

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS APLICADAS À PRODUÇÃO DE ETANOL E BIODIESEL

Mônica Caramez Triches Damaso

Cristiane Sanchez Farinas

Thais Fabiana Chan Salum

INTRODUÇÃO

O uso de enzimas é uma realidade cada vez mais presente nos diferentes setores industriais e consiste em uma alternativa importante aos processos químicos convencionais. As enzimas catalisam as reações de forma específica, minimizando a geração de subprodutos indesejáveis, e atuam em temperaturas amenas, o que reduz o custo energético do processo. Além disso, quando as enzimas estão imobilizadas em suportes sólidos insolúveis, existe a possibilidade de sua reutilização. Estas características distinguem positivamente estas biomoléculas em relação aos catalisadores químicos.

Uma gama de enzimas, dentre elas amilases, lipases, xilanases, celulases, pectinases, peroxidases e queratinases tem sido usada com sucesso nas indústrias de produtos de limpeza, alimentos e bebidas, medicamentos e diagnósticos, cosméticos, síntese orgânica, polpa e papel, fibras têxteis, oleoquímica e tratamento de efluentes (BON *et al.*, 2008a). O setor de biocombustíveis também tem procurado celulases e lipases que consigam atuar de forma técnica e economicamente viável na produção de etanol e de biodiesel, tentando suprir a demanda crescente do setor.

As celulases são usadas para hidrolisar a celulose presente em materiais lignocelulósicos, tais como resíduos agroindustriais e florestais e gramíneas, em glicose (LYND *et al.*, 2002). A partir desta etapa, a glicose pode ser convertida, via fermentação alcoólica, no chamado etanol celulósico, ou ainda em outros bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinaria. Em se tratando da cana-de-açúcar, principal matéria-prima utilizada para produção de etanol no Brasil, somente um terço da massa da planta, que corresponde ao caldo rico em sacarose, é convertido em etanol (MOLINARI *et al.*, 2011). Porém, utilizando celulases, os outros dois terços (bagaço, palhada e ponteiros), ou uma parte destes, poderiam ser utilizados na produção de etanol celulósico, aumentando a produção do biocombustível sem alterar a área plantada. A produção de etanol celulósico será tratada com detalhes nos capítulos deste livro: “Catálise enzimática para desconstrução de biomassa lignocelulósica”, “Produção de etanol” e “Microorganismos para a produção de etanol: fermentação de pentoses e hexoses”.

A rota enzimática para obtenção de etanol celulósico, em comparação à química, apresenta vantagens como menor demanda de energia, menor geração de efluentes e maior eficiência na ação das leveduras no mosto fermentativo.

O principal obstáculo a ser transposto para aplicação das celulasas na produção industrial de etanol, além da questão econômica já citada, trata-se do fator técnico de obtenção de um coquetel com alta atividade e estabilidade para cada tipo de matéria-prima e de pré-tratamento utilizados.

Com relação à produção de biodiesel por rota enzimática, as enzimas utilizadas são as lipases. Estas enzimas têm a capacidade de atuar tanto na hidrólise de triacilgliceróis como em reações de esterificação e transesterificação, dependendo da quantidade de água contida no meio reacional. No caso da síntese de biodiesel, trata-se de um meio aquo-restrito no qual diversos óleos ou gorduras, sejam de origem vegetal ou animal, virgens ou reciclados, podem ser transformados em biodiesel por reação de transesterificação.

Várias são as vantagens na utilização da catálise enzimática para a produção de biodiesel quando comparada à química, a qual é mundialmente utilizada na indústria. As lipases não levam à formação de sabão, pois podem esterificar os ácidos graxos livres, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo e a enzima pode ser reutilizada. A produção de biodiesel por esta rota será tratada com detalhes no capítulo deste livro “Produção de biodiesel por catálise enzimática”.

Apesar de todas as vantagens citadas, ainda existem obstáculos que impedem que o processo enzimático seja utilizado comercialmente na produção do biodiesel. O de ordem econômica consiste no custo de obtenção do biocatalisador. Os de cunho técnico são o longo tempo de reação necessário para a síntese do biocombustível e a inibição e desnaturação das lipases no meio reacional (SALUM *et al.*, 2010).

A fim de vencer os obstáculos técnicos e econômicos para aplicação de enzimas na produção de etanol e biodiesel, várias estratégias têm sido estudadas, como: seleção e engenharia genética para obtenção de novas linhagens hiperprodutoras de enzimas, condições de processos de produção de enzimas e processos de concentração e imobilização de enzimas.

A escolha do microrganismo, meio de cultivo, processo de produção e recuperação dos extratos enzimáticos são fundamentais na busca por aumento de produtividade e de rendimento na produção destas biomoléculas.

Neste capítulo será apresentada uma breve caracterização do mercado de celulasas e lipases e serão abordados, principalmente, dois aspectos técnicos: os processos de produção e de imobilização de lipases e celulasas.

CARACTERIZAÇÃO DO MERCADO DE LIPASES E CELULASES

O mercado global de enzimas industriais atingiu em 2010 a casa dos US\$ 3,6 bilhões. A BBC Research, empresa líder no mercado de inteligência e informação, projeta uma taxa de crescimento neste mercado de 9,1% ao ano, atingindo US\$ 6 bilhões em 2016 (GLOBAL..., 2012).

Segundo Sá-Pereira *et al.* (2008), baseado no estudo *World Enzymes to 2009*, elaborado pela empresa de consultoria Freedonia Group Incorporated, as celulases e lipases estão entre as principais enzimas de aplicação industrial. Estima-se que a demanda mundial por lipases em 2014 será de US\$ 530 milhões, enquanto para celulases de US\$ 430 milhões. Os autores reportam que a aplicação destas enzimas na produção de biocombustíveis é um dos fatores que impulsionarão o crescimento da demanda mundial.

O mercado de enzimas é um oligopólio e conta com a participação de 3 principais fornecedores de enzimas, a Novozymes A/S (sede na Dinamarca), Genencor International Inc. (sede nos EUA) e DSMNV (sede na Holanda), sendo que a maior fornecedora é a Novozymes com uma participação no mercado estimada em 47%, em 2009 (FOCUS..., 2011).

No Brasil existem duas empresas produtoras de enzimas, a Bioenzima Indústria e Comércio Ltda, com capital 100% nacional, localizada em Caruaru (PE) e a Novozymes Latin America Ltda., resultado da fusão da brasileira Novo Industri com a dinamarquesa Nordisk Gentoft, em 1989, e localizada em Araucária (PR).

As empresas produtoras de enzimas fornecem suas formulações para diversos setores, e algumas delas, como a Novozymes, a Genencor e a Transbiodiesel têm investido na elaboração de formulações enzimáticas mais eficientes para produção de biocombustíveis.

PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas podem ser obtidas a partir de fontes animal, vegetal e microbiana. As de origem microbiana são as mais utilizadas atualmente, em virtude do rápido crescimento dos microrganismos, da facilidade de manipulação genética e também por não dependerem de características sazonais, como é o caso das de origem vegetal e nem de processos complexos de separação e purificação, como é o caso das células animais (HASAN *et al.*, 2006).

A produção de enzimas microbianas ocorre por meio de processos fermentativos que diferem entre si por uma série de fatores, tais como o indutor da produção da enzima, o microrganismo utilizado e as condições de processo. Assim, muitas variáveis são possíveis de serem estudadas a fim de se desenvolver processos mais eficientes e de menor custo.

