

# *Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática*

Valdirene N. Monteiro & Roberto do Nascimento Silva

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma reação e que são aplicadas industrialmente. Os processos catalisados por enzimas são geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis. As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbiana. Estão presentes em vários processos industriais como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose. O mercado mundial de enzimas industriais representa 60% do mercado de enzimas. O surgimento de novos campos de aplicação de enzimas e o desenvolvimento de novas tecnologias que utilizem enzimas industriais é esperado para os próximos anos.

**Palavras-chave:** *Biotecnologia enzimática, processos químicos, enzimas industriais.*

Enzymes are proteins specialized in catalysis of biological reactions that accelerate the velocity of reaction and that are applied industrially. The processes catalyzed by enzymes are often faster, efficient and environmentally sustainable. The enzymes can be obtained from vegetal, animal and microbial sources. The enzymes participate in various industrial processes such as in food, textile, cellulose and paper and pharmaceutical industries. The global market of industrial enzymes represents 60% of the enzymes market. The appearing of new fields of enzyme applications and the development of new technologies that use enzymes are expected for the upcoming years.

**Keywords:** *Enzymatic biotechnology, industrial processes, industrial enzymes.*

## INTRODUÇÃO

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem. Muitas dessas reações são catalisadas por catalisadores químicos que podem ser substituídos por enzimas. As enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, principalmente por serem ecologicamente mais viáveis. A cada dia presenciamos mais processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores, dentre as quais se destacam enzimas na área de alimentos, saúde humana e animal e bens como papel e indústria têxtil.

Diante desse fato, a pesquisa de novas enzimas ou o melhoramento do desempenho de catálise de enzimas já conhecidas se faz necessário. A busca de microrganismos que possam produzir essas enzimas é constante e várias técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para utilização nesse processo. Talvez a maior dificuldade da indústria seja encontrar enzimas que possam suportar algumas condições industriais como variação de temperatura e pH. Outro grande desafio é o desenvolvimento de pesquisas na própria indústria. O grande abismo que existe entre as empresas e os centros de pesquisas universitários dificulta ainda mais a produção de enzimas industriais. No Brasil, essa situação tende a diminuir uma vez que o Governo Federal instituiu a produção e desenvolvimento de enzimas como área estratégica de desenvolvimento.

Nesse contexto, existe um aumento mundial no consumo de enzimas industriais. O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, além de apresentar um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países. Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática faz-se necessário.

Na presente revisão abordaremos uma análise técnica científica do uso de enzimas em processos industriais, ressaltando as áreas de maior uso e demanda como as indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose. Abordaremos também a produção e as novas técnicas utilizadas na descoberta de novas enzimas. Por fim faremos uma análise do mercado das principais enzimas utilizadas em indústria e os setores da aplicação em relação à importação e exportação de enzimas.

## ENZIMAS COMO CATALISADORES BIOLÓGICOS

Enzimas são catalisadores biológicos, em sua maioria de origem protéica que catalisam a maioria das reações em organismos vivos. Talvez as enzimas sejam as moléculas biológicas usadas há mais tempo pelo homem, mesmo que de forma inconsciente, na produção de pães e vinho, na antiguidade. A ciência que estuda as enzimas é denominada de enzimologia. O termo enzima foi introduzido pela primeira vez por volta de 1878 por Willian Kühne (do grego *en* = dentro *zyme* = levedura) para designar as substâncias contidas nos extratos de levedura usados em fermentação. Em 1897, Eduard Buchner descobriu que os extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até álcool e provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas das células vivas, o que lhe renderia o prêmio Nobel de Química em 1907. Porém, um dos grandes momentos da enzimologia aconteceu em 1926, quando James Summer isolou e cristalizou a urease e demonstrou sua origem protéica. Em 1930, Northrop e Stanley realizaram estudos mais detalhados de cristalografia de três enzimas digestivas, a pepsina, a tripsina e a quimotripsina, o que os levou ao recebimento de um Prêmio Nobel da Química mais tarde, em 1946. A partir dessa data, com o desenvolvimento de novas técnicas de cristalografia e, sobretudo a tecnologia do DNA recombinante, várias enzimas foram isoladas, purificadas e cristalizadas. Hoje temos o conhecimento de estrutura e função de mais de duas mil enzimas de origem animal, vegetal e microbiana.

