	24,000	0,7130
4,500	0,1077	50,000	0,7700	1,000	0,0580	25,000	0,7448
5,000	0,1204	53,000	0,7927	1,500	0,0854	26,000	0,7630
6,000	0,1444	55,500	0,8003	2,000	0,1103	28,000	0,7675
7,000	0,1699	60,500	0,8343	2,500	0,1360	30,250	0,7879
8,000	0,1962	71,500	0,8646	3,000	0,1639	31,000	0,7948
9,000	0,2135	73,500	0,8949	3,500	0,1844	32,000	0,8034
10,000	0,2408	74,250	0,8987	4,000	0,2074	33,000	0,8185
11,000	0,2615	78,500	0,9101	4,500	0,2310	34,000	0,8223
12,000	0,2802	96,000	0,9404	5,000	0,2540	40,000	0,8563
13,000	0,3059	6,000	0,3017	47,000	0,8942
15,000	0,3244	7,000	0,3380	49,000	0,9244
16,000	0,3437	8,000	0,3771	50,000	0,9282
17,000	0,3607	9,000	0,4243

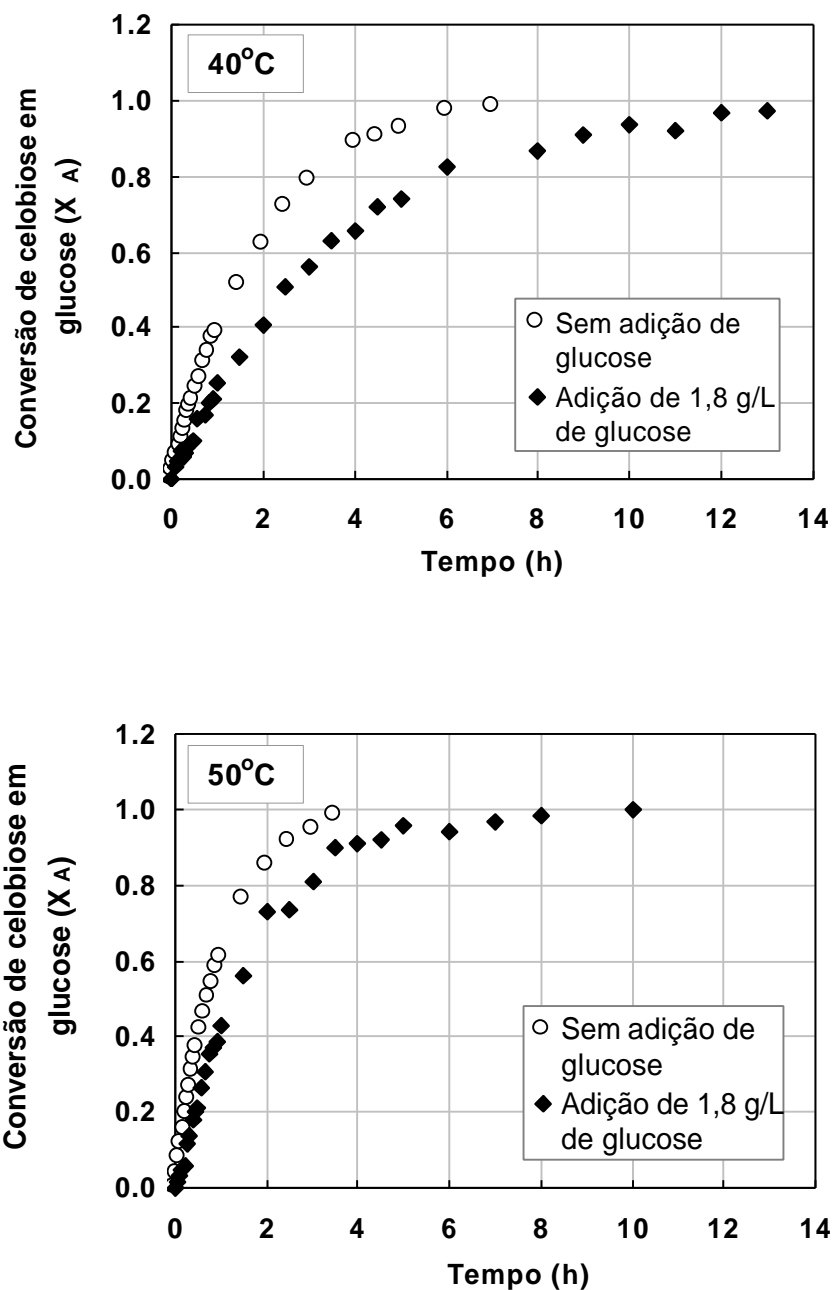


Figura 4.18 - Conversão enzimática da celobiose em glucose, em reator batelada nas seguintes condições: 2 g/L de celobiose, 95 μ L de celobiase Novozym 188, 40 e 50°C, pH 4,8, sem adição de glucose (o) e com adição de 1,8 g/L de glucose (10 mM) (\blacklozenge).

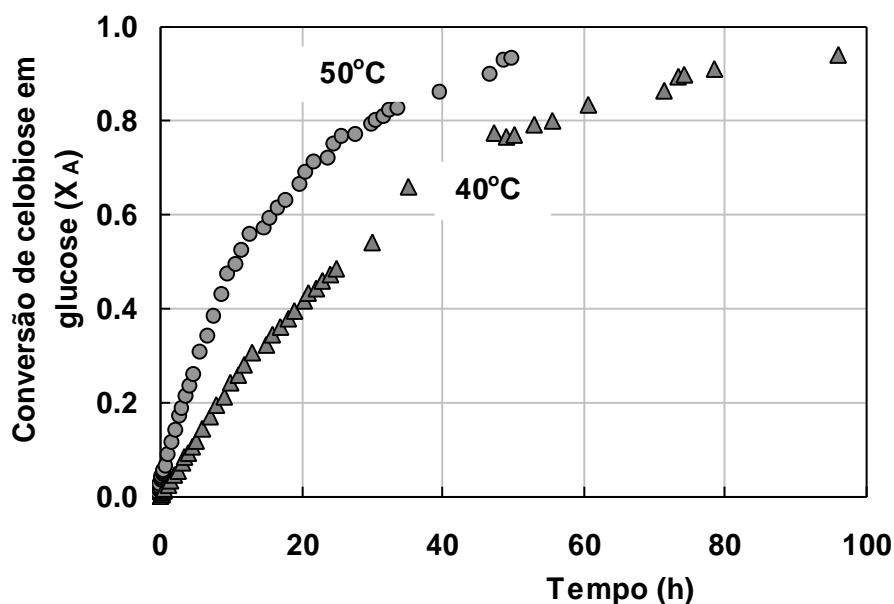


Figura 4.19 - Conversão enzimática da celobiose em glucose, em reator batelada nas seguintes condições: 20 g/L de celobiose, 95 μ L de celobiase Novozym 188, 40 e 50°C, pH 4,8, sem adição de glucose.

A observação da Tabela 4.12 e da Figura 4.18 mostra que a adição de glucose no substrato, desde o início da reação, reduz a velocidade de hidrólise, conduzindo a maiores tempos de reação para se atingir altas conversões. Por exemplo, a 40°C, sem adição de glucose foram necessárias 6 horas para se atingir 98% de conversão de celobiose em glucose, enquanto com a adição do produto (glucose 10 mM) este tempo foi da ordem de 12 horas. A 50°C, o mesmo efeito foi observado, porém neste caso os tempos foram menores: 4 e 8 horas, respectivamente, sem glucose e com glucose adicionada.

Na Tabela 4.13 e Figura 4.19, que reúnem os resultados para a condição de reação com 20 g/L (58,4 mM) de celobiose pH 4,8 (alta concentração de substrato), em duas temperaturas (40 e 50°C), observa-se o efeito da inibição pelo substrato, uma vez que 92% de conversão de celobiose em glucose somente foram alcançados após 80 horas a 40°C, e 50 horas a 50°C. Efeito semelhante foi observado por GONG et al. (1977) quando utilizaram a enzima celobiase de *Trichoderma viride*, a 50°C e pH 4,75.

4.3 MODELAGEM DA CINÉTICA DE HIDRÓLISE

O efeito inibidor da glucose, ou da alta concentração de celobiose na reação de hidrólise da celobiose com a enzima celobiase, é um fator importante, que deve ser levado em conta no projeto de processos. Neste sentido, é importante dispor-se de uma equação que permita o cálculo do tempo de reação para se atingir uma determinada conversão de celobiose em glucose.

Para a obtenção da equação cinética integrada, foram assumidas as seguintes hipóteses:

- a reação de hidrólise foi realizada num reator batelada, isotérmico, com volume constante, onde a equação da velocidade de reação é da forma apresentada na equação (4.3):

$$V = - dS/dt \quad (4.3)$$

- a concentração de substrato (S) em função da conversão de celobiose em glucose (X_A) foi escrita por:

$$S = S_0 (1 - X_A) \quad (4.7)$$

- a concentração de inibidor (G), no caso a glucose, é obtida a partir da estequiometria da reação de hidrólise (Figura 4.12):

$$G = G_i + 2S_0 X_A \quad (4.8)$$

- os efeitos de transferência de calor não foram incluídos no modelo, pelo fato das reações enzimáticas serem praticamente isotérmicas (KENT et al., 1978).
- uma vez que não foi observada a reversibilidade da reação de glucose em celobiose, este fenômeno não foi incluído no modelo.
- como as constantes cinéticas K_m , V_{max} e K_s foram determinadas a 50°C, os modelos cinéticos foram obtidos para esta condição.
- substituindo-se a equação (4.7) na equação (4.3), obtém-se:

$$V = S_0 dX_A / dt \quad (4.9)$$

A substituição das equações (4.4) e (4.8) na equação (4.9), após as simplificações, resulta na equação (4.10), que relaciona a conversão (X_A) com a concentração inicial de substrato (S_0) e de produto (G_i), bem como com os parâmetros cinéticos.

$$dX_A / dt = [V_{max} (1 - X_A)] / \{S_0 (1 - X_A) [1 + (G_i + 2 S_0 X_A) / K_{in}] + K_m [1 + S_0 (1 - X_A) / K_{sn} + (G_i + 2 S_0 X_A) / K_{ic}] + S_0^2 (1 - X_A)^2 / K_{su}\} \quad (4.10)$$

Integrando a equação (4.10), com tempo t variando de zero a t , e conversão X_A variando de zero a X_A :

$$V_{\max} \cdot t = S_0 X_A + S_0 G_i X_A / K_{in} + 2 S_0^2 X_A^2 / 2 K_{in} + K_m \{-\ln(1 - X_A) + S_0 X_A / K_{sn} - [G_i \ln(1 - X_A)] / K_{ic} + 2 S_0 / K_{ic} [-X_A - \ln(1 - X_A)]\} + S_0^2 X_A / K_{su} - S_0^2 X_A^2 / 2 K_{su} \quad (4.10a)$$

Obtém-se a expressão geral, que permite calcular o tempo de reação para se atingir uma determinada conversão de celobiose em glucose, quando são conhecidos os parâmetros cinéticos (equação 4.11).

$$t = \{(S_0 / V_{\max}) [1 + G_i / K_{in} + K_m / K_{sn} + S_0 / K_{su} - 2 K_m / K_{ic}]\} X_A - \{(K_m / V_{\max}) [1 + G_i / K_{ic} + 2 S_0 / K_{ic}]\} \ln(1 - X_A) - \{(S_0^2 / V_{\max}) [1 / 2 K_{su} - 1 / K_{in}]\} X_A^2 \quad (4.11)$$

onde:

C_0^* - concentração inicial de celobiose (g/L)

C_{ga} - concentração de glucose adicionada na solução (mol/L)

C_{gc} - concentração de glucose proveniente de contaminação da celobiose com glucose (mol/L)

C_{gc}^* - concentração de glucose proveniente de contaminação da celobiose com glucose (g/L)

G_i - concentração inicial de glucose (mol/L) = $C_{gc} + C_{ga}$

S_0 - concentração inicial real de celobiose (mol/L), descontada a glucose contaminante = $(C_0^* - C_{gc}^*) / 342$

A equação (4.11) pode ser reescrita numa forma mais compacta, onde são agrupadas as constantes cinéticas em parâmetros α , β e γ . Dessa forma obtém-se:

$$t = \alpha X_A - \beta \ln(1 - X_A) - \gamma X_A^2 \quad (4.12)$$

onde:

$$\alpha = (S_0 / V_{\max}) [1 + G_i / K_{in} + K_m / K_{sn} + S_0 / K_{su} - 2 K_m / K_{ic}] \quad (4.13)$$

$$\beta = (K_m / V_{\max}) [1 + G_i / K_{ic} + 2 S_0 / K_{ic}] \quad (4.14)$$

$$\gamma = (S_0^2 / V_{\max}) [1 / 2 K_{su} - 1 / K_{in}] \quad (4.15)$$

$$X_A = \frac{1}{2} (G - G_i) / S_0 \quad (4.16)$$

A integração das equações de velocidade de reação apresentadas na Tabela 4.8, ou a simplificação dos parâmetros α , β e γ como definidos pelas equações (4.13) a (4.15) com os valores das constantes cinéticas indicadas na Tabela 4.8, permite que se obtenha uma equação integrada para cada modelo cinético assumido, onde a forma da equação é sempre como a da equação (4.12) e os parâmetros α , β e γ assumem expressões diferentes como mostrado na Tabela 4.14, equações (4.17) a (4.42).

Tabela 4.14 - Equações para os parâmetros α , β e γ da equação (4.12), para vários modelos cinéticos.