O processo industrial de produção de enzimas por microrganismos, selvagens ou recombinantes, consiste em um conjunto de operações de processo que incluem o tratamento da matéria-prima, o preparo de meios para inóculo e produção, a esterilização e a transformação do substrato em produto por via bioquímica, seguida pela etapa de separação, e normalmente, concentração. Dependendo da finalidade de aplicação da enzima, pode ser necessária também uma etapa de purificação.

A matéria-prima é um dos componentes de maior custo na produção das enzimas, podendo, em alguns casos, corresponder a até 75% do custo final do produto (SCHMIDELL,

2001). A otimização do meio de cultivo para obtenção do máximo de rendimento é uma tarefa árdua, mas pode render muitos frutos, se conseguir reduzir o custo do produto.

A matéria-prima, em alguns casos já contém o indutor da síntese da enzima de interesse, mas caso isto não ocorra, é necessário adicioná-lo, visto que a maioria das enzimas comerciais são obtidas por processos de indução, e não de forma constitutiva. As enzimas constitutivas são aquelas cuja síntese não depende da presença de nenhuma substância específica, enquanto para a produção das enzimas induzidas é necessária a presença de tal substância, chamada indutor. No caso deste capítulo, para produção de celulases é necessário o uso de indutor que contenha celulose na sua composição, já para lipases a presença de compostos lipídicos no meio de cultivo induzirá sua produção.

A produção industrial de enzimas utiliza normalmente culturas puras, portanto todo o processo de produção é conduzido sob condições assépticas, havendo necessidade de algum tipo de esterilização do meio de cultivo. Industrialmente, o mais comum é a esterilização simultânea de meios de cultura e do biorreator, por processo de esterilização descontínuo (ou batelada). Neste processo, ocorre a passagem de vapor saturado sob pressão por serpentinas ou camisas (aquecimento indireto) ou o vapor saturado é introduzido pelo difusor do vaso, sob agitação (aquecimento direto). A temperatura utilizada para a esterilização é 121 °C. Já o ar de processo, normalmente, é esterilizado em sistemas de filtração antes de entrar no sistema.

As duas principais tecnologias para a produção de enzimas são a fermentação submersa (FS) e a fermentação no estado sólido (FES). Os sistemas diferem entre si em relação à quantidade de água disponível no meio de fermentação (MUDGETT, 1986).

Na fermentação submersa o meio é constituído basicamente por água e nutrientes nela dissolvidos (Figura 7A). As técnicas de cultivo submerso têm se beneficiado dos avanços da instrumentação e controle de processos e são bastante utilizados para o cultivo de microrganismos recombinantes, que vem sendo crescentemente empregados para a produção de enzimas. Porém, este tipo de fermentação não é adequado para todo o tipo de matéria-prima/substrato e microrganismo.

A FES é definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, no qual o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos. Nestes casos, a matéria-prima funciona como um suporte do microrganismo, dos substratos, do produto e da água adicionada para umedecer o suporte (Figura 7B). Apesar de gotas de água poderem estar presentes entre as partículas, e poder haver finos filmes de água na superfície das partículas, a fase aquosa é descontínua e a maior parte do espaço inter-partículas é preenchida pela fase gasosa, facilitando o processo de transferência de oxigênio (LONSANE *et al.*, 1985). Em virtude da semelhança ao seu habitat natural, fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados para este tipo de fermentação.



Figura 7. A. Fermentação submersa em escala de bancada. **B.** Fermentação no estado sólido em escala de bancada.

O uso da técnica de FES oferece vantagens sobre a FS, dentre as quais, a simplicidade do meio, principalmente para países com abundância de biomassa e de resíduos agroindustriais como o Brasil, e o uso de reatores menores, proporcionando economia de espaço. Destaca-se, ainda, a possibilidade dos rendimentos serem maiores que os obtidos em FS, além da ausência de formação de espuma, menor demanda de energia e, especialmente, a facilidade de controle de contaminação proporcionada pela baixa quantidade de água no sistema (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

A utilização da FES privilegia a sustentabilidade ambiental e o uso racional dos recursos, já que, na maioria dos casos, são empregados resíduos agrícolas e industriais. Porém, existem alguns gargalos que dificultam a implementação desta tecnologia em escala industrial, como: problemas de acessibilidade e disponibilidade do substrato, transferência de oxigênio, e principalmente, as dificuldades em regular os fatores físicos como pH, temperatura e umidade (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

A FES é utilizada em escala industrial somente para a produção de alimentos fermentados tradicionais, como molho de soja, por exemplo. Para a produção de bioprodutos como enzimas, biopesticidas e outros metabólitos, sua aplicação tem sido estudada mais recentemente, e ainda requer um considerável trabalho de pesquisa para ser utilizado em plantas industriais (KHANAHMADI *et al.*, 2006).

Portanto, a tecnologia utilizada industrialmente para produção de enzimas ainda é a FS, que tem como grandes vantagens a homogeneidade dos sistemas fermentativos; a relativa facilidade na transferência de calor e de massa; a facilidade na quantificação celular; e ainda, o melhor controle de condições de cultivo como temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido. Além disso, existem muitas informações sobre a cinética e fenômenos de transporte, e desenho de reatores muito bem configurados, além do conhecimento de técnicas de monitoramento e controle já bem estabelecidas se comparado à FES.

A produção industrial de enzimas por FS é conduzida em biorreatores aerados e agitados mecanicamente (Figura 8), em geral com volumes de 20 a 200 m³, chegando até a 1.000 m³, dependendo do tipo de enzima a ser produzida. O microrganismo, agente da fermentação, se desenvolve no seio do meio líquido, sob agitação, e o ar é suprido por borbulhamento no líquido através de um compressor. Tais fermentadores apresentam, basicamente, camisas ou serpentinas internas para as necessidades de aquecimento e refrigeração e sistemas de medidas, como sensores de pH, temperatura e oxigênio dissolvido (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

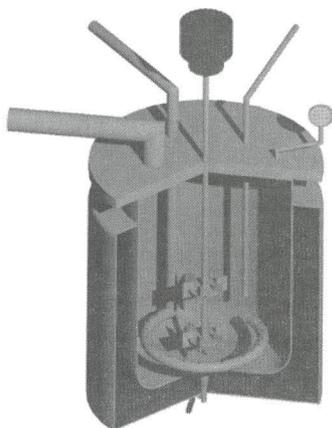


Figura 8. Biorreator aerado e agitado mecanicamente.

A FS pode ser conduzida de diversas formas dependendo do microrganismo, do meio de cultivo e do produto que se pretende obter. Porém, de forma simplificada e generalizada existem três modos de operação para FS: descontínuo ou batelada simples, descontínuo alimentado ou batelada alimentada e contínuo. No sistema de batelada simples, o inóculo é inserido no meio de cultivo contido no biorreator, e aguarda-se o final do processo fermentativo quando então o meio fermentado é retirado e segue para as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto. No sistema de batelada alimentada uma corrente de alimentação que pode conter a fonte de carbono e/ou fonte de nitrogênio, vitaminas, dentre outros componentes, é adicionada ao biorreator ao longo do processo fermentativo, sem que efluente e células sejam removidos do sistema. Já no modo contínuo, ao longo de todo o processo fermentativo, uma corrente de alimentação é adicionada ao sistema, enquanto o meio fermentado é retirado e segue para as etapas de recuperação do produto (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Os dois sistemas em batelada são os mais utilizados para produção industrial de enzimas, embora a batelada alimentada tenha superado o uso da batelada simples. A possibilidade de adição gradual da fonte de carbono como ocorre no processo alimentado, permite contornar os problemas de inibição/repressão causados pelo substrato durante a síntese de várias enzimas, como as celulasas e amilases. Além disso, tem sido a técnica escolhida para a síntese de enzimas heterólogas produzidas por microrganismos geneticamente modificados (BON *et al.*, 2008b).