Devido aos grandes avanços no isolamento e identificação de novas enzimas, em 1956 a União Internacional de Bioquímica criou uma Comissão Internacional de Enzimas para estabelecer critérios para a nomenclatura e a classificação das enzimas, a fim de se evitar a nomenclatura aleatória de uma mesma enzima estudada por diferentes pesquisadores. As enzimas foram divididas em seis classes de acordo com o tipo de reações que catalisam:

- i. Oxirredutases: catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons
- ii. Transferases: transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre moléculas
- iii. Hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligação covalente

- iv. Liases: adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando dupla ligação
- v. Isomerases: reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos
- vi. Ligases: condensação de duas moléculas, sempre às custas de energia, geralmente do ATP

Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “E.C.” (Enzyme Commission), que é composto por 4 dígitos:

- i. Classe
- ii. Sub-classe dentro da classe
- iii. Grupos químicos específicos que participam da reação.
- v. A enzima propriamente dita

Frente aos catalisadores químicos, as enzimas possuem algumas vantagens que justificam seu amplo uso:

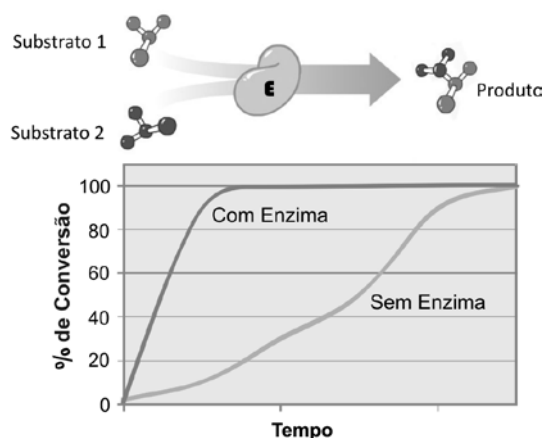
- i. São produtos naturais biológicos e biodegradáveis
- ii. Têm alta especificidade nas reações
- iii. Não são consumidas durante o processo
- iv. Aumentam a velocidade das reações por diminuir a energia de ativação
- v. São estereoespecíficas
- vi. Atuam em pH e temperaturas brandas

Os reagentes que participam das reações catalisadas pelas enzimas são denominados de substratos. Efetivamente, quando se compara a conversão de um substrato em produto catalisado por enzima e outro por um catalisador químico, observa-se uma rápida conversão com o uso das enzimas. Além disso, as enzimas não alteram o equilíbrio químico das reações e aceleram uma reação reversível em ambos os sentidos<sup>1</sup> (Figura 1).

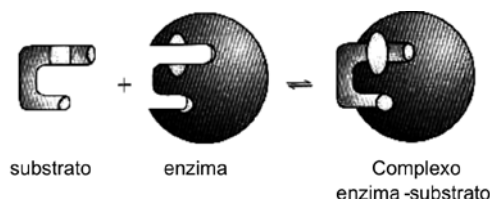
Talvez uma das características mais importantes das enzimas seja sua alta especificidade. Em 1894, Emil Fischer postulou que essa especificidade se deve ao fato de que tanto as enzimas quanto os substratos são complementares geometricamente, um modelo que ficou conhecido com modelo “chave-fechadura” (Figura 2).

Apesar das vantagens no uso de enzimas em processos industriais, algumas desvantagens são observadas, dentre elas a sensibilidade das enzimas a variações de pH e temperatura. O efeito do pH na atividade das enzimas se dá devido ao fato de essas serem formadas por grupos

químicos, na sua maior parte aminoácidos, que podem sofrer ionizações e adquirir cargas momentâneas, o que promove uma mudança conformacional da estrutura da enzima, afetando o modelo “chave-fechadura”. Já a temperatura influencia a atividade enzimática, no sentido de aumentar a energia cinética das moléculas e conseqüentemente aumentando a probabilidade de encontro entre a enzima e o substrato. Porém, a altas temperaturas a maioria das enzimas sofre mudanças conformacionais devido ao rompimento de ligações e interações fracas, um processo denominado de desnaturação que, para o caso da temperatura, é um processo irreversível. Cada enzima possui um valor ótimo de pH e temperatura, no qual a atividade da enzima é máxima (Figura 3).



**Figura 1:** Esquema e curva de conversão de substrato em produto catalisado na presença e na ausência de enzima. E= enzima.