Tipo de inibição		α	β	γ
Substrato	Produto			
Acompetitivo	$G \rightarrow 0$	$(S_0 / V_{max}) [1 + S_0 / K_s]$ (4.17)	(K_m / V_{max}) (4.18)	$S_0^2 / (2 V_{max} K_s)$ (4.19)
	Competitivo	$(S_0 / V_{max}) [1 + S_0 / K_s - 2 K_m / K_i]$ (4.20)	$(K_m / V_{max}) [1 + G_i / K_i + 2 S_0 / K_i]$ (4.21)	$(S_0^2 / (2 V_{max} K_s))$ (4.22)
	Não-competitivo	$(S_0 / V_{max}) [1 + G_i / K_i + S_0 / K_s - 2 K_m / K_i]$ (4.23)	$(K_m / V_{max}) [1 + G_i / K_i + 2 S_0 / K_i]$ (4.24)	$(S_0^2 / V_{max}) [1/2 K_s - 1 / K_i]$ (4.25)
Não-competitivo	Acompetitivo	$(S_0 / V_{max}) [1 + G_i / K_i + S_0 / K_s]$ (4.26)	(K_m / V_{max}) (4.27)	$(S_0^2 / V_{max}) [1/2 K_s - 1 / K_i]$ (4.28)
	$G \rightarrow 0$	$(S_0 / V_{max}) [1 + K_m / K_s + S_0 / K_s]$ (4.29)	(K_m / V_{max}) (4.30)	$S_0^2 / (2 V_{max} K_s)$ (4.31)
	Competitivo	$(S_0 / V_{max}) [1 + K_m / K_s + S_0 / K_s - 2 K_m / K_i]$ (4.32)	$(K_m / V_{max}) [1 + G_i / K_i + 2 S_0 / K_i]$ (4.33)	$[S_0^2 / (2 V_{max} K_s)]$ (4.34)
Sem inibição	Não-competitivo	$(S_0 / V_{max}) [1 + G_i / K_i + K_m / K_s + S_0 / K_s - 2 K_m / K_i]$ (4.35)	$(K_m / V_{max}) [1 + G_i / K_i + 2 S_0 / K_i]$ (4.36)	$(S_0^2 / V_{max}) [1/2 K_s - 1 / K_i]$ (4.37)
	Acompetitivo	$(S_0 / V_{max}) [1 + G_i / K_i + K_m / K_s + S_0 / K_{su}]$ (4.38)	(K_m / V_{max}) (4.39)	$(S_0^2 / V_{max}) [1/2 K_s - 1 / K_i]$ (4.40)
	Sem inibição	(S_0 / V_{max}) (4.41)	(K_m / V_{max}) (4.42)	-

Expressões integradas da forma como a representada pela equação (4.12) têm sido utilizadas por diversos pesquisadores, tanto para calcular as constantes cinéticas (K_m , V_{max} , K_s , e K_i) em condições de reação, como para ajustar os dados de conversão em função do tempo em reatores batelada e contínuos (leito fixo e fluidizado). Esses modelos têm sido aplicados para as enzimas lactase (CHARLES et al., 1974); amiloglicosidase (CARDOSO, 1977; CABRAL et al., 1984; ZANIN et al., 1994; ZANIN & MORAES, 1996); e invertase (BASSETTI et al., 1997b).

A partir dos resultados obtidos nos testes de conversão em função do tempo, para a temperatura de 50°C, apresentados nas Tabelas 4.12 e 4.13 e representados nas Figuras 4.18 e 4.19, empregando-se o ajuste não-linear disponível no programa Statistica[®] (Statsoft Inc.), foi possível obter os valores dos parâmetros α , β e γ (equação 4.12) para cada condição experimental utilizada neste trabalho. Estes ajustes são mostrados nas Figuras 4.20 e 4.21, e as equações na Tabela 4.15.

Com os valores de α , β e γ e dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e K_s (Tabela 4.10) foi possível calcular os parâmetros cinéticos K_i e k_{cat} apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4.15 - Equações obtidas pelo ajuste dos pontos experimentais de tempo (t) em função da conversão de celobiose em glucose (X_A) com a equação (4.12), para a temperatura de 50°C. Substrato: **A** = celobiose 2 g/L, **B** = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L, **C** = celobiose 20 g/L.

Substrato	Equação ajustada	
	$t = \alpha X_A - \beta \ln(1-X_A) - \gamma X_A^2$ (Eq. 4.12)	
A	$t = 0,2181 X_A - 0,6696 \ln(1-X_A) - 0,7528 X_A^2$,	$r = 0,9988$
B	$t = -0,2779 X_A - 1,3146 \ln(1-X_A) + 1,9159 X_A^2$,	$r = 0,9877$
C	$t = -6,9089 X_A - 18,9913 \ln(1-X_A) + 9,3466 X_A^2$,	$r = 0,9984$

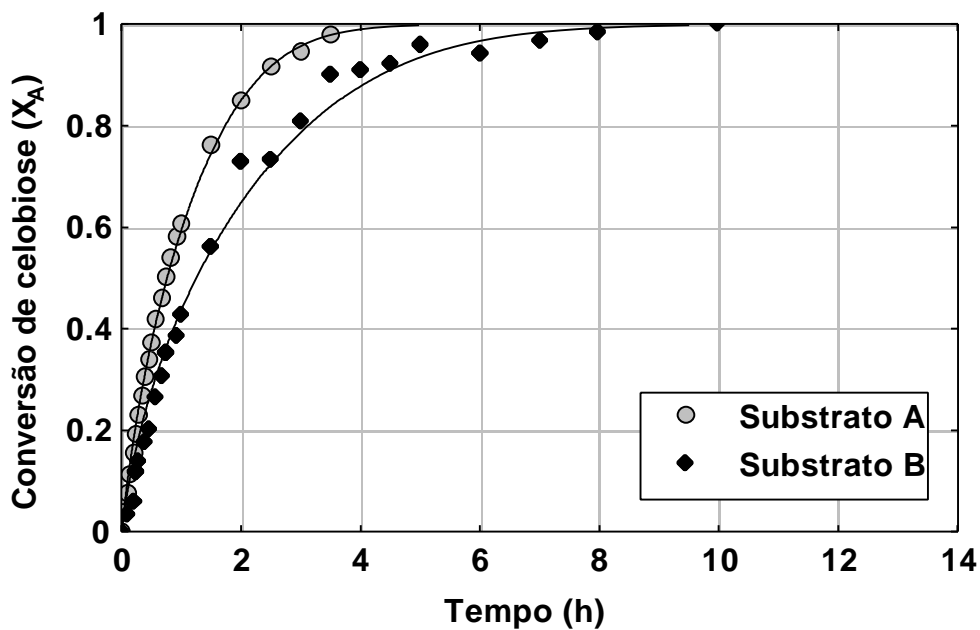


Figura 4.20 - Conversão enzimática de celobiose em glucose em reator batelada nas seguintes condições: 95 $\mu\text{L/L}$ de celobiase, 50°C, pH 4,8; Substrato: **A** = celobiose 2 g/L, **B** = celobiose 2 g/L + glucose 1,8 g/L.

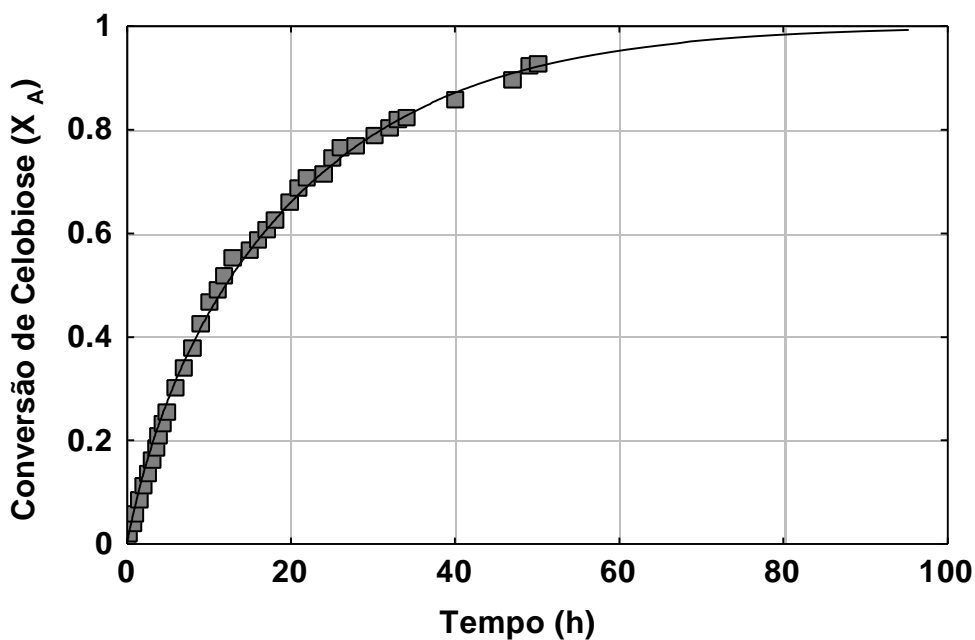


Figura 4.21 - Conversão enzimática de celobiose em glucose em reator batelada nas seguintes condições: 20 g/L de celobiose, 95 $\mu\text{L/L}$ de celobiase, 50°C, pH 4,8, sem adição de glucose no início da reação.

Tabela 4.16 - Valores das constantes cinéticas, obtidas pelo modelo cinético integrado, aplicado aos dados de conversão em função do tempo, Figuras 4.20 e 4.21 (Temperatura 50°C, pH 4,8).

(S ₀) (mM)	G _i (mM)	α (h)	β (h)	γ (h)	K _i (mM)	K _i (mM)	k _{cat} (mmol/h mL enz.)	K _i (mM)	K _i (mM)	k _{cat} (mmol/h mL enz.)	K _i (mM)	K _i (mM)	k _{cat} (mmol/h mL enz.)
Substrato acompetitivo													
					(Eq.4.20)	(Eq.4.21)	(Eq.4.22)	(Eq.4.23)	(Eq.4.24)	(Eq.4.25)	(Eq.4.26)	(Eq.4.28)	(Eq.4.27)
5.84	0.0239	0.2181	0.6696	-0.7528	8.83	3.64	-4.39	8.78	3.64	126.4	-0.044	2.92	37.7
5.84	10.48	-0.2779	1.3146	-1.9159	2.63	3.05	-1.73	-3.11	3.05	59.6	-5.74	1.17	19.2
58.4	0.1478	-6.9089	18.9913	-9.3466	1.24	0.99	-35.4	1.20	0.99	3 836	-0.038	19.8	1.33
Substrato não-competitivo													
					(Eq.4.32)	(Eq.4.33)	(Eq.4.34)	(Eq.4.35)	(Eq.4.36)	(Eq.4.37)	(Eq.4.38)	(Eq.4.40)	(Eq.4.39)
5.84	0.0239	0.2181	0.6696	-0.7528	8.88	3.70	-4.60	8.86	3.70	124.0	-0.042	2.79	39.9
5.84	10.48	-0.2779	1.3146	-1.9159	2.65	3.08	-1.81	-2.82	3.08	58.9	-5.47	1.11	20.3
58.4	0.1478	-6.9089	18.9913	-9.3466	1.25	1.00	-37.1	1.22	1.00	3 797	-0.037	18.9	1.41

A observação das curvas ajustadas mostradas nas Figuras 4.20 e 4.21 e Tabela 4.15 indica um bom ajuste aos dados experimentais, porém a análise da Tabela 4.16 indica resultados não satisfatórios para os valores das constantes cinéticas, obtidas pelas diferentes equações de α , β e γ .

Pode-se notar na Tabela 4.16 que não há muita coerência entre os valores obtidos para a constante K_i calculada a partir dos coeficientes α , β ou γ . Também os valores de k_{cat} resultantes dos parâmetros β ou γ diferem daqueles obtidos a partir de $V_{max} / E_T = 158,6$ mmol glucose/h.mL enzima para a inibição acompetitiva pelo substrato, e 166,3 mmol glucose/h.mL enzima para inibição não-competitiva pelo substrato. Outra inconsistência do modelo é o valor negativo obtido para alguns valores de K_i e k_{cat} , uma vez que estas constantes não podem ser negativas. Inconsistência física semelhante foi obtida para a hidrólise do amido (ZANIN, 1989; CARDOSO, 1977) e suspeitava-se que a origem do problema estava na grande complexidade da reação de hidrólise do amido, a qual envolve uma cinética multi-substrato.

Entretanto, no caso da celobiose, a reação aparenta ser razoavelmente simples: um único substrato e um único produto, moléculas de baixo peso molecular, a enzima é bastante estável, e no entanto o mesmo tipo de inconsistência física apareceu quando o modelo cinético integrado foi ajustado aos dados experimentais de conversão para tempos de reação desde zero até próximos de 100% de conversão.

Parece que as hipóteses usadas na obtenção dos modelos cinéticos mostrados na Tabela 4.8, não são suficientes para descrever o curso total da cinética deste tipo de reação de zero a 100% de conversão. Ou estas hipóteses perdem a validade a altas conversões ou novas hipóteses têm que ser acrescentadas, como por exemplo, as diferentes combinações de concentração de substrato e produto podem ter um efeito complexo de inibição ou ativação da enzima (BELTRAME et al., 1983).

Assim, para o propósito de modelar satisfatoriamente a hidrólise da celobiose para toda a extensão da reação, e com vistas a uma potencial aplicação industrial, novos estudos fundamentais devem ser direcionados na investigação do fenômeno que invalida a aplicação do presente modelo na sua forma integrada.

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo apresentam-se as principais conclusões obtidas na caracterização da enzima celobiase NOVOZYM 188, por meio dos ensaios descritos no capítulo 3 e com base nos resultados apresentados no capítulo 4:

O conservante benzoato de sódio, utilizado na concentração de 1g/L, não causou nenhuma interferência na atividade enzimática.

A temperatura de máxima atividade da enzima para a faixa de pH de 4 a 4,8 foi 65°C, atingindo o valor de 17,8 μ moles/min.mg de proteína para o pH 4,5.

Para todas as temperaturas estudadas (40 a 75 °C) a enzima apresentou atividade máxima na faixa de pH de 4 a 5.

A energia de ativação da enzima é da ordem de 11,0 kcal/mol para a faixa de pH de 4 a 5.

A velocidade da reação de hidrólise da celobiose 2 g/L, pH 4,8 pode ser calculada, para a faixa de temperatura de 40 a 75°C, pela equação (4.1): $v = 2,6099 \cdot 10^8 \exp(-11\,005/RT)$, $r = 0,9985$.