Após o processo fermentativo, são iniciadas as etapas de *downstream* para obtenção do produto final. Dependendo da finalidade da aplicação da enzima, ela pode ser comercializada

sob a forma de extratos enzimáticos brutos, como é o caso das celulases e lipases para aplicação em biocombustíveis; extratos parcialmente purificados; até enzimas altamente purificadas.

Pelo fato de a maioria das enzimas comerciais serem extracelulares, a primeira etapa do processo de recuperação do produto é separar as células do microrganismo do meio de cultivo, o que pode ser feito por filtração ou centrifugação. No entanto, para as enzimas intracelulares há necessidade de ruptura das células do microrganismo produtor e adição de etapas subsequentes que consigam separar a enzima dos fragmentos celulares.

Como na fermentação submersa a quantidade de líquido é grande, e, portanto, as enzimas ficam diluídas, geralmente há necessidade de concentrá-las, o que pode ser feito por processos de evaporação, precipitação, ultrafiltração ou liofilização, em condições que não causem desnaturação das enzimas. Caso as enzimas tenham uma finalidade na qual as impurezas possam interferir no processo, como o uso medicinal e em química fina, estas devem ser extremamente puras. Para a purificação do produto podem ser utilizadas técnicas como cristalização, cromatografia e extração líquido-líquido (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2001).

A maioria dos extratos enzimáticos comerciais possui além da enzima, compostos que auxiliam na preservação da atividade da enzima ao longo da estocagem, como estabilizantes e conservadores. Este assunto será tratado com detalhes no capítulo “Estabilização de enzimas para o desenvolvimento de formulações líquidas”. A adição de diluentes que padronizem os valores de atividade entre as diferentes bateladas de produção, garantindo a padronização do produto para venda, também é comum (BON *et al.*, 2008b).

O uso de enzimas em escala comercial ainda é proibitivo para alguns processos industriais devido ao seu alto custo. Uma das alternativas para baixar o custo da catálise enzimática é usar enzimas imobilizadas sobre substratos sólidos, aumentando assim sua taxa de utilização.

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas é uma técnica que tem como objetivo fixar enzimas a suportes inertes insolúveis. Convencionalmente, enzimas são imobilizadas em matrizes sólidas, embora sejam também utilizados alguns polímeros que podem ser solúveis ou insolúveis dependendo do pH, temperatura ou adição de espécies químicas. Uma das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização da preparação enzimática, que tem implicações no custo do processo catalisado enzimaticamente, além de possibilitar a execução de processos contínuos e a fácil separação da enzima dos produtos. Um exemplo de indústria que utiliza bastante enzimas imobilizadas é a farmacêutica.

Segundo Forde e Ó'Fágáin (2008), as técnicas de imobilização podem ser classificadas em quatro tipos básicos: ligação ao suporte, confinamento, encapsulamento e ligação inter-cruzada (Figura 9).

- a) Os métodos classificados como “ligação ao suporte” pressupõem a “ligação” da enzima ao suporte por meio de ligações covalentes, ligações iônicas ou adsorção (por interações iônicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo ou interações hidrofóbicas).
- b) Os métodos baseados em confinamento da enzima envolvem a polimerização de materiais orgânicos ao redor da proteína, resultando no confinamento da enzima

em uma matriz física. Apesar de ser um bom método para manter a conformação das enzimas, tem a desvantagem de dificultar a difusão dos substratos por entre os poros da matriz do suporte.

- c) A técnica do encapsulamento consiste na imobilização da enzima no interior de esferas não rígidas, formada por polímero geleiforme e semipermeável ou em membranas fibrosas semipermeáveis, de forma que a enzima fique aprisionada em uma dada região da solução. Este tipo de imobilização também acarreta limitações difusionais.
- d) A ligação intercruzada (*crosslinking*) entre moléculas da enzima é um tipo de imobilização sem suporte. Este procedimento se baseia na produção de agregados tridimensionais de enzimas insolúveis em água por meio de reagentes bi ou multifuncionais, que se ligam covalentemente às moléculas de enzima. O reagente mais comumente utilizado para o *crosslinking* intermolecular é o glutaraldeído. Este método também tem como desvantagem a dificuldade de difusão dos substratos.

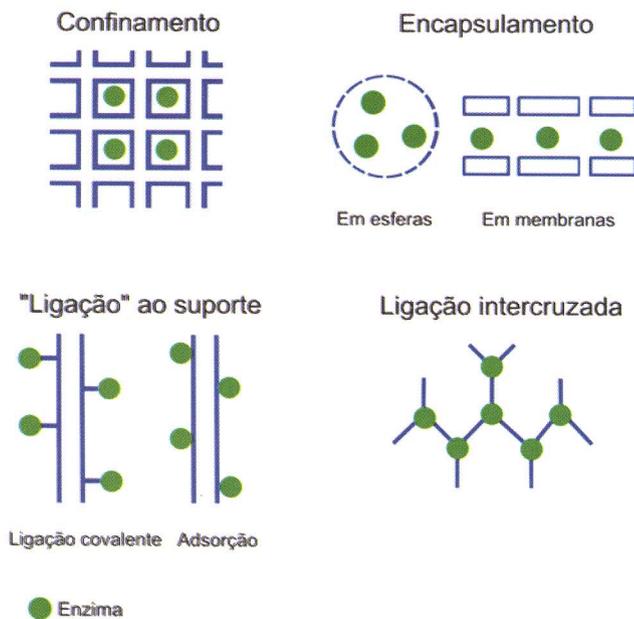


Figura 9. Métodos de imobilização de enzimas.

LIPASES E CELULASES: DEFINIÇÃO, ESTRUTURA, PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO PARA FINS AGROENERGÉTICOS

Lipases

As lipases constituem um dos grupos de catalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas. Estas enzimas são muito atrativas devido a três principais aspectos: 1) sua alta seletividade (quanto ao grupo funcional e quanto à formação de determinado isômero

estrutural ou espacial); 2) a possibilidade de serem obtidas em grandes quantidades a partir de microrganismos; e 3) a estrutura cristalina de várias lipases já terem sido elucidadas, facilitando sua modificação por engenharia genética (JAEGER; EGGERT, 2002).

As lipases têm uma gama de aplicações industriais, sendo utilizadas em vários setores como: alimentício (COUTO; SANROMÁN, 2006), cosmético, oleoquímico, farmacêutico e de detergentes (SHARMA *et al.*, 2001).

Lipases (glicerol éster hidrolases E. C. 3.1.1.3) são enzimas que têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol. Entretanto, em ambientes aquo-restritos, as lipases têm se mostrado muito ativas em reações de esterificação, transesterificação, inter-esterificação, alcoólise e aminólise (Figura 10).