**Figura 2:** Modelo de complementaridade estrutural (chave-fechadura de Emil Fisher).

Considerando uma reação catalisada por uma enzima, em seu sentido mais simples, existe um único substrato formando um único produto. Todavia, nem sempre esse sistema é tão simples assim. Existem processos onde uma reação química envolve varias enzimas e formação de vários produtos com participação de coenzimas e cofatores, que

são moléculas às vezes requeridas para o funcionamento da enzima. Em todo caso uma reação enzimática pode ser descrita como se segue abaixo:



Onde:

E = enzima

S = substrato

ES = complexo enzima-substrato

P = produto

K1, K2, Kp = constantes de equilíbrios

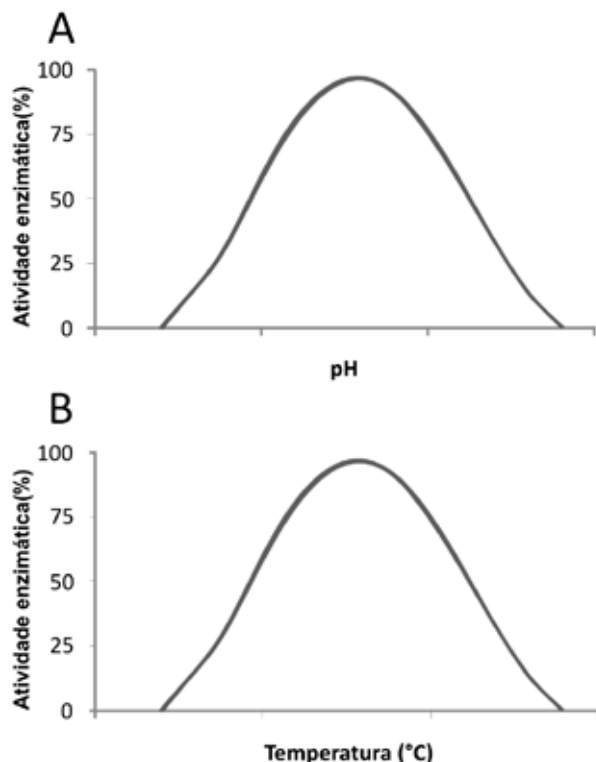


Figura 3: Gráficos esquemáticos do efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade enzimática.

Esse mecanismo de reação foi estudado primeiramente em 1902 por Victor Henri, que propôs uma teoria quantitativa de cinética enzimática e posteriormente, em 1909, por Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten,

sendo esta cinética conhecida como cinética de Henri-Michaelis-Menten<sup>2</sup>. A equação desenvolvida por esses cientistas é de grande valia no campo da enzimologia industrial, pois permite cálculos de velocidade e medidas de afinidade de ligação entre enzimas obtidas por diferentes fontes e um determinado substrato. A atividade de uma enzima pode ser descrita em termos de  $V_{max}$ , ou seja, a quantidade máxima de produto formado num determinado tempo, e também da constante de Michaelis-Menten,  $K_M$ , que representa a concentração de substrato na qual se detecta uma velocidade de reação igual a metade de  $V_{max}$  (Figura 4).

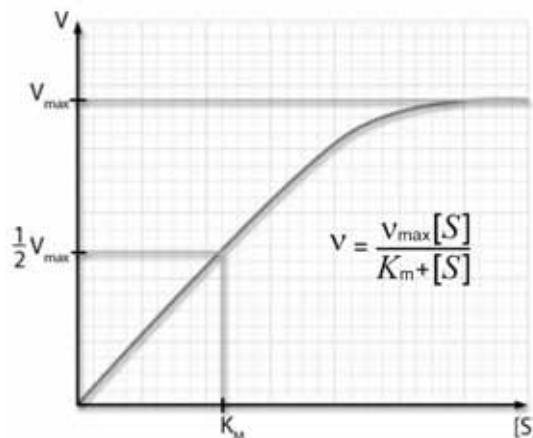
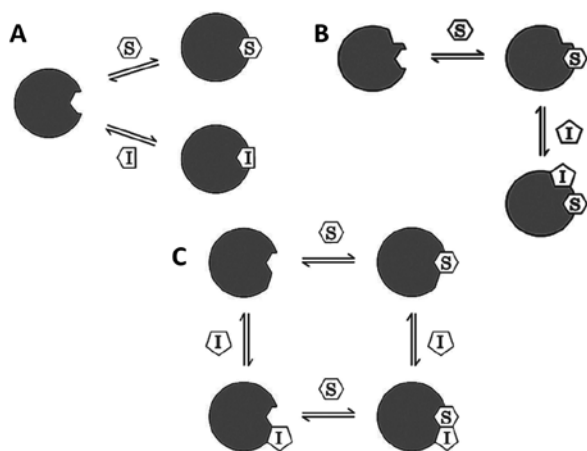


Figura 4: Curva de saturação numa reação enzimática, mostrando a relação entre a concentração de substrato ([S]) e a velocidade (V), bem como a equação de Henri-Michaelis-Menten.