A enzima mostrou-se muito estável para temperaturas até 50°C. Para temperaturas mais altas a desnaturação da enzima segue razoavelmente o modelo de decaimento exponencial: $K_d = 2,5233 \cdot 10^{52} \cdot \exp(-81\,574,3/RT)$, $r = 0,9803$.

A enzima apresentou inibição pelo substrato para concentrações de celobiose acima de 10 mM (3,42 g/L). Na concentração de celobiose de 20 g/L (58,5 mM) o desvio entre a velocidade da reação com inibição pelo substrato e a que seria obtida se não houvesse inibição é da ordem de 45%.

Nos testes de conversão de celobiose em glucose, até aproximadamente 100% não foi constatada reversibilidade na reação de hidrólise.

Os pontos experimentais de conversão em função do tempo da reação de hidrólise ajustaram-se aos modelos cinéticos integrados para os tipos de inibição acompetitiva e não-competitiva pelo substrato, e competitiva, não-competitiva ou acompetitiva para o produto. No entanto os valores dos parâmetros cinéticos K_i e k_{cat} calculados por meio desses modelos foram inconsistentes, indicando que as hipóteses usadas não são suficientes para descrever a extensão total da cinética deste tipo de reação de zero a 100% de conversão.

Constatou-se a alta estabilidade térmica desta enzima na temperatura de 50°C e pH 4,8 por meio do teste de conversão de celobiose 20 g/L em glucose, em que não foi observada redução da atividade enzimática após 73 horas.

Novos estudos fundamentais são necessários para elucidar o(s) fenômeno(s) desconhecido(s) que invalida(m) a aplicação na hidrólise enzimática da celobiose, dos modelos cinéticos integrados apresentados neste trabalho.

6. SUGESTÕES

Neste trabalho buscou-se abordar uma ampla faixa de parâmetros importantes acerca da enzima celobiase. No entanto, quando se trata do assunto “enzima”, sabe-se da dificuldade da obtenção, num tempo restrito, de uma caracterização completa. Assim, fica como sugestão para futuros trabalhos:

- O estudo da influência da purificação da enzima celobiase no mecanismo de inibição pelo produto e pelo substrato.
- A imobilização da enzima celobiase, determinando-se suas propriedades catalíticas após a imobilização.
- A determinação do tempo de meia-vida operacional da enzima celobiase em reator de leito fluidizado.
- A determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} e K_s) a 40°C, para comparação dos ajustes a 50°C.
- O ajuste dos dados de conversão empregando as equações cinéticas na forma diferencial, como a equação (4.10), ou combinação da (4.3) com a (4.4).
- Realizar ensaios de desnaturação térmica a 55°C por um tempo longo a fim de se verificar a estabilidade térmica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUADO, J., ROMERO, M. D., RODRÍGUEZ, L. , CALLES J. A., 1995, "Thermal Deactivation of Free and Immobilized β -Glucosidase from *Penicillium funiculosum*", **Biotechnology Progress**, v. 11, pp. 104-106.
- ALFANI, F., CANTARELLA, L., GALLIFUOCO, A., PEZZULLO, L., SCARDI, V. CANTARELLA, M., 1987, "Characterization of the β -Glucosidase Activity Associated with Immobilized Cellulase of *Aspergillus Niger*", **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 501, pp. 503-507.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F., 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2 ed., USA, McGraw-Hill, capítulo 2.
- BASSETTI, F. J., BERGAMASCO, R., MORAES, F. F. de, ZANIN, G. M., 1997a, "Estabilidade Térmica e Energia de Desativação Térmica da Enzima Invertase Livre e Imobilizada", *Trabajos Presentados 1^{er} Congreso de Ingenieria de Procesos del Mercosur*, Bahia Blanca, Argentina, pp. 233-234.
- BASSETTI, F. J., MORAES, F. F. de, ZANIN, G. M., 1997b, "Hidrólise Enzimática da Sacarose em Reator de Leito Fixo e Fluidizado", *Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados*, vol. II, pp. 705-710.
- BELTRAME, P. L., CARNITI, P., FOCHER, B., MARZETTI, A., SARTO, V., 1983, "Cellobiose Hydrolysis by Crude Cellobiase. Kinetics and Mechanism", **La Chimica e L' Industria**, v. 65, n. 6, pp. 398-401.
- BERGHEM, L. E. R., PETTERSSON, L. G., 1974, "The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation", **European Journal of Biochemistry**, v. 46, pp. 295-305.
- BEZERRA, R. M. F., 1995, *Cinética Enzimática da Hidrólise de Celulose*, Tese de D. Sc., Universidade de Trás-os-Montes de Alto Dourado, Vila Real, Portugal, pp. 267.
- BISSET, F., STERNBERG, D., 1978, "Immobilization of *Aspergillus* β -glucosidase on Chitosan", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 4, pp. 750-755.
- CABRAL, J. M. S., CARDOSO, J. P., NOVAIS, J. M., KENNEDY, J. F., 1984, "A Simple Kinetic Model for the Hydrolysis of α -D-Glucans Using Glucoamylase Immobilized on Titanium (IV) Activated Porous Silica", **Enzyme Microbial Technology**, vol.6, pp. 365-370.

- CAMINAL, G., LOPEZ-SANTIN, J., SOLA, C., 1985, "Kinetic Modelling of the Enzymatic Hydrolyses of Pretreated Cellulose", **Biotechnology Bioengineering** v. 27, pp. 1282-1290.
- CAMPOS, L. S., 1998, *Entender a Bioquímica*, Lisboa, Escolar Editora, p. 260.
- CANTARELLA, M., GALLIFUOCO, A., SCARDI, V., ALFANI, F., 1984, "Enzyme Stability and Glucose Inhibition in Cellulose Saccharification", **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 434, pp. 39-43.
- CARDOSO, J. P., 1977, *An Investigation of the Factors Affecting Reaction Rates in Immobilized Enzyme Reactors*, Ph.D. thesis, University of Birmingham, England.
- CHAPLIN, M. F., BUCKE, C., 1992, *Enzyme Technology*. Cambridge, Cambridge University Press, pp. 18-23.
- CHARLES, M. COUGHLIN, R. W., ALLEN, B. R., PARUCHURI, E. K., HASSELBERGER, F. X., 1974, "Lactase Immobilized on Stainless Steel and Other Dense Metal and Metal Oxides Supports", In: BRUCE, R., vol. 42, *Advances in Experimental Medicine and Biology – Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, Plenum Press.
- DEKKER, R. F. H., 1986, "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, pp. 1438-1442.
- DIXON, M., WEBB, E. C., 1979, *Enzymes*, 3rd ed., London, Longman Group Limited, capítulos 2 e 4.
- FADDA, M. B., CURRELI, N., POMPEI R., RESCIGNO, A., RINALDI, A., SANJUST, E., 1994, "A Highly Active Fungal β -Glucosidase", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, pp. 263-270.
- GILBERT, M., BREUIL, C., SADDLER, J.N., 1992, "Characterization of the Enzymes Present in the Cellulase System of *Thielavia terrestris* 255B", **Bioresource Technology**, v. 39, pp. 147-154.
- GONDÉ, P., BLONDIN, B., RATOMAHENINA, R., ARNAUD, A., GALZY, P., 1982, "Selection of Yeast Strains for Cellobiose Alcoholic Fermentation", **Journal of Fermentation Technology**, v. 60, n. 6, pp. 579-584.

- GONG, C.-S., LADISCH, M. R., TSAO, G. T., 1977, "Cellobiase from *Trichoderma viride*: Purification, Properties, Kinetics, and Mechanism", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, pp. 959-981.
- GOYAL, A., GHOSH, B., EVELEIGH, D., 1991, "Characteristics of Fungal Cellulases" **Bioresource Technology**, v. 36, pp. 37-50.
- GROUS, W., CONVERSE, A., GRETHLEIN, H., LYND, L., 1985, "Kinetics of Cellobiose Hidrolysis Using Cellobiase Composites from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*", **Biotechnology and Bioengineering** v. 27, pp. 463-470.
- HEICHAL-SEGAL, O., RAPPOPORT, S., BRAUN, S., 1995, "Immobilization in Alginate-Silicate Sol – Gel Matrix Protects β -Glucosidase Against Thermal and Chemical Denaturation", **Biotechnology and Bioengineering** v. 13, pp. 798-800.
- HOLTZAPPLE, M. T., COGNATA, M., SHU, Y., HENDRICKSON C., 1990, "Inhibition of *Trichoderma reesei* Cellulase by Sugars and Solvents", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, pp. 275-287.
- HSUANYU, Y., LAIDLER, K. J., 1984, "Kinetics of the Hydrolysis of Cellobiose Catalysed by β -Glucosidase", **Canadian Journal Biochemistry and Cell Biology** v. 63, pp. 167-175.
- KENT, C., ROSEVEAR, A., THOMSON, A. R., 1978, "Enzymes Immobilised on Inorganic Supports. In: WISEMAN, A., *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, vol. 2, Chichester, John Wiley & Sons.
- LADISCH, M. R., LIN, K. W., VOLOCH, M., TSAO, G. T., 1983, "Process Considerations in the Enzymatic Hydrolysis of Biomass", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, pp. 82–102.
- LAYNE, E., 1957, "Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins" In: COLLOWICH, S. P. & KAPLAN, N. O., ed. *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, v. 3, pp. 448-450.
- LEE, J. M., WOODWARD, J., 1983, "Properties and Application of Immobilized β -D-Glucosidase Coentrapped with *Zymomonas mobilis* in Calcium Alginate", **Biotechnology and Bioengineering** v. 25, pp. 2441-2451.
- LEE, Y. -H., FAN, L. T., 1980, "Properties and Mode of Action of Cellulase", **Advances in Biochemical Engineering**, v. 17, pp. 101-129.
- LEHNINGER, A. L., 1984, *Princípios de Bioquímica*. São Paulo, Editora Sarvier.

- LEHNINGER, A. L., 1976, *Bioquímica – Componentes Moleculares das Células*. 2ª ed., São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda.
- LENDERS, J.-P., GERMAIN, P., CRICHTON, R. R., 1985, “Immobilization of a Soluble Chemically Thermostabilized Enzyme”, **Biotechnology and Bioengineering** v. 27, pp. 572-578.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FAAR, A. L., RANDALL, R. J., 1951, “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent”, **Journal Biological Chemistry**, v. 193, pp. 265-275.
- MAGUIRE, R. J., 1977, “Kinetics of the Hydrolysis of Cellobiose and *p*-Nitrophenyl- β -Glucoside by Cellobiase of *Trichoderma viride*”, **Canadian Journal Biochemistry**, v. 55, pp. 19-26.
- MORITA, T., ASSUMPÇÃO, R. M. V., 1972, *Manual de Soluções Reagentes e Solventes - Padronização - Preparação - Purificação*, 2ª-ed., São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, pp. 272-275.
- NOVO INDUSTRI, 1996 (dezembro), **Celluclast® 1,5 L**, B 153h-GB 500.
- PHILIPPIDIS, G. P., SMITH, T. K., 1995, “Limiting Factors in the Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for Conversion of Cellulosic Biomass to Fuel Ethanol”, **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 51/52, pp. 117-123.
- SAHA, B. C., FREER, S. N., BOTHAST, R. J., 1994, “Production, Purification, and Properties of a Thermostable β -Glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*”, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.10, pp. 3774-3780.
- SEGEL, I. H. , 1975, *Enzyme Kinetics*. New York, John Wiley & Sons, Inc., capítulo 4.
- SEGEL, I. H., 1979, *Bioquímica: Teoria e Problemas*. Título do original em inglês: *Biochemical Calculations*. 2ª ed., Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., capítulo 4.
- STERNBERG, D., 1976, “ β -Glucosidase of *Trichoderma*: Its Biosynthesis and Role in Saccharification of Cellulose”, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, pp. 648-654.
- STERNBERG, D., VIJAYAKUMAR, P., REESE, E. T., 1977, “ β -Glucosidase: Microbial Production and Effect on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose”, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 2, pp. 139-147.

- SUNDSTROM, D. W., KLEI, H. E., COUGHLIN, R. W., BIEDERMAN, G. J., BROUWER, C. A., 1981, "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to Glucose Using Immobilized β -Glucosidase", **Biotechnology and Bioengineering** v. 23, pp. 473-485.
- TRINDER, P., 1969, "Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor", **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, pp. 24-27.
- WEBB, F. C., 1964, *Biochemical Engineering*. London, D. Van Nostrand Company Ltd.
- WOODWARD, J., 1991, "Synergism in Cellulase Systems", **Bioresource Technology**, v. 36, pp. 67-75.
- WOODWARD, J., ARNOLD, S. L., 1981, "The Inhibition of β -Glucosidase Activity in *Trichoderma reesei* C30 Cellulase by Derivatives and Isomers of Glucose", **Biotechnology and Bioengineering** v. 23, pp. 1553-1562.
- WOODWARD, J., CAPPS, K. M., 1992, "Cellobiose Hydrolysis by Glutaraldehyde-Treated β -Glucosidase Entrapped in Propylene Glycol Alginate/bone Gelatin Spheres", **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 34/35, pp. 341-347.
- WOODWARD, J., KORAN Jr., L. J., HERNANDEZ, L. J., STEPHAN, L. M., 1993, "Use of Immobilized β -Glucosidase in the Hydrolysis of Cellulose", **ACS Symposium Series 533**, pp. 240-250.
- WOODWARD, J., KRASNIAK, S. R., SMITH, R. D., SPIELBERG, F. ZACHRY, G. S., 1982, "Preparation and Characterization of β -D-Glucosidase Immobilized in Calcium Alginate", **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.12, 485-489.
- WOODWARD, J., WHALEY, K. S., ZACHRY, G. S., WOHLPART, D.L., 1981, "Thermal Stability of *Trichoderma reesei* C30 Cellulase and *Aspergillus niger* β -Glucosidase after pH and Chemical Modification", **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, pp. 619-629.
- WOODWARD, J., WISEMAN, A., 1982, "Fungal and other β -D-Glucosidases – Their Properties and Applications", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, pp. 73-79.
- WOODWARD, J., WOHLPART, D. L., 1982, "Properties of Native and Immobilized Preparations of β -D-Glucosidase from *Aspergillus niger* ", **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, pp. 547-552.
- ZANIN, G. M., 1989, *Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada*, Tese de D. Sc., Campinas, SP, Brasil, 499 p.