Reação de Hidrólise



Reação de Esterificação



Reações de Transesterificação

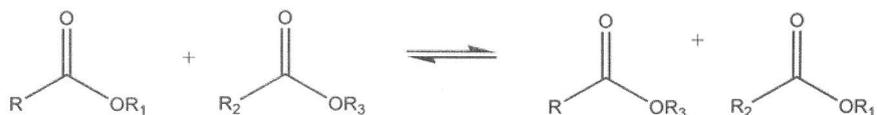
Alcoólise



Acidólise



Interesterificação



Aminólise

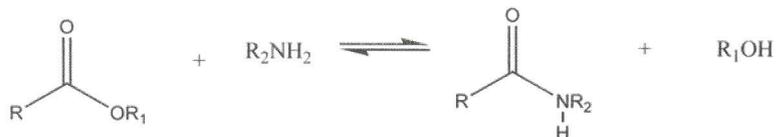


Figura 10. Reações catalisadas por lipases.

A ação catalítica das lipases é bastante complexa e a estrutura da enzima ao redor do sítio ativo varia significativamente de uma lipase para outra. Entretanto, existem aspectos estruturais que são comuns para todas as lipases: a tríade catalítica, formada por resíduos de serina, histidina e aspartato (ou glutamato) (JAEGER *et al.*, 1994) e um dobramento característico na conformação α/β hidrolase, que também é encontrado em esterases, proteases e haloperoxidases (OLLIS *et al.*, 1992).

Além dos resíduos do sítio ativo, outra região importante é o sítio de ligação de Ca^{+2} , que é coordenado por seis átomos de oxigênio, sendo quatro átomos da proteína e dois de moléculas de água. Acredita-se que este seja um importante sítio para forçar a permanência de algumas ligações peptídicas na conformação *cis*, o que beneficiaria a proteína na manutenção de algumas ligações de hidrogênio (SCHRAG *et al.*, 1997).

As reações lipolíticas ocorrem em interfaces água/óleo. Um fenômeno bem conhecido de reações lipolíticas é o aumento da atividade das lipases na presença de emulsões de substratos insolúveis. Esse fenômeno ficou conhecido como “ativação interfacial”. A elucidação das estruturas tridimensionais das lipases trouxe uma explicação para a ativação interfacial: na maioria das lipases, existe uma parte da molécula da enzima que cobre o sítio ativo com uma curta α -hélice, e é chamada *flap* ou *lid* (tampa). O lado da “tampa” voltado para o sítio catalítico, assim como as cadeias protéicas ao redor deste, são compostos principalmente por cadeias laterais hidrofóbicas. Em ambientes aquosos, sem o seu substrato natural, a “tampa” está cobrindo o sítio catalítico, a lipase é inativa, e diz-se que ela está na sua forma fechada. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são adsorvidas na interface hidrofóbica, o que promove mudanças dramáticas na estrutura enzimática, levando à forma aberta da lipase, deixando a enzima ativa. Mais recentemente, descobriu-se que a presença da *lid* não era correlacionada com o fenômeno da ativação interfacial, visto que foram descobertas muitas exceções. Exemplos são as lipases de *Burkholderia glumae*, *Candida antarctica* B e *Pseudomonas aeruginosa*, que não possuem o efeito da ativação interfacial, apesar de conterem a *lid* (JAEGER; REETZ, 1998). Outras lipases, como a de *Staphylococcus hyicus*, mostram ativação interfacial somente com alguns substratos (VERGER, 1997). Por outro lado, as cutinases não apresentam a *lid* e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (CYGLER; SCHRAG, 1997). Assim, a presença da *lid* e o fenômeno da ativação interfacial, ao contrário do que se considerava há alguns anos, não são critérios adequados para se classificar uma enzima como lipase. A definição atualmente aceita é simples: lipase é uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (JAEGER; REETZ, 1998).

O tamanho exato da cadeia carbônica do substrato para que a enzima seja considerada uma lipase verdadeira não é um fator bem definido. Enquanto Rhee *et al.* (2005), por exemplo, consideram que uma lipase é verdadeira quando hidrolisa substratos com cadeias carbônicas maiores do que 10, outros autores consideram lipases verdadeiras aquelas que atuam em substratos com cadeias com mais de 8 carbonos (COTE; SHARECK, 2008). As lipases, entretanto, são também capazes de hidrolisar os substratos das esterases, ou seja, triacilgliceróis de cadeia curta. No entanto, as esterases não são capazes de hidrolisar os substratos de cadeia longa.

As lipases podem ser obtidas a partir de animais, de plantas e de microrganismos, porém, assim como outras enzimas, as lipases microbianas são as mais utilizadas. Os microrganismos

produtores de lipase podem ser encontrados em diversos habitats, tais como: resíduos industriais, solo contaminado com óleo, óleos vegetais processados de fábricas, etc.

Os referidos microrganismos incluem bactérias, leveduras, actinomicetos e fungos, sendo os últimos os mais aplicados em processos industriais (MAHADIK *et al.*, 2002). Os fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Thermomyces*, as leveduras do gênero *Candida* e as bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Burkholderia* são utilizados para produção industrial de lipases (PAQUES; MACEDO, 2006; JAEGER; REETZ, 1998). Com a evolução da biologia molecular, os genes de algumas lipases fúngicas têm sido clonados e expressos em microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.

Geralmente, as enzimas de interesse industrial são produzidas na presença de indutores. No caso de lipases, a presença de triacilgliceróis, surfactantes, óleos vegetais e resíduos de indústrias de óleos no meio de cultivo induz a produção da enzima (SALUM *et al.*, 2010, DAMASO *et al.*, 2008).

As lipases são comercializadas nas suas formas livre ou imobilizada. Exemplos de lipases comerciais são mostrados na Tabela 8. Como citado anteriormente, alguns genes de lipases, por meio de técnicas de engenharia genética, são obtidos de seus hospedeiros e expressos em outros microrganismos, dando origem a lipases heterólogas. Várias lipases são produzidas em *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* como hospedeiros.

Tabela 8. Exemplos de lipases comerciais.

Nome comercial	Empresa	Microrganismo	Suporte
Lipozyme TL IM	Novozymes	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	sílica
Lipozyme RM IM	Novozymes	<i>Rhizomucor miehei</i>	resina de troca iônica macroporosa
Novozyme 435	Novozymes	<i>Candida antartica B</i>	resina acrílica macroporosa
Lipase PS – IM	Amano	<i>Burkholderia cepacia</i>	terra diatomácea
Lipase PLC	Meito Sangyo	<i>Alcaligenes sp.</i>	terra diatomácea
Lipozyme TL 100L	Novozymes	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	nenhum
Palatase	Novozymes	<i>Rhizomucor miehei</i>	nenhum
Lipolase100 L	Novozymes	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	nenhum
Novozymes CALA L	Novozymes	<i>Candida antartica A</i>	nenhum
Novozymes CALB L	Novozymes	<i>Candida antartica B</i>	nenhum
Lipase AK	Amano	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	nenhum
Lipase G 50	Amano	<i>Penicillium camembertii</i>	nenhum

As lipases atualmente disponíveis no mercado foram desenvolvidas para sua utilização na indústria alimentícia, de detergentes, entre outras. Portanto, elas não são adequadas para a produção de biodiesel, sendo, então, necessária a prospecção de microrganismos que produzam lipases estáveis em meios aquo-restritos e contendo álcool, assim como a realização de melhoramento genético de microrganismos produtores deste tipo de lipase.