Outro fator importante na catálise enzimática e que é explorado comercialmente é a inibição enzimática. As enzimas podem ser inibidas por substâncias que se ligam à enzima livre ou ao complexo enzima-substrato ou competem pelo sítio catalítico da enzima. O resultado final é uma diminuição ou abolição da atividade enzimática.

Um inibidor competitivo se liga à enzima livre e impede a ligação da mesma ao seu substrato. Neste caso, o substrato e o inibidor possuem semelhanças estruturais. Na inibição competitiva, a velocidade máxima da reação não é alterada, e ocorre um aumento no valor de  $K_m$  (Figura 5A). Existe ainda a inibição acompetitiva, onde o inibidor não liga à enzima no estado livre, mas sim ao complexo enzima-substrato e neste caso o complexo fica inativo (Figura 5B). Existem ainda casos onde os

dois tipos de inibição podem ocorrer ao mesmo tempo, chamado de inibição mista, representada na figura 5C.



**Figura 5:** Esquema da inibição enzimática competitiva (A), acompetitiva (B) e mista (C). S= substrato; I= inibidor.

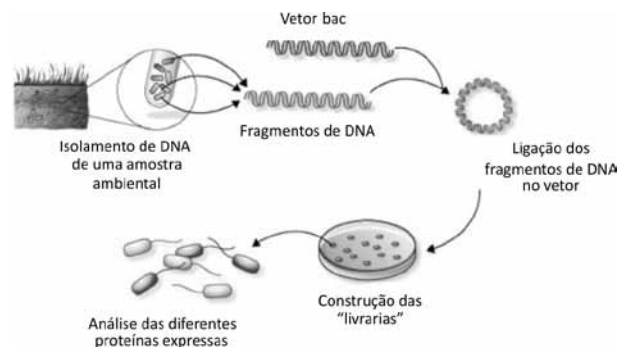
## PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Há milhares de anos, as enzimas vêm sendo utilizadas em processos tradicionais. Esses biocatalisadores podem ser extraídos de tecidos animais, vegetais e de microrganismos. Embora as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais sejam muito utilizadas, as de origem microbiana são mais utilizadas por várias razões como, por exemplo: produção independente de fatores sazonais, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas e o fato de o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante<sup>3</sup>.

A tecnologia do DNA recombinante é um conjunto de técnicas com ampla aplicação. São técnicas que podem produzir mudanças genéticas em microrganismos melhorando aspectos bioquímicos e fisiológicos e que possam ser exploradas comercialmente. Mas recentemente são conhecidas as plataformas ômicas, a Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica, que são ferramentas que permitem a descoberta de novas enzimas<sup>4,5</sup>.

Recentemente, a metagenômica vem sendo utilizada para a busca de microrganismos produtores de enzimas

de interesse industrial. A metagenômica é o estudo simultâneo do DNA de uma comunidade inteira de microrganismos. Essa técnica se baseia na extração de DNA de todos os microrganismos existente em uma comunidade em determinado ambiente. Esse extrato contém milhões de fragmentos randômicos de DNA que podem ser clonados e mantidos em bactérias utilizadas no laboratório para desenvolver “bibliotecas” que incluem os genomas de todos os microrganismos encontrados naquele habitat natural<sup>6</sup>.



**Figura 6:** Representação esquemática da técnica de metagenômica.

As possibilidades do uso industrial de enzimas podem ser ampliadas quando se trata de microrganismos extremofílicos do domínio Archea. Esses microrganismos habitam lugares atípicos com temperaturas superiores a 100° C, concentração salina elevada, valores de pH muito baixos ou muito elevados abaixo de 2,0 e acima de 10,0 respectivamente ou mesmo sob condições de estresse nutricional. Dessa forma, extremozimas produzidas por esses microrganismos recebem atenção especial, pois essas proteínas apresentam potencial industrial considerável oferecendo melhores rendimentos sob condições operacionais extremas. Além do exemplo mais marcante que é a enzima taq polimerase, de *Thermus aquaticus*, amplamente utilizada em procedimentos de PCR (Reação de Polimerização em Cadeia), temos também o emprego dessas enzimas em detergentes e na indústria de alimentos. Além disso, são largamente clonadas e caracterizadas<sup>3,7</sup>.

A obtenção de microrganismos que produzam enzimas com aplicação industrial pode ser feita de várias maneiras, tais como isolamento a partir de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de

mutantes naturais, obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética<sup>9</sup>.