-
- ZANIN, G. M., KAMBARA, L. M., CALSAVARA, L. P. V., MORAES, F. F. de, 1994, "Performance of Fixed and Fluidized Bed Reactors with Immobilized Enzyme", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 45/46, pp. 627-640.
- ZANIN, G. M., MORAES F. F. de, 1985, "Hidrólise do Bagaço de Cana em Microreator de Leito Fluidizado", **Revista Brasileira de Engenharia**, v. 3, n. 1, pp. 45-52.
- ZANIN, G. M., MORAES F. F. de, 1998, "Thermal Stability and Energy of Deactivation of Free and Immobilized Amyloglucosidase in the Saccharification of Cassava Starch", **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 70-72, pp. 383-394.
- ZANIN, G. M., MORAES, F. F. de, 1996, "Modeling Cassava Starch Saccharification with Amyloglucosidase", **Applied Biochemistry and Biotechnology** vol. 57/58, pp. 617-625.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO I – Atividade em função da temperatura e pH

Serão apresentados neste anexo os resultados dos ensaios de atividade em função da temperatura e pH cuja metodologia foi apresentada no item 3.2.4.c , sendo que os resultados foram discutidos no item 4.2.3.

As Figuras 8.1.1 a 8.1.8 mostram os resultados da formação de glucose em função do tempo de reação, para a faixa de pH 3,0 a 7,0 e de temperatura de 40 a 75 °C.

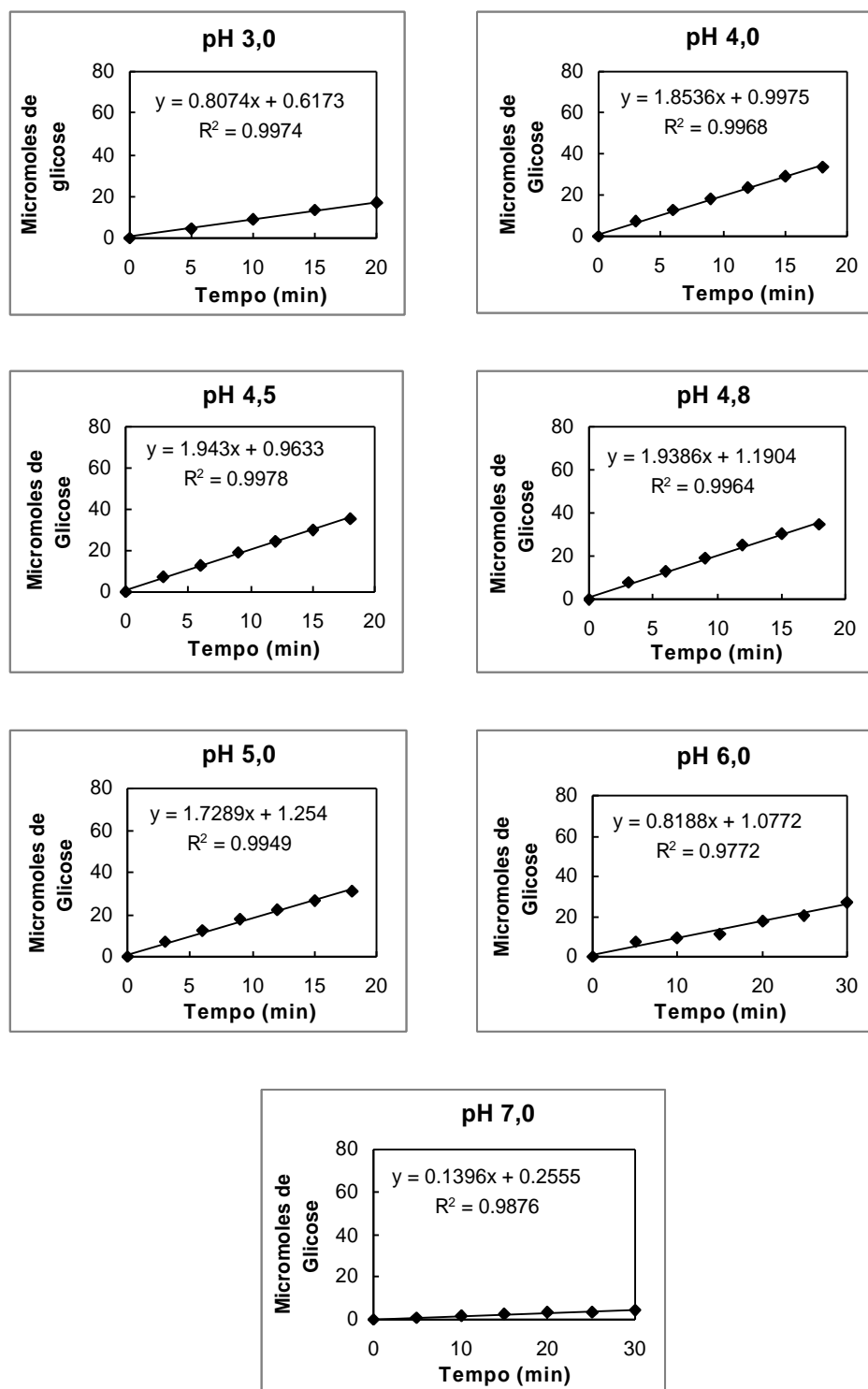


Figura 8.1.1 - Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 40°C, variando-se o pH. Concentração de celbiose: 2g/L; concentração de celbiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

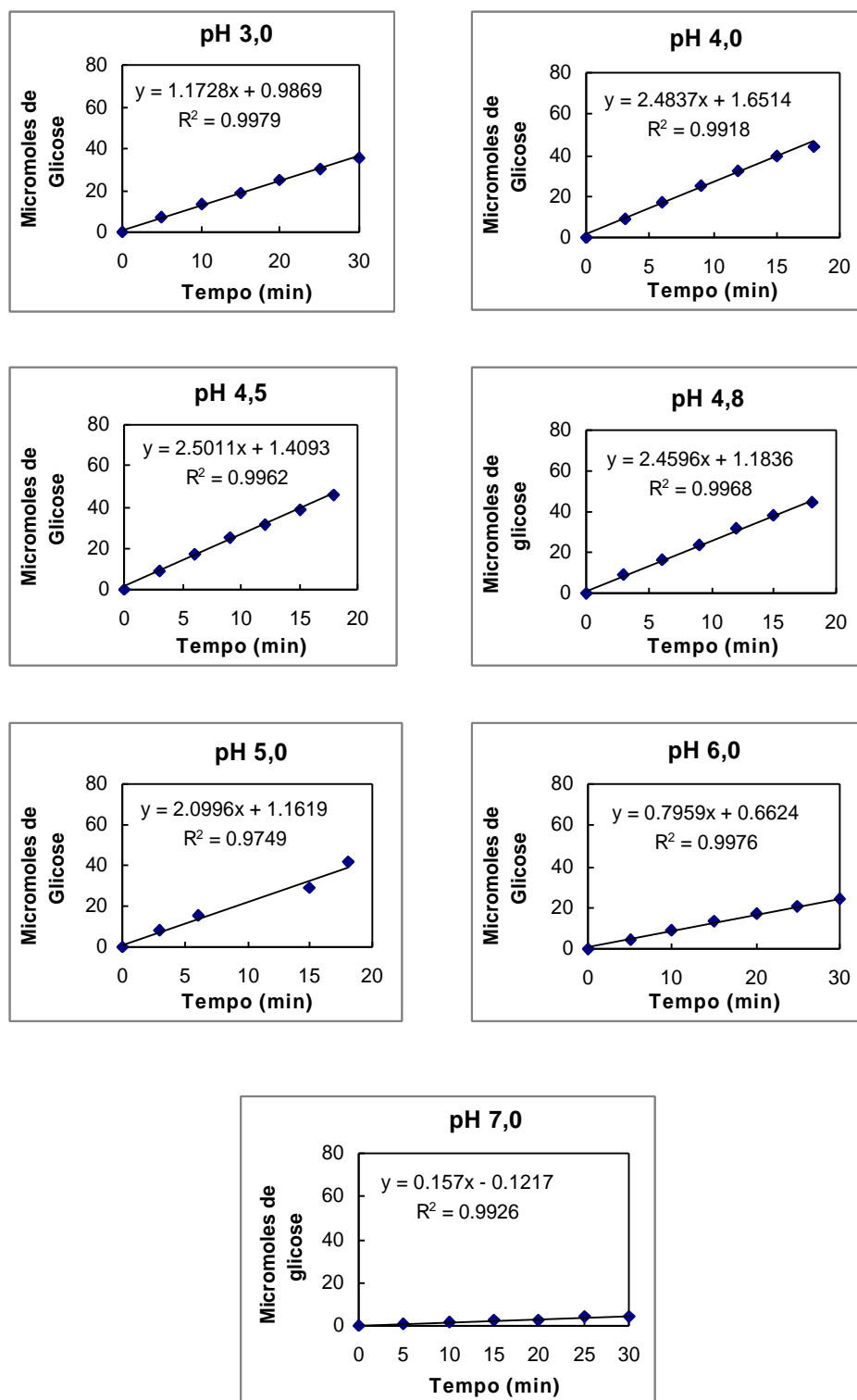


Figura 8.1.2- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 45°C, variando-se o pH. Concentração de celobiose: 2g/L; concentração de celobiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R² = coeficiente de correlação da reta ajustada).

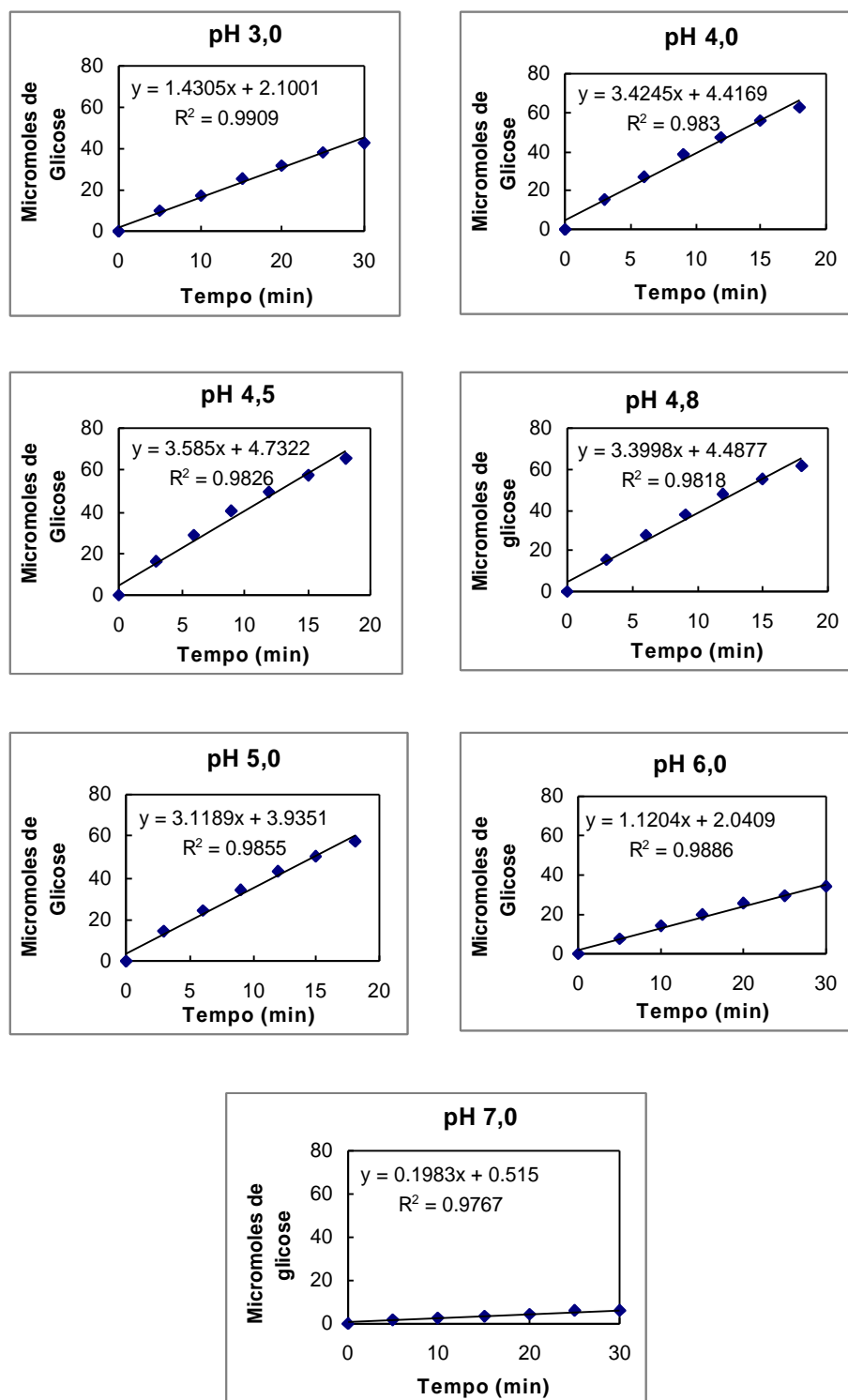


Figura 8.1.3- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 50°C, variando-se o pH. Concentração de celbiose: 2g/L; concentração de celbiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