A Embrapa Agroindústria de Alimentos e a Embrapa Agroenergia em parceria com instituições brasileiras (UFRJ, UFRRJ, UCB, UnB) e internacionais de pesquisa e ensino têm atuado na seleção de microrganismos produtores de lipases, por meio de isolamento tradicional de microrganismos do meio ambiente e de resíduos (MOREIRA *et al.*, 2009), bem como seleção a partir de suas coleções de microrganismos (DAMASO *et al.*, 2008). Além destas estratégias, também têm sido utilizadas técnicas de metagenômica para construção de biblioteca de clones contendo partes de DNA isolados do solo do cerrado (CASTRO *et al.*, 2011). De posse desta biblioteca, está sendo realizada a seleção de linhagens para produção de lipases e a caracterização destas enzimas.

A produção de lipases utilizando principalmente FES também está sendo estudada por grupos da Embrapa, porém ainda em escala de bancada: frascos cônicos, bandejas e em sistema de colunas aeradas. Os agentes da fermentação são, em sua maioria, fungos filamentosos e, como indutores do processo de síntese, estão sendo testadas borras de refino de óleos vegetais como milho, girassol e canola (SANTOS, 2012; MURUCI *et al.*, 2011; DAMASO *et al.*, 2008). As lipases selecionadas nestes estudos serão testadas na produção de biodiesel por rota enzimática, em escala de bancada.

Em relação às lipases imobilizadas, matrizes de natureza diversa têm sido utilizadas, como por exemplo, poliestireno, alginato, sílica gel, resinas aniônicas, alumina, polipropileno, agarose, celite, terra diatomácea, entre outros. Dependendo da natureza do suporte, a enzima estará “ligada” de forma diferente. Especificamente para a síntese de biodiesel é considerada bastante importante a utilização de lipases imobilizadas, a fim de reduzir o custo desta catálise, uma vez que este é um dos principais, senão o principal entrave para a produção de biodiesel por rota enzimática.

A adsorção é o método mais empregado para a imobilização de lipases. O processo de imobilização por adsorção, além de ser relativamente fácil e barato, possui a vantagem de poder ser realizado em condições amenas sem perda significativa de atividade. Por outro lado, como as forças de interação entre o suporte e a enzima são fracas, pode haver a dessorção da enzima durante o processo catalítico. Esse efeito já não ocorre quando se imobiliza lipases por ligação covalente (TAN *et al.*, 2010).

As lipases parecem ter uma tendência natural de serem adsorvidas em diferentes superfícies hidrofóbicas, como por exemplo, gotas de óleo (seu substrato natural), superfícies hidrofóbicas de suportes, bolhas de gás, proteínas hidrofóbicas e lipopolissacarídeos, embora sua hidrofobicidade, em geral, não seja maior do que a da maioria das enzimas (PALOMO *et al.*, 2005). O que ocorre é que lipases possuem regiões hidrofóbicas, ou seja, resíduos de aminoácidos hidrofóbicos concentrados em uma determinada região, que fazem com que haja uma interação desta com o suporte hidrofóbico. Apesar dos diversos tipos de imobilização existentes, devido à hidrofobicidade relativamente alta de algumas regiões das lipases,

a simples adsorção destas em suportes hidrofóbicos adequados tem sido a estratégia mais popular de imobilização deste tipo de enzima.

Vários trabalhos sobre imobilização de lipases têm utilizado géis frágeis e de alto custo, baseados em matrizes hidrofílicas. Entretanto, o uso de lipases imobilizadas em tais géis restringe a sua aplicação industrial em larga escala. Lipases para a aplicação industrial precisam ser imobilizadas em suportes rígidos e estáveis (PETKAR *et al.*, 2006).

Uma vantagem da imobilização é que muitas vezes ela leva a um aumento da estabilidade térmica (PALOMO *et al.*, 2002; FORESTI *et al.*, 2005) e da atividade das lipases. O aumento de atividade tem sido atribuído a diversos fatores, como o espalhamento da enzima pela ampla área superficial do suporte, prevenindo a agregação das moléculas, o que facilita o acesso aos substratos (PERSSON *et al.*, 2002). Outro fator seria a adsorção das lipases em suportes hidrofóbicos de forma que as áreas hidrofóbicas ao redor do sítio ativo são envolvidas na imobilização, deixando a lipase estabilizada em sua forma aberta, aumentando a atividade enzimática (MATEO *et al.*, 2007).

Por outro lado, o processo de imobilização também pode levar à inativação de certa fração de moléculas de lipase. Isto pode ocorrer devido à distorção da estrutura terciária da enzima causada pela interação enzima-suporte. Além disso, a lipase pode interagir com o suporte de forma que o sítio ativo fique escondido, impedindo que o substrato o alcance (SALIS *et al.*, 2008).

Como fruto de parceria entre a Embrapa Agroindústria de Alimentos e a Escola de Química/UFRJ está sendo testada a estratégia de imobilização de uma lipase, produzida por *Aspergillus niger* mutante, em suporte vítreo para utilização em biossensores visando avaliação da qualidade de biodiesel (MELLO *et al.*, 2011).

Celulases

As celulases têm uma ampla variedade de aplicações industriais, sendo utilizadas como componente de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal (BHAT, 2000). Além disso, as celulases são indispensáveis na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, via rota enzimática.

As celulases constituem uma classe de enzimas responsáveis pela hidrólise do polímero insolúvel de celulose, cuja estrutura se forma pela união de moléculas de β -glicose (uma hexosana) por meio de ligações β -1,4-glicosídicas. O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose mais aceito atualmente descreve a ação sinérgica de pelo menos três classes de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glicosidases ou celobiasas (ZHANG; LYND, 2004).

As endoglucanases são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise, causando mudança rápida no grau de polimerização por meio da hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose. Tais enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando

oligossacarídeos (LYND *et al.*, 2002). Já as exoglucanases são enzimas que atuam na porção cristalina da molécula de celulose e catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose, liberando celobiose das extremidades das cadeias. As exoglucanases são também conhecidas como celobiohidrolases (CBH). A CBH ainda pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose). O terceiro grupo das enzimas do complexo celulolítico engloba as enzimas β -glicosidásicas, ou β -glicosídeo glucohidrolases, que é seu nome sistemático. As β -glicosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com grau de polimerização menor que 7) em glicose. Assim como as celobiohidrolases, as β -glicosidases também sofrem inibição por seu produto de hidrólise (LYND *et al.*, 2002). O mecanismo de ação dessas enzimas será detalhado no capítulo deste livro “Catálise enzimática para desconstrução da biomassa lignocelulósica”.