Após a obtenção do microrganismo, este é cultivado em fermentadores para a produção de quantidades industriais do biocatalisador. Nesse caso, é fundamental a otimização do meio de cultivo. Esses fatores a serem otimizados são: pH e temperatura, condições de aeração e agitação adequada.

O processo fermentativo industrial consiste de várias etapas, que são divididas em: operações de upstream (pré-tratamento da matéria-prima), que são as etapas pré-fermentação, ou seja, as que antecedem a operação do reator e cuja finalidade é colocar o sistema nas condições previamente escolhidas, para que as transformações, no reator, se desenvolvam em condições ótimas; e operações de downstream (obtenção do produto), que são as etapas que ocorrem após a fermentação e que englobam a separação e purificação dos produtos e subprodutos obtidos, bem como o tratamento dos resíduos formados<sup>10</sup>.

O processo fermentativo começa com a escolha do agente biológico adequado (microrganismo ou enzima); segue com a transformação da matéria-prima, em condições que podem exigir esterilização, aeração e controle do processo (pH, temperatura etc.); e finaliza com a separação e purificação do produto final<sup>11</sup>.

Dois métodos de fermentação podem ser usados para produção de enzimas, a fermentação submersa e a fermentação em substrato sólido<sup>7,12</sup>.

A fermentação em estado sólido (FES) ou em meio sólido (FMS) ou ainda em substrato sólido (FSS) pode ser definida como aquela que ocorre em substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água. Porém, os substratos devem conter umidade suficiente para que possa ocorrer o crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do microrganismo<sup>13</sup>. Esse tipo de fermentação provavelmente é o mais antigo utilizado pelo homem. Em países orientais, esse método de fermentação data de 1000 a.C. Nessa época, já eram produzidos, entre outros, bebidas alcoólicas e molho à base de soja. Foi no final do século XIX que as atenções foram novamente voltadas para os processos fermentativos em meio sólido, com a produção da enzima Takadiastase oriunda do fungo *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo como substrato, produzida por

Takamine<sup>14</sup>.

Os substratos utilizados são produtos agrícolas como arroz, trigo, painço, cevada, milho e soja, além dos substratos não-convencionais como cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo e palha de arroz<sup>7</sup>.

Amilases, proteases, xilanases, celulases e pectinases, entre outras, são produzidas por fermentação em meio sólido. Os microrganismos que mais se adaptam a esse tipo de fermentação são os fungos filamentosos por apresentarem hifas e boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica<sup>15</sup>.

A fermentação em estado sólido apresenta vantagens como: a utilização de substratos com baixo valor agregado, adição de nutrientes suplementares ao substrato, volume do meio reduzido, menor investimento em biorreatores, os esporos dos fungos podem ser usados diretamente na inoculação, não necessitando de etapas prévias de pré-cultivo, o crescimento dos fungos ocorre em condições semelhantes ao seu habitat natural, a baixa atividade de água reduz problemas de contaminação, aeração facilitada devido ao maior espaço entre as partículas e pela difusão do oxigênio na água para umidificar o meio, altos rendimentos na formação de metabólitos e facilidade nas etapas de purificação<sup>16,17,18,19</sup>.

Por outro lado, esse tipo de fermentação apresenta restrições quanto a sua aplicação como: restrição a microrganismos que são capazes de crescer em sistemas com baixa umidade e dificuldade no controle dos parâmetros da fermentação, sobretudo em controlar a elevada temperatura gerada pela atividade metabólica dos microrganismos. São fatores devidos, na maioria dos casos, à dificuldade de homogeneização do meio reacional e também pelos problemas difusionais. Esses são problemas típicos de processos que envolvem os meios sólidos<sup>20,18,21</sup>.

O processo de fermentação submersa (FS) consiste na introdução do microrganismo em meio líquido na forma de um inóculo. Nesse processo, o meio fica contido em fermentadores providos e controlados de agitação e aeração medidores de pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos microrganismos<sup>22</sup>.

Os processos de fermentação submersa foram



utilizados amplamente no mundo todo com a produção de antibióticos, devido à importância da penicilina durante a Segunda Guerra mundial.

A fermentação pelo método de cultura submersa é executada em fermentadores fechados, equipados com agitadores, dispositivos de aeração para introdução de ar estéril e camisas e serpentinas para o controle de temperatura. E se o processo de fermentação submersa exigir assepsia, esta se consegue mediante a esterilização do meio (dentro ou fora do fermentador), a desinfecção ou esterilização