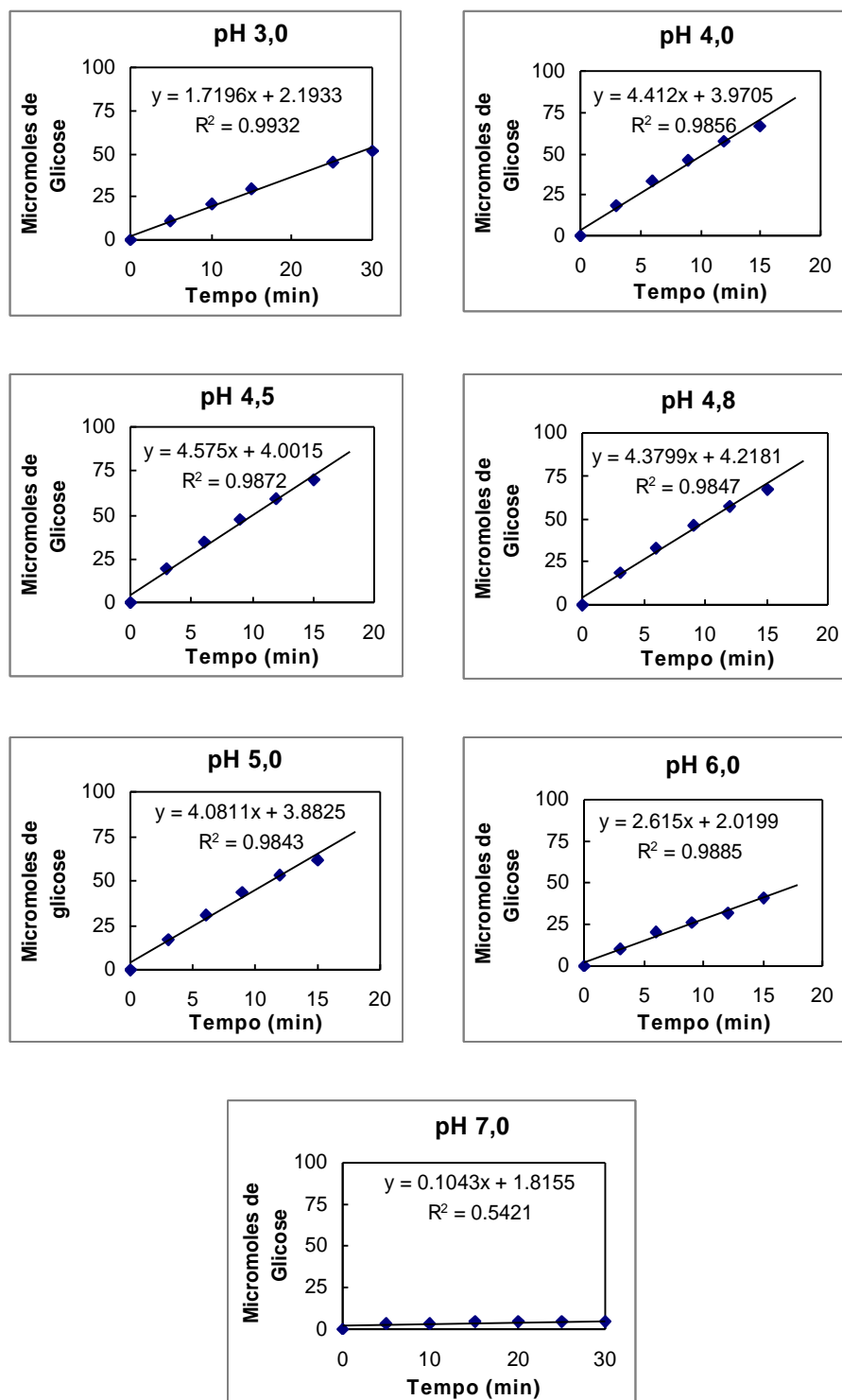


Figura 8.1.4- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 55°C, variando-se o pH. Concentração de celbiose: 2g/L; concentração de celbiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

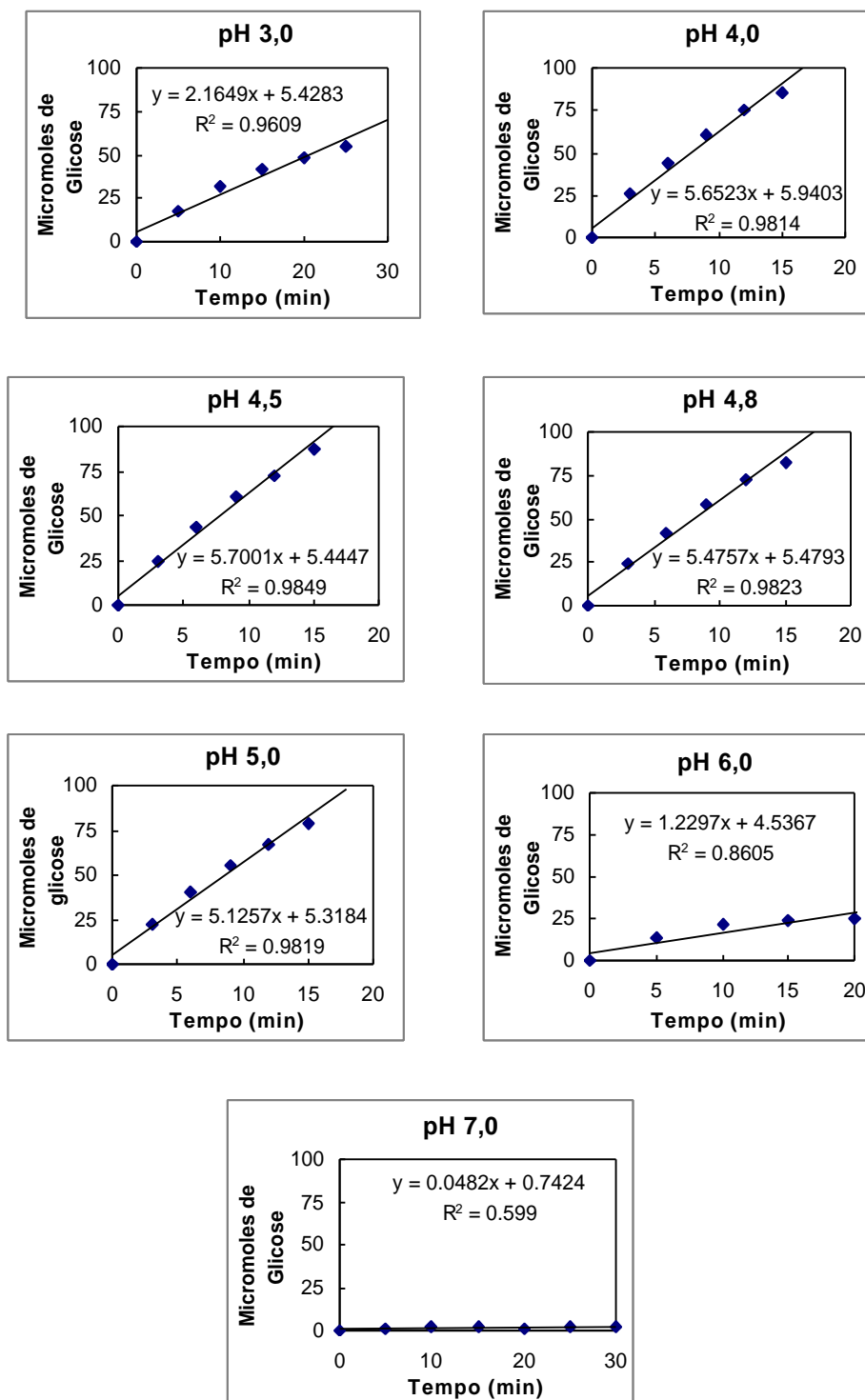


Figura 8.1.5- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 60°C, variando-se o pH. Concentração de celbiose: 2g/L; concentração de celbiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

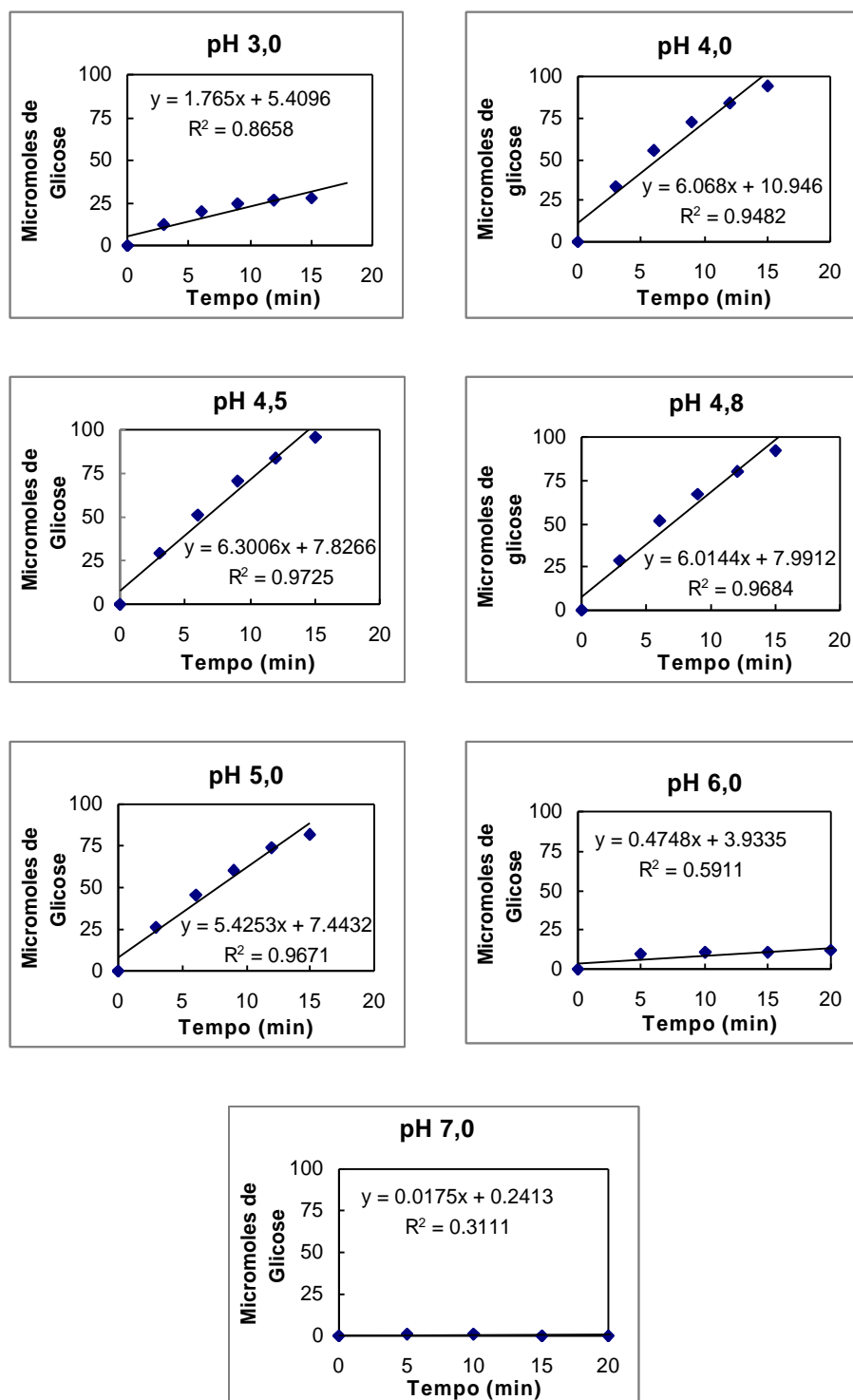


Figura 8.1.6- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 65°C, variando-se o pH. Concentração de celbiose: 2g/L; concentração de celbiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

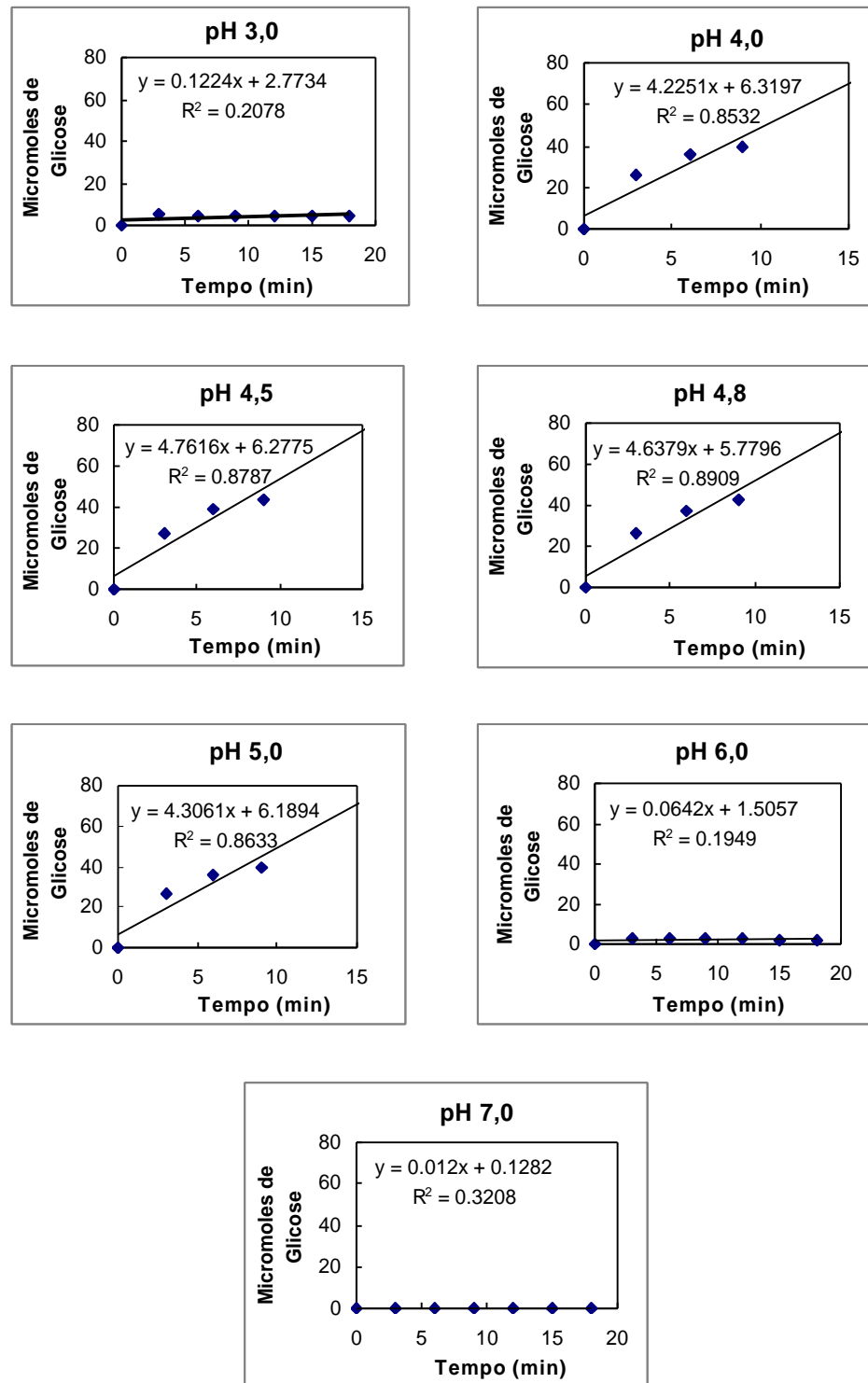


Figura 8.1.7- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 70°C, variando-se o pH. Concentração de celbiose: 2g/L; concentração de celbiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