As celulasas são enzimas que possuem massas moleculares relativamente elevadas, e, em geral, se apresentam na forma glicosilada, com um teor de carboidratos que pode variar de cerca de 1% até 50% da massa total da enzima. A estrutura dessas enzimas pode ser dividida em três regiões: o domínio catalítico (DC), que abrange cerca de 90% do número total de aminoácidos da sequência peptídica e é a localização da molécula onde a catálise efetivamente ocorre; a região de ligação (RL), na qual está contida uma quantidade pequena de aminoácidos, no entanto altamente glicosilados, cuja função é apenas a de ligar o domínio catalítico à terceira região, que compreende o módulo de ligação a carboidratos (MLC) (CASTRO, 2006). As principais funções dos MLCs são: a) aproximar e manter a enzima próxima à superfície do substrato de forma a aumentar a taxa de degradação do polissacarídeo, b) aumentar a especificidade da enzima na atuação de regiões seletivas da molécula de substrato e, c) romper interações químicas da cadeia do substrato, especialmente se essa se apresentar com elevada cristalinidade (CASTRO, 2006).

Recentemente, as enzimas que atuam sobre os carboidratos presentes na biomassa vegetal, juntamente com seus respectivos módulos de ligação a carboidratos (MLC), foram agrupadas em famílias com base nas suas respectivas sequências e as informações depositadas em um banco de dados chamado *Carbohydrate-Active Enzymes* (Cazy – <http://www.cazy.org/>) (CANTAREL *et al.*, 2009). O número de famílias é constantemente atualizado, sendo que um número expressivo de glicosil hidrolases (GHs) contém enzimas que contribuem para a desconstrução da parede celular vegetal. A Tabela 9, adaptada de XU *et al.* (2007), mostra algumas famílias de celulasas descritas no servidor *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZY), bem como as principais características dessas enzimas.

Sistemas celulolíticos completos são produzidos por vários microrganismos, como bactérias e fungos. As bactérias celulolíticas incluem as aeróbias, como *Pseudomonas* e *actinomicetos*, anaeróbias facultativas, como *Bacillus* e *Cellulomonas* e anaeróbias estritas, como *Clostridium*. A produção de celulasas por fungos é amplamente disseminada na natureza, incluindo fungos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

Vários trabalhos têm sido direcionados para a seleção ou desenvolvimento de microrganismos produtores de celulasas, incluindo programas baseados em seleção natural e mutagênese e

também a produção de microrganismos geneticamente modificados (DILLON *et al.*, 2006). O fungo *Trichoderma reesei* é o microrganismo mais estudado, pois produz altas concentrações do complexo enzimático hidrolítico. No entanto, a quantidade de β -glicosidases contida no complexo é relativamente baixa, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação (KIM *et al.*, 1997). Nesse sentido, a utilização do fungo *Aspergillus niger* tem sido apontada como alternativa para superar esta desvantagem, podendo ser avaliada em fermentações com culturas simples ou em coculturas.

A obtenção de preparados com alta atividade celulolítica depende do microrganismo utilizado e do processo de produção das enzimas. O formulado ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases; pela produção em separado das celulases e posterior mistura dos extratos, em proporções pré-otimizadas; ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulases em organismos hospedeiros, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

Tabela 9. Números da classificação das enzimas (CE) e famílias das celulases.

E.C.#	Reação	Outros Nomes	Família
E.C.3.2.1.4 celulase	Endohidrólise de ligações 1,4- β -D-glicosídica em celulose, lichenina e cereais com ligações β -D-glucanos.	Endoglucanase, Endo-1,4- β -glucanase, Carboximetilcelulase, Endo-1,4- β -D-glucanase, β -1,4-glucanase, β -1,4-endoglucanase, hidrolase, Celodextrinase, Avicelase	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 45, 48, 51, 61, 74
E.C.3.2.1.6 Endo-1,3(4)- β -glucanase	Endohidrólise de ligações 1,3- ou 1,4- em β -D-glucanos quando o resíduo de glicose cujo grupo redutor está envolvido na ligação a ser hidrolisada é substituído no C-3	Endo-1,4- β -glucanase, Endo-1,3- β -glucanase, Laminarinase	16
E.C.3.2.1.21 β -glicosidase	Hidrólise dos resíduos de β -D-glucose terminais, não redutores com a liberação de β -D-glicose.	Gentiobiase, Celobiase, Amigdalinaase	1, 3, 9
E.C.3.2.1.91 celulose 1,4- β - celobiosidase	Hidrólise de ligações 1,4- β -D-glicosídica em celulose e celotetraose, liberando celobiose a partir das extremidades não redutoras das cadeias	Exoglucanase, Exo-celobiohidrolase, 1,4- β -celobiohidrolase	5

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

A produção de celulases e outras enzimas acessórias por meio de cultivo de fungos compõem sistemas estritamente aeróbios, que são realizados em diferentes tipos de biorreatores, tanto em FS quanto em FES (escala de bancada ou piloto). Grande parte dos avanços na produção de celulases microbianas foi desenvolvida para FS, apesar de o crescimento de fungos filamentosos produtores de celulases ocorrer no meio ambiente em condições similares à FES (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Diferentes condições de cultura resultam em diferentes morfologias de crescimento de fungos e, conseqüentemente, afetam a produção da enzima. A influência do pH e da temperatura, tipo de meio nutriente, cultivos de culturas mistas, e tipo de biorreator tem sido investigados. Em vários estudos, os indutores de celulase tais como celulose, lactose, ou vários lignoceluloses foram adicionados ao meio de cultivo para a produção de celulase. A escolha do substrato indutor é um dos principais fatores que influenciam a produção de celulase. Estudos de hidrólise enzimática da biomassa utilizando diferentes coquetéis enzimáticos tem indicado que a utilização de substratos lignocelulósicos, em lugar de outros indutores comerciais, tais como carboximetil celulose ou lactose, podem contribuir para a especificidade do coquetel enzimático e, com isso, melhorar a eficiência da hidrólise.

A glicose é outra fonte de carbono geralmente utilizada em cultivos submersos para crescimento de fungos filamentosos para a produção de celulases. Sua adição nos meios de cultivo em concentrações adequadas pode favorecer a produção enzimática. No entanto, quando adicionada em excesso pode causar repressão catabólica. A presença de glicose inibe diretamente a ação das β -glicosidasases, o que pode gerar acúmulo de celobiose. Tanto a glicose quanto a celobiose, além de serem substratos, são também reconhecidos como possíveis inibidores das endoglucanases e celobiohidrolases e também da β -glicosidase (ANDRIC *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a utilização do bagaço de cana-de-açúcar como indutor para a produção de celulases por linhagens fúngicas apresenta vantagens em relação a outros tipos de indutores. Além de ser um indutor barato para a produção enzimática, outro motivo faz com que a utilização da lignocelulose seja atrativa: o fato de que a escolha do substrato indutor afeta as características do coquetel enzimático produzido. Portanto, quando se trata de cultivos cujo objetivo é produzir enzimas para aplicação específica na hidrólise do bagaço de cana na cadeia do etanol celulósico, o bagaço de cana como indutor favorece o direcionamento das características do coquetel enzimático.

A demanda por celulases está em constante ascensão devido a suas diversas aplicações. Existem várias empresas envolvidas na produção de celulases para as indústrias têxtil, de detergentes, indústrias de papel, entre outras. As duas grandes empresas, Genencor e Novozymes, que têm investido na produção de celulases para a aplicação na conversão de biomassa, têm desempenhado um papel significativo em reduzir o custo destas enzimas (SINGHANIA *et al.*, 2010). A Tabela 10 mostra as principais empresas produtoras de celulases comerciais, as diferentes preparações enzimáticas e sua fonte de origem.

Apesar da redução significativa dos custos das celulases nos últimos anos, a produção de etanol celulósico em escala comercial ainda necessita de contínuas pesquisas para melhorar diversos aspectos técnicos e econômicos sobre a produção e ação das celulases.

Tabela 10. Exemplos de celulases comerciais produzidas a partir de cultivo de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Nome comercial	Empresa	Microrganismo
Cellubrix (Celluclast)	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> <i>A. niger</i>
Novozymes 188	Novozymes	<i>A. niger</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Rohament CL	Rohm-AB Enzymes	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Viscostar 150L	Dyadic	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Multifect CL	Genencor Intl.	<i>T. reesei</i>
Bio-feed beta L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Energex L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Ultraflo L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Viscozyme L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Cellulyve 50L	Lyven	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
GC 440	Genencor-Danisco	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
GC 880	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Spezyme CP	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
GC 220	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i>
Accelerase®1500	Genencor	<i>T. reesei</i>
Cellulase AP30K	Amano Enzyme	<i>A. niger</i>
Cellulase TRL	Solvay Enzymes	<i>T. reesei</i> <i>T. longibrachiatum</i>

Continua...

Tabela 10. Continuação.

Nome comercial	Empresa	Microrganismo
Econase CE	Alko-EDC	<i>T. reesei</i> <i>T. longibrachiatum</i>
Cellulase TAP106	Amano Enzyme	<i>T. viride</i>
Biocellulase TRI	Quest Intl.	<i>T. reesei</i> <i>T. longibrachiatum</i>
Biocellulase A	Quest Intl.	<i>A. niger</i>
Ultra-low microbial (ULM)	logen	<i>T. reesei</i> <i>T. longibrachiatum</i>

Fonte: Singhanian *et al.* (2010).

Na Embrapa vários esforços estão sendo realizados nesse sentido. A Embrapa Agroenergia, Embrapa Agroindústria de Alimentos, a Embrapa Florestas, a Embrapa Agroindústria Tropical e a Embrapa Instrumentação em parceria com instituições brasileiras de ensino e pesquisa têm atuado na seleção de microrganismos produtores de celulases, por meio de isolamento tradicional de microrganismos do meio ambiente, bem como seleção a partir de suas coleções de microrganismos (DELABONA *et al.*, 2012; DAMASO *et al.*, 2012). Esse assunto é tratado em mais detalhes no capítulo “Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para a produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis”.

A produção de celulases utilizando tanto FS como FES também está sendo estudada por estes grupos da Embrapa, porém ainda em escala de bancada: frascos, bandejas, sistema de colunas aeradas e em reatores mecanicamente agitados. Os agentes da fermentação são, principalmente, fungos filamentosos, incluindo basidiomicetos. Várias composições de meios de cultivo e variáveis de processo estão sendo avaliados visando melhorar a produção de celulases (ZILLY *et al.*, 2012; FAHEINA JUNIOR, 2012; DAMASO *et al.*, 2012; FARINAS *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-ZUNIGA *et al.*, 2011).

A Embrapa Agroenergia, em parceria com instituições brasileiras (UCB, UnB) e internacionais de pesquisa e ensino, tem atuado na seleção de genes codificadores de celulases utilizando técnicas de metagenômica. Já foram construídas bibliotecas de clones a partir de amostras de rúmen de caprinos e solo da Amazônia, e estes clones estão sendo avaliados quanto à produção de diversas enzimas. Este assunto é tratado mais detalhadamente no capítulo “Metagenômica para prospecção de enzimas visando a produção de biocombustíveis”.

Em outra linha de pesquisa relacionada a tecnologias inovadoras para produção de celulases, pesquisadores da Embrapa Instrumentação em parceria com o Departamento de Engenharia Química da UFSCar desenvolveram um processo não convencional para a produção de celulases cujos resultados foram bastante promissores (CUNHA *et al.*, 2012a; CUNHA *et al.*, 2012b). Estudos inovadores foram realizados no desenvolvimento de um sistema de produção de celulases em um processo de fermentação combinada a fim de unir as vantagens dos processos fermentativos no estado sólido e no estado submerso em um

único processo, operando-se sistemas trifásicos em biorreatores pneumáticos. O substrato sólido da FES foi inicialmente fermentado até a fase de produção de micélios para então ser utilizado como um inóculo da FS. Desta forma, os custos envolvidos com o meio da FS podem ser reduzidos, uma vez que o próprio meio da FES é utilizado também na FS. Valores de produtividade aproximadamente 3 vezes maiores em comparação com fermentação submersa convencional foram obtidos utilizando o sistema proposto, oferecendo, assim, uma alternativa promissora para a produção de celulases.

Algumas celulases selecionadas nos estudos citados já estão sendo testadas na produção de etanol celulósico, em escala de bancada.

Em relação à aplicação de técnicas de imobilização de celulases, sabe-se que existem estudos neste tema sendo conduzidos para aplicação destas enzimas para algumas finalidades industriais. Entretanto, quase não há relatos na literatura de uso de celulases imobilizadas para fins de produção de etanol celulósico, devido, principalmente à dificuldade de recuperação da enzima, visto que neste caso, as celulases atuam sobre substratos sólidos. Um projeto de pesquisa que visa aplicar as enzimas celulolíticas imobilizadas na hidrólise de biomassa para produção de etanol celulósico está sendo desenvolvido na Embrapa Agroenergia (RODRIGUES *et al.*, 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As indústrias produtoras de enzimas têm investido fortemente desde o desenvolvimento de culturas microbianas mais produtivas utilizando, principalmente, técnicas de engenharia genética, até o desenvolvimento de tecnologias mais avançadas em reatores de grande escala. Estas empresas possuem centros de PD&I que atuam em toda a cadeia de produção, obtendo extratos enzimáticos que apresentam alta atividade e eficiência catalítica para cada tipo de aplicação específica a que se destina a enzima, podendo assim chegar à demonstração do seu potencial industrial.

Apesar das iniciativas de industrialização, a produção do biodiesel por rota enzimática e a produção de etanol celulósico ainda não têm sido adotadas em larga escala para a comercialização. Existem vários avanços econômicos e técnicos necessários para que essas tecnologias comecem a ser utilizadas de fato.

O principal problema apontado para a produção industrial de biodiesel e de etanol por rota enzimática é a falta de viabilidade econômica, principalmente devido ao alto custo do biocatalisador. Para a redução do custo de produção das enzimas, alguns gargalos precisam ser vencidos, como a produção de enzimas mais ativas a partir da seleção de novas linhagens de microrganismos, melhoramento de microrganismos ou produção em sistema heterólogo. Além disso, há a necessidade de se buscar meios de cultivo mais baratos e estudar possibilidades de reutilização dos biocatalisadores.

No Brasil existem dificuldades adicionais para implantação da rota enzimática aos diversos processos industriais, como os de produção de biocombustíveis. As indústrias de capital internacional são as principais produtoras de enzimas, fazendo com que o custo de utilização

destes catalisadores no país seja ainda mais alto, pelo fato de a maioria ser importada. Além disso, apesar de muitos centros de pesquisa e universidades nacionais terem experiência e *know-how* dentro da cadeia de produção das enzimas, este processo se restringe à escala de bancada, quiçá piloto, faltando interlocução entre estes setores e as empresas. Faltam também investidores nacionais que queiram implantar comercialmente o processo.