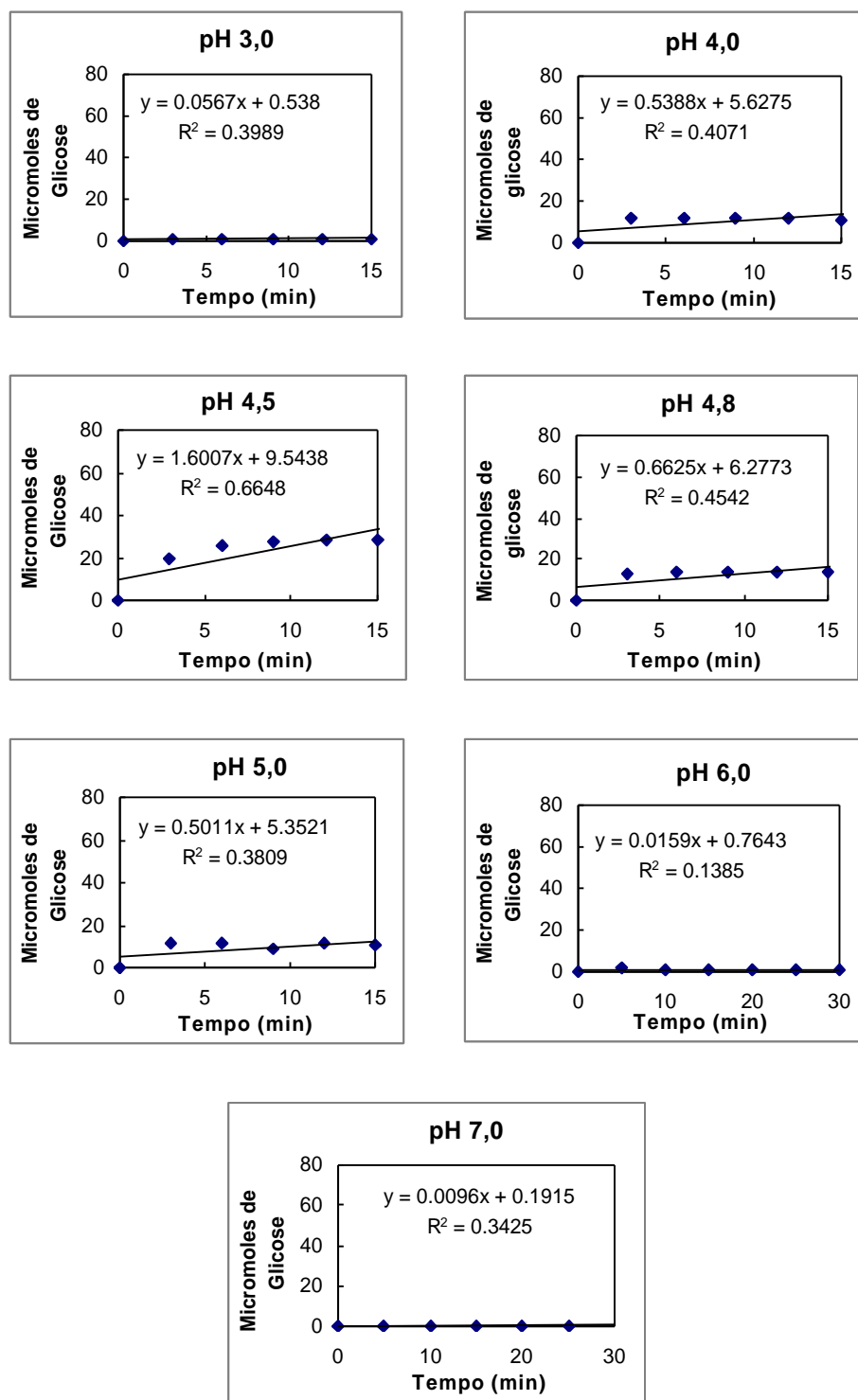


Figura 8.1.8- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a temperatura de 75°C, variando-se o pH. Concentração de celbiose: 2g/L; concentração de celbiose: 95µL/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

8.2 ANEXO II - Testes de estabilidade térmica da celobiase

Nas Figuras 8.2.1 a 8.2.7 apresentam-se os gráficos dos testes de atividade a 50°C da enzima celobiase, incubada nas temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70 °C, conforme metodologia descrita no item 3.2.4.d. Os resultados foram discutidos no item 4.2.5.

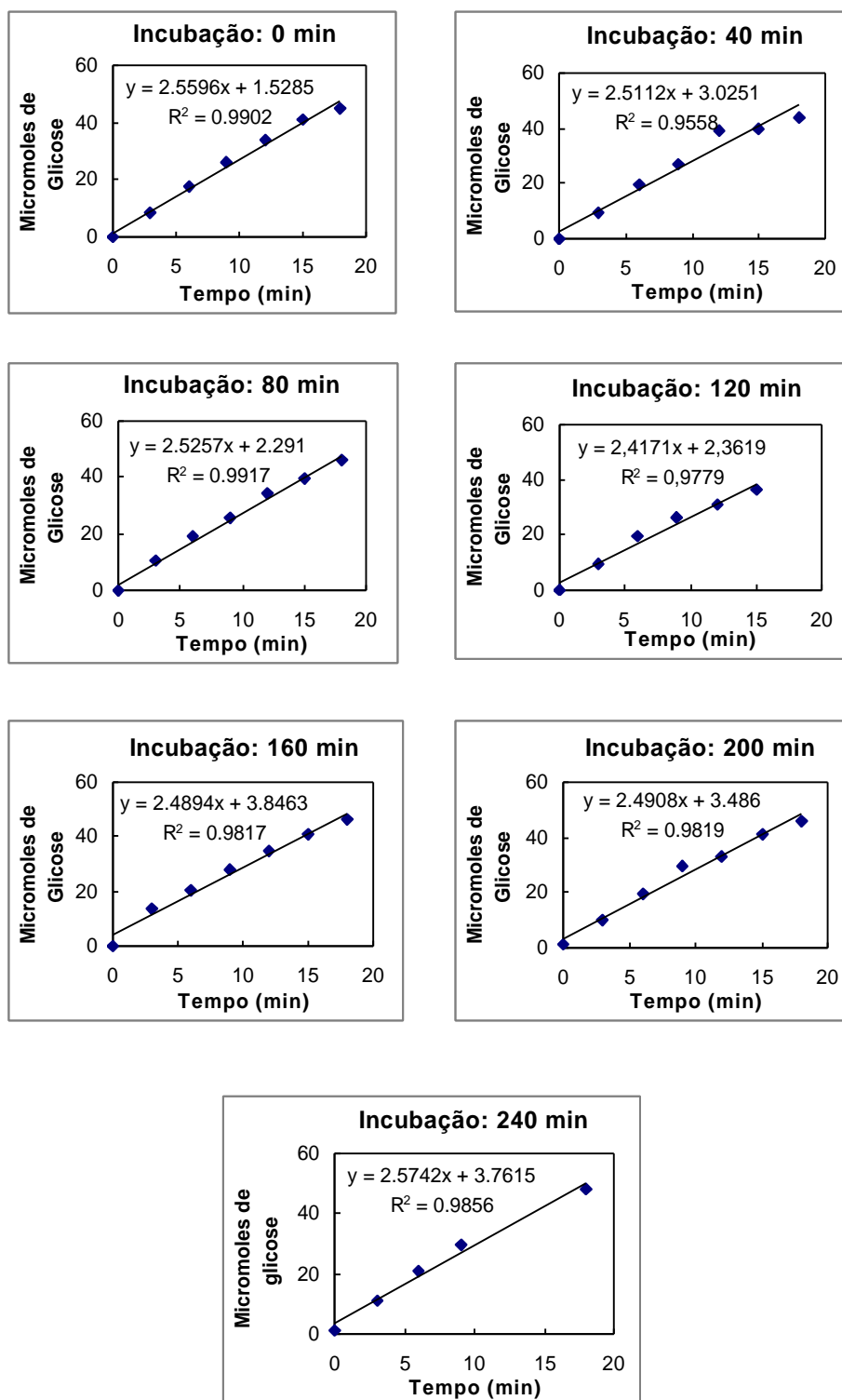


Figura 8.2.1- Micromoles de glucose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 40°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiase 95 μ L/L. (y = micromoles de glucose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

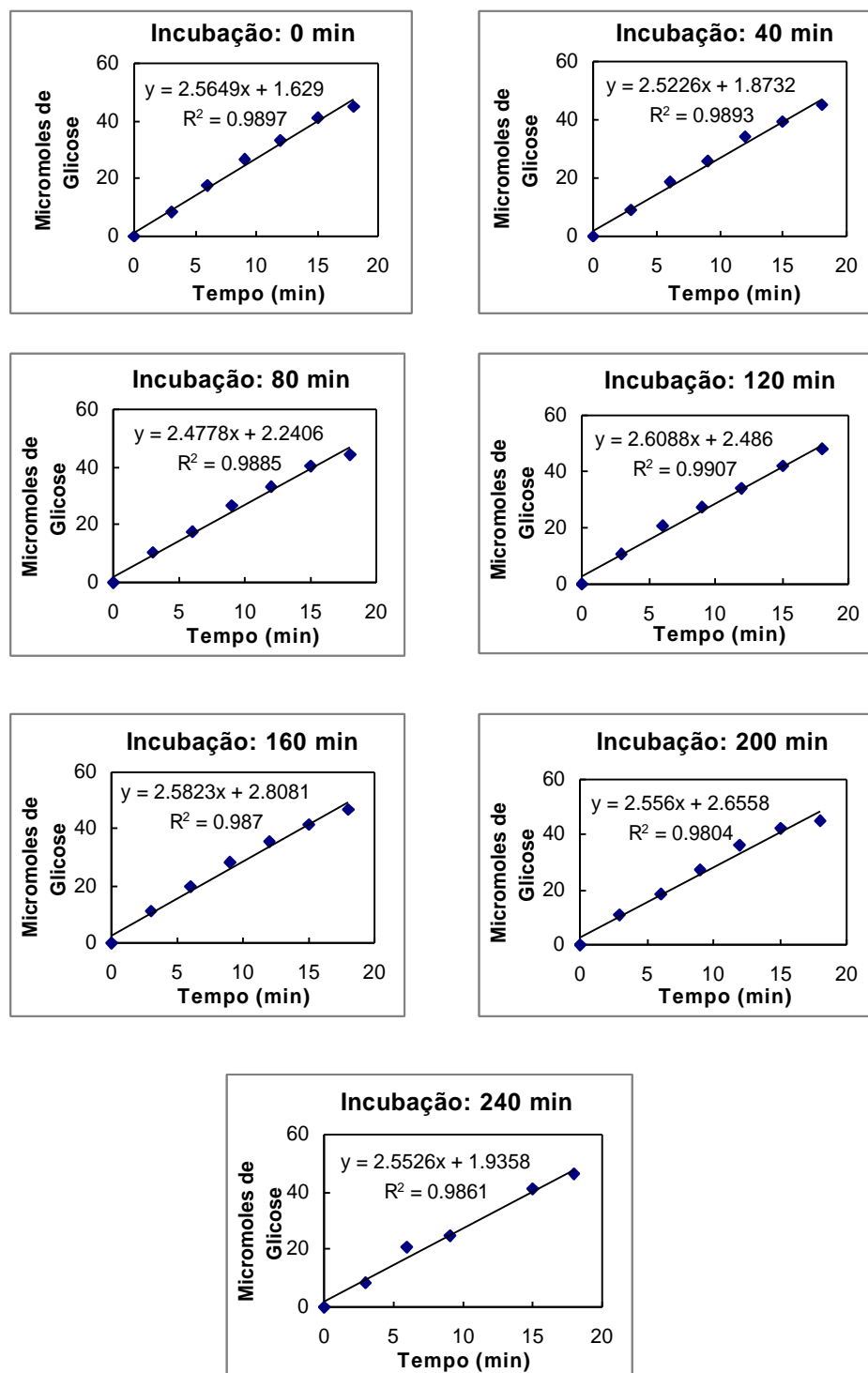


Figura 8.2.2- Micromoles de glicose formada em função do tempo para a enzima incubada em celbiose 2g/L, pH 4,8, a 45°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celbiose 2 g/L pH 4,8 e celbiose 95µL/L. (y = micromoles de glicose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

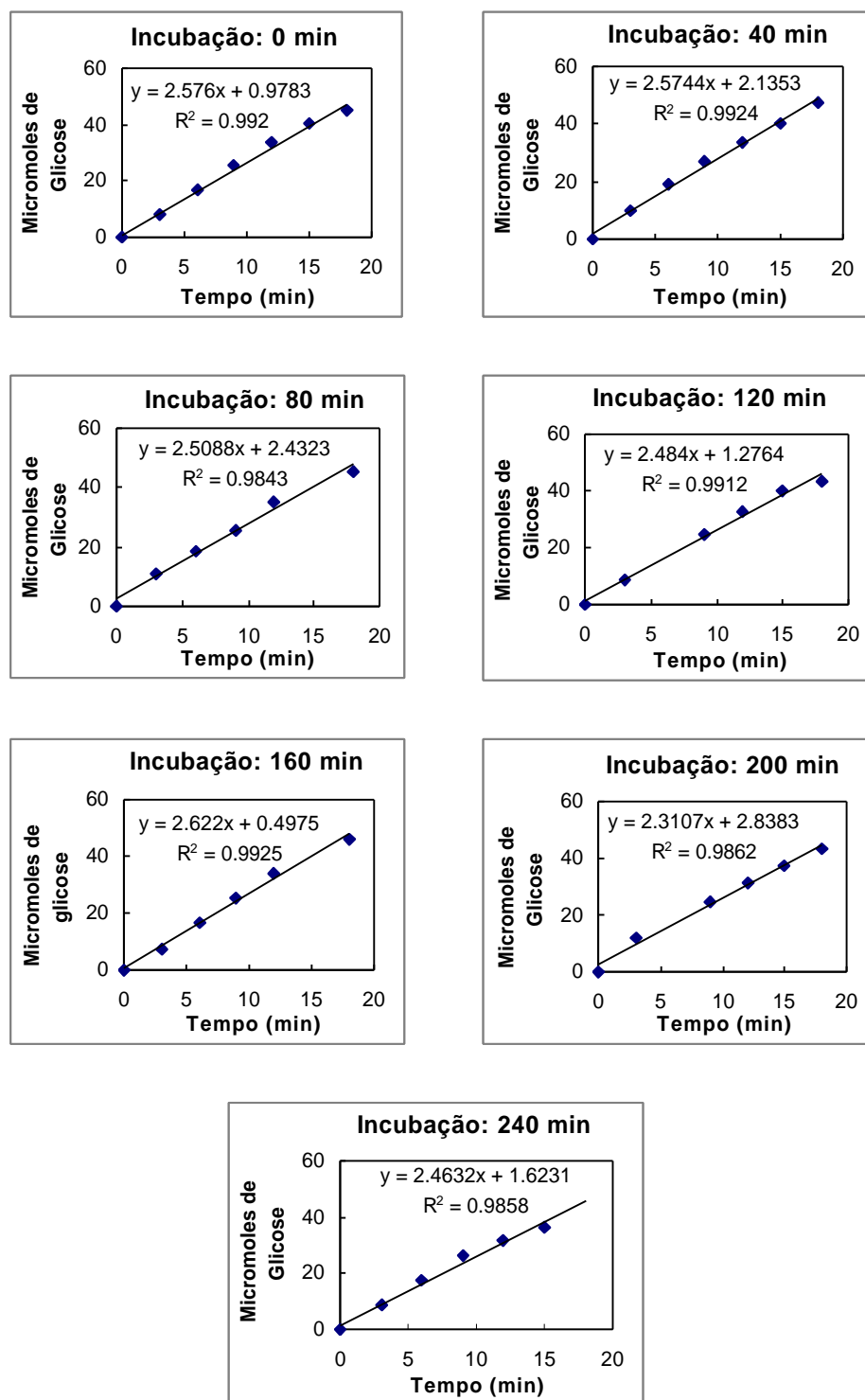


Figura 8.2.3- Micromoles de glicose formada em função do tempo para a enzima incubada em celbiose 2g/L, pH 4,8, a 50°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celbiose 2 g/L pH 4,8 e celbiose 95 μ L/L. (y = micromoles de glicose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

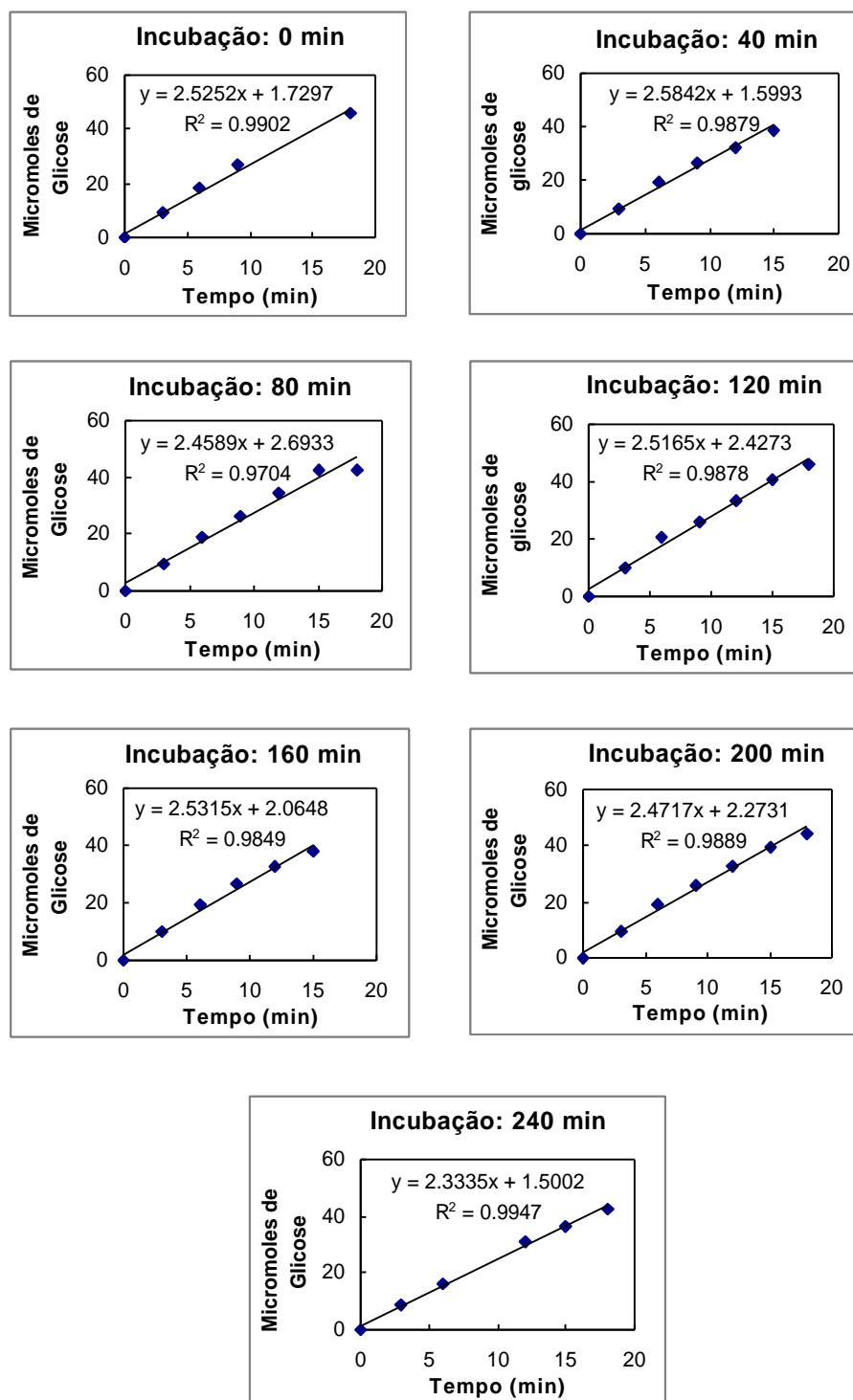


Figura 8.2.4- Micromoles de glicose formada em função do tempo para a enzima incubada em celbiose 2g/L, pH 4,8, a 55°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celbiose 2 g/L pH 4,8 e celbiose 95 μ L/L. (y = micromoles de glicose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

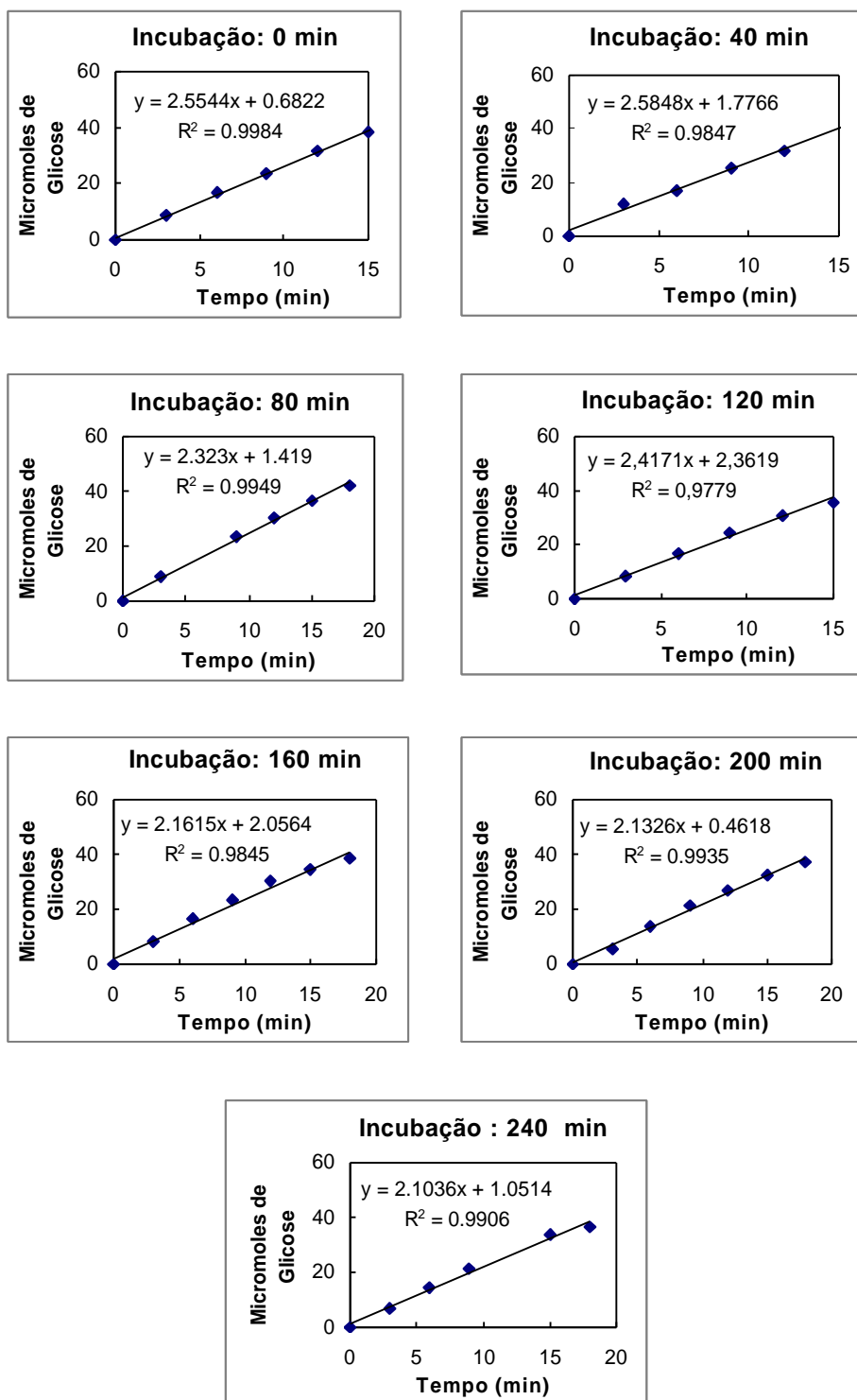


Figura 8.2.5- Micromoles de glicose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 60°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiose 95µL/L. (y = micromoles de glicose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

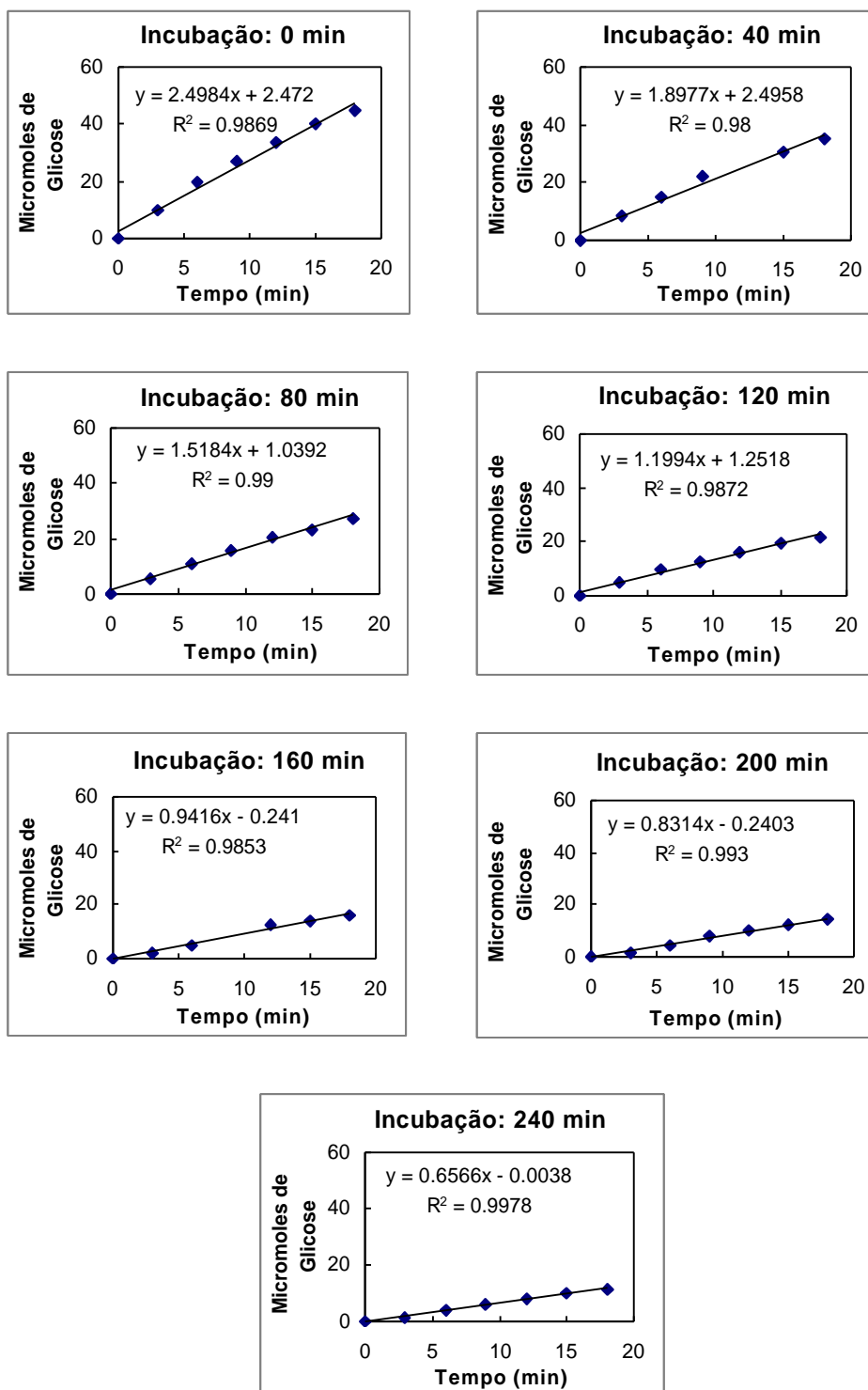


Figura 8.2.6- Micromoles de glicose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 65°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiose 95µL/L. (y = micromoles de glicose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

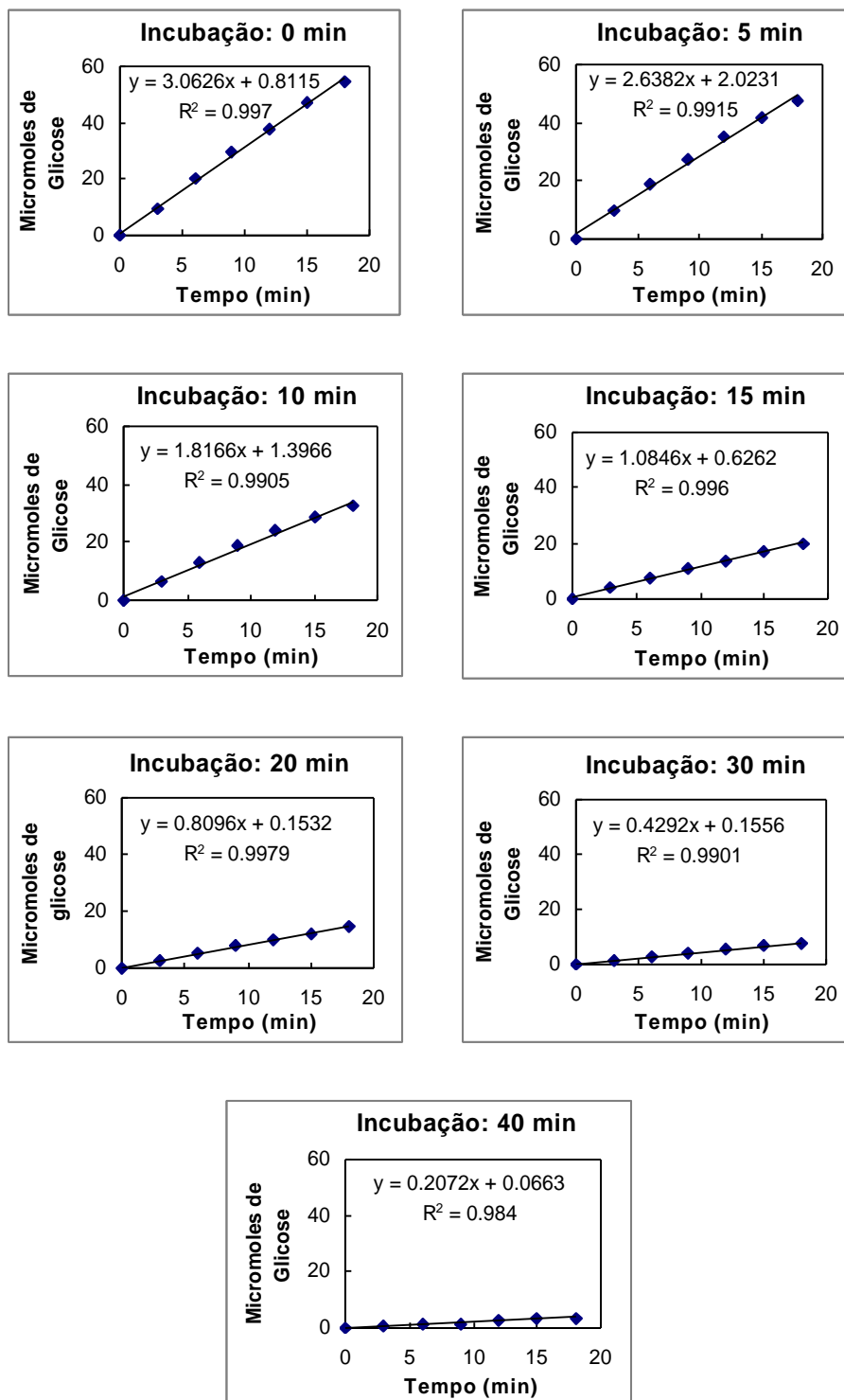


Figura 8.2.7- Micromoles de glicose formada em função do tempo para a enzima incubada em celobiose 2g/L, pH 4,8, a 70°C. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C em celobiose 2 g/L pH 4,8 e celobiose 95µL/L. (y = micromoles de glicose, x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

8.3 ANEXO III – Influência da concentração inicial de substrato

Neste anexo apresentam-se os gráficos de formação de glucose em função do tempo de reação para concentrações iniciais de celobiose variando de zero a 20,0 g/L (1,2 a 58,5 mM), conforme metodologia descrita no item 3.2.4.e. Os resultados foram discutidos no item 4.2.8.

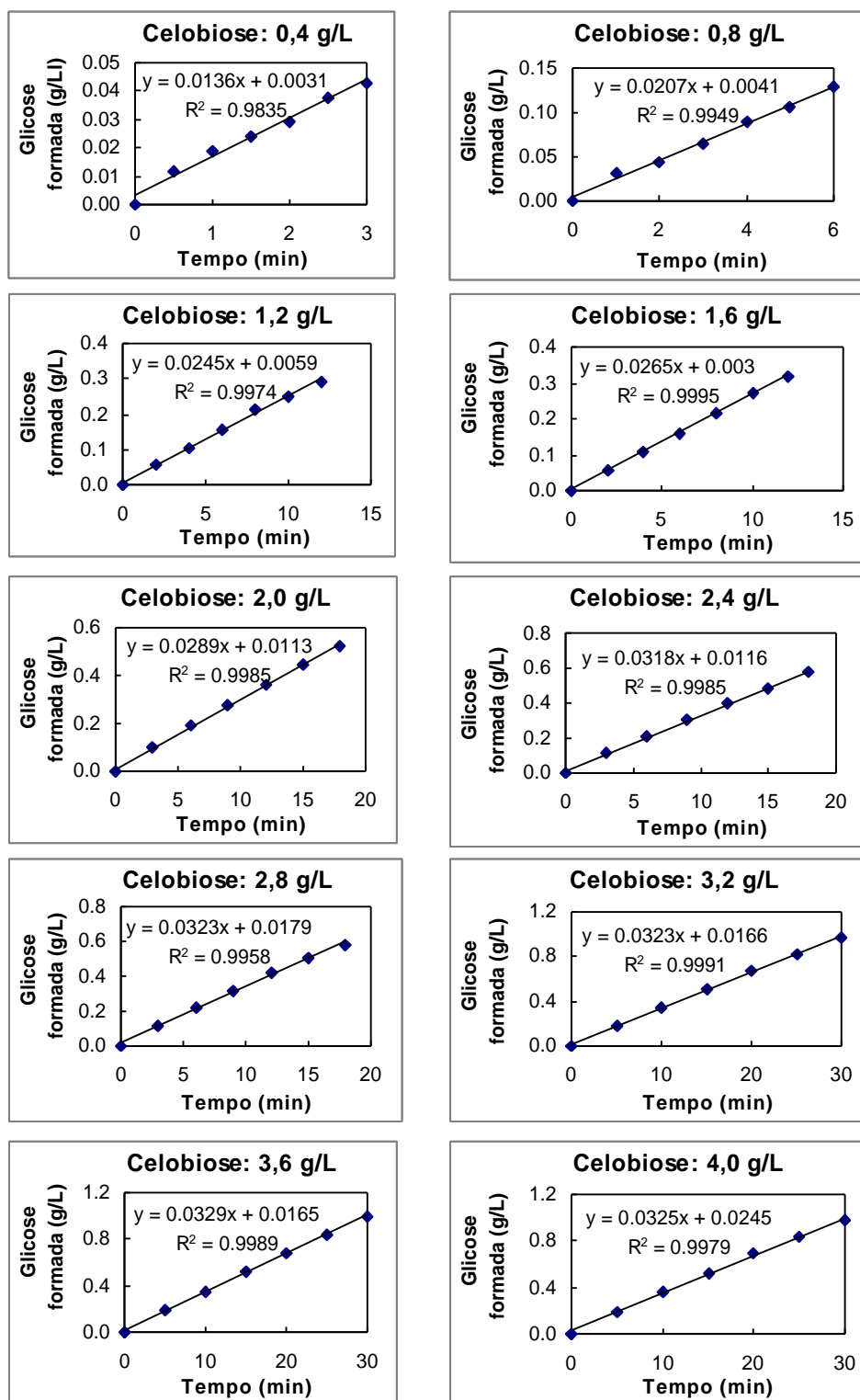


Figura 8.3.1- Glucose formada em função do tempo de reação, para concentrações iniciais de celobiose de 0,4 a 4,0 g/L. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C, pH 4,8, celobiose 2g/L e celobiase 95 μ L. (y = glucose formada (g/L), x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).

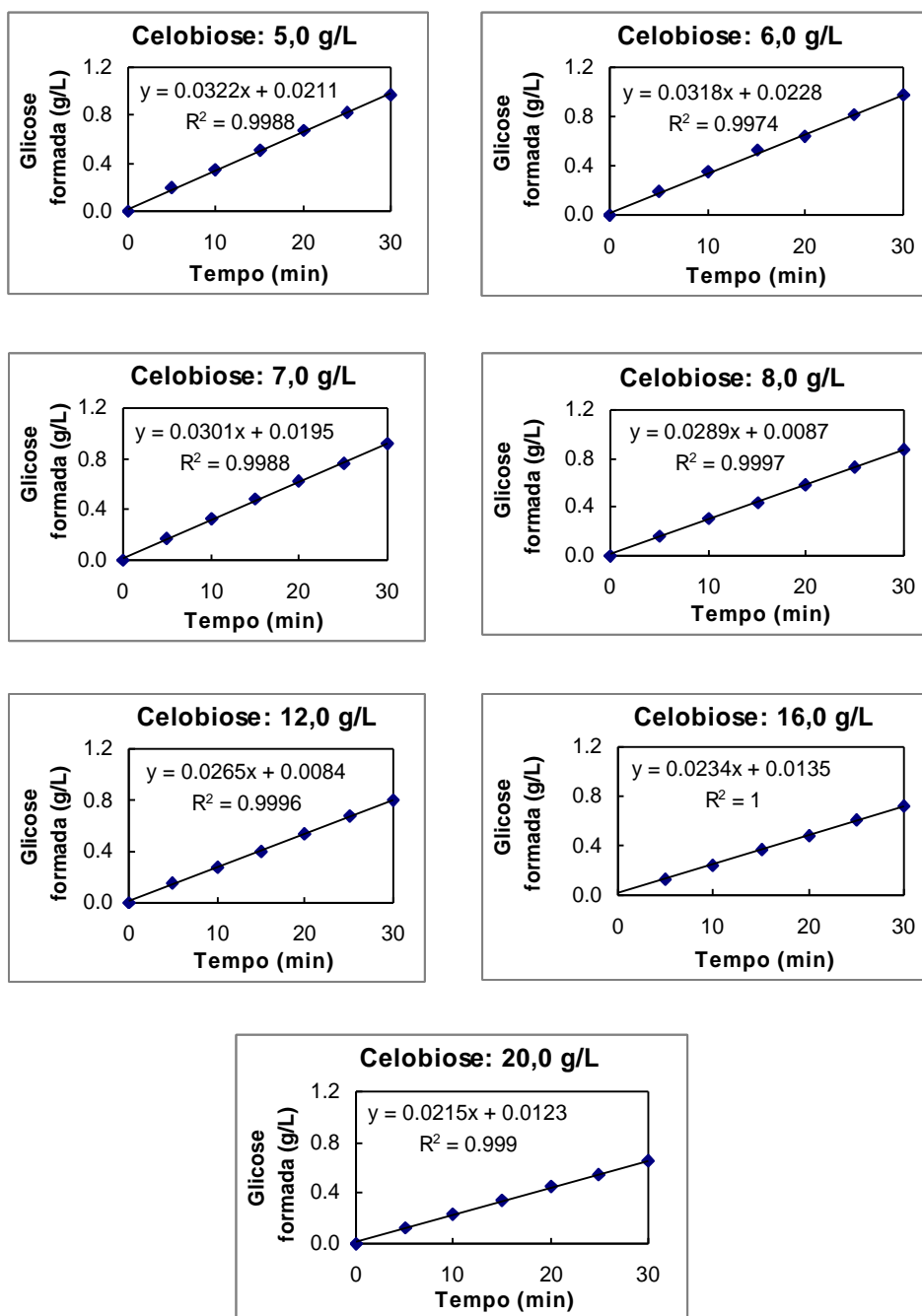


Figura 8.3.2- Glucose formada em função do tempo de reação, para concentrações iniciais de celbiose de 5,0 a 20,0 g/L. Os testes de atividade foram conduzidos a 50°C, pH 4,8, celbiose 2g/L e celbiase 95µL (y = glucose formada (g/L), x = tempo (min), R^2 = coeficiente de correlação da reta ajustada).