Uma alternativa que tem sido vislumbrada e que pode ser aplicada para tentar tornar a produção comercial de etanol e de biodiesel por rota enzimática economicamente viável é a produção das enzimas dentro do conceito de biorrefinaria. Nesta concepção, processos que atualmente não são economicamente viáveis podem se tornar, a partir do aproveitamento integral e integrado de todos os materiais e correntes de dentro de uma usina. Desta forma, caso a enzima pudesse ser produzida *in loco*, utilizando fontes materiais (fonte de carbono e indutores) e de calor gerados nesta biorrefinaria, haveria uma redução no custo de produção das enzimas favorecendo a viabilização dos processos de produção de biocombustíveis por rota enzimática.

REFERÊNCIAS

- ANDRIĆ, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P. A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**. Review, v. 28, n. 3, p. 308-324, 2010.
- BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008a. 506 p.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 2008b. p. 433-462.
- CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-D238, 2009.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CASTRO, A. M. A. **Produção e Propriedades de Celulasas de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2006. 212 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2006. Orientadores: Nei Pereira Jr. e Selma Gomes Leite.
- CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; ALLEN, H.; WILLIAMSON, L.L.; HANDELSMAN, J.; KRUGER, R. H. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 2169-2175, 2011.
- COTE, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 5, p. 381-388, 2008.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. **Journal of Food Engineering**, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.
- CUNHA, F. M.; BACCHIN, A. L. G.; HORTA, A. C. L.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Indirect method for quantification of cellular biomass in a solids containing medium used as pre-culture for cellulase production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 100-108, 2012a.
- CUNHA, F.M.; ESPERANÇA, M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Sequential Solid-State and Submerged Cultivation of *Aspergillus niger* on Sugarcane Bagasse for the Production of Cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012b.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. **Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases**. In: Lipases, Part A., 1997.
- DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 676-681, 2008.

DAMASO, M. C. T.; TERZI, S. C.; FARIAS, A. X.; OLIVEIRA, A. C. P.; FRAGA, M. E. ; COURI, S. Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 513-520, 2012.

DELABONA, P. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DILLON, A. J. P.; ZORGI, C.; CAMASSOLA, M.; HENRIQUES, J. A. P. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 70, p. 740-746, 2006.

FAHEINA JR., G. S. **Produção de celulases por fermentação submersa utilizando fungos prospectados em coleções de cultura nacionais**. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE. Orientador: Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.

FARINAS, C. S.; VITCOSQUE, G. L.; FONSECA, R. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, 2011.

FOCUS ON CATALYSTS, jan. 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=272724&_user=687350&_pii=S1351418010705146&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2011-01-31&wchp=dGLbVIVzSkWz&md5=6742c7d91bf69e54bbf86a4dac8b2ddb/1-s2.0-S1351418010705146-main.pdf>. Acesso em: 22 maio 2012.

FORDE, J.; Ó'FÁGÁIN, C. Immobilized enzymes as industrial biocatalysts. In: FLYNNE, W. G. (Ed.) **Biotechnology and Bioengineering**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2008. p. 9-36.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 69-77, 2005.

GILBERT, H. J. The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 444-455, 2010.

GLOBAL MARKETS FOR ENZYMES IN INDUSTRIAL APPLICATIONS, Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>>. Acesso em: 22 maio 2012.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VANHEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **Fems Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

KHANAHMADI, M.; MITCHELL, D. A.; BEHESHTI, M.; ROOSTAAZAD, R.; SANCHEZ, L. R. Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flow pattern. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 8, p. 2675-2687, 2006.

- KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR. A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. São Paulo, SP: Edgar Blücher, 2001. p. 493-522.
- KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 63-67, 1997.
- LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid-state fermentation. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 7, n. 6, p. 258-265, 1985.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN, Z. Y. L.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, p. 506-577, 2002.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- MELO, A. F.; MAURICIO, E.F.; SALGADO, A. M.; PESSOA, F. L. P.; DAMASO, M. C. T.; COURI, S. Assessment of Catalytic Properties in Aqueous and Media of *Aspergillus niger* lipase immobilized on supports vitreous. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 973-978, 2011.
- MOLINARI, H. B. C.; SILVA, A. S.; TEIXEIRA, R. S. S.; BARCELOS, C. A.; PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. Matérias-primas sacaríneas e lignocelulósicas para biorrefinarias. In: VAZ JR., S. (Ed.). **Biorrefinarias: cenários e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. p. 45-65.
- MOREIRA, C. G.; DAMASO, M. C. T.; Valadão, R. C.; COURI, S. Screening of lipolytic filamentous fungi and study of lipase production using three different reactors. In: International Technical Symposium on Food Processing, 5, 2009, Potsdam, Alemanha. **Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management**, 2009. p. 892-895.
- MUDGETT, R. E. Solid-state fermentation. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N.A (Ed.). **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. American Society for Microbiology. 1986, p.66-82.
- MURUCI, L.N.M.; SANTOS, L.O.; COURI, S.; PENHA, E. M.; DAMASO, M. C. T. Melhoria da Produção de Lipase de *Aspergillus niger* em Fermentação Semi-sólida Utilizando Subprodutos Agroindustriais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011, Caxias do Sul. CD-ROM, 7 p.
- OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The Alpha/beta-hydrolyse fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.
- PALOMO, J. M.; MUNOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B – Enzymatic**, Amsterdam, v. 19, n. especial, p. 279-286, 2002.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 83-90, 2006.

RAGHAVARAO, K. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127-135, 2003.

RHEE, J. K.; AHN, D. G.; KIM, Y. G.; OH, J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 817-825, 2005.

RODRIGUES, D. S.; MACHADO, C. M. M.; GONÇALVES, S. B.; DAMASO, M. C. T.; SALUM, T. F. C.; POLETO, C. M.; MENDES, T. D.; PACHECO, T.F. Projeto de Pesquisa: Aplicação de enzimas celulolíticas imobilizadas na hidrólise de biomassa para a produção de etanol de segunda geração. **Edital UNIVERSAL-CNPq N° 14/2011**.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

SÁ-PEREIRA, P.; DUARTE, J. C.; FERRARA, M. A.; LACERDA, P. S. B.; ALVES, F. C. Biotálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 2008. p. 433-462.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11, **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-1354, 2010.

SANT'ANNA JUNIOR., G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blücher, 2001. v. 3, p. 351-366.

SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. 98f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. Orientadores: Lucielen dos Santos e Monica Caramez Triches Damaso.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP: Edgar Blücher, 2001. v. 2, p. 179-192.

SCHMIDELL, W. Microorganismos e meios de cultura para utilização industrial. *In*: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.). **Biociologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP: Edgar Blücher, 2001. v. 2. p. 5-18.

SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187-202, 1997.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

TAN, TIANWEI; LU, JIKE; NIE, KAILI; DENG, LI; WANG, FANG. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, 2010.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

XU, Q.; ADNEY, W.S.; DING, S-Y.; HIMMEL, M.E. Cellulases for Biomass Conversion. *In*: POLAINA, J. (Ed.). **Industrial enzymes**. McCabe, Springer, 2007. p. 315-337.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZILLY, A.; BAZANELLA, G. C. S.; HELM, C. V.; ARAÚJO, C. A. V.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1573-1580, 2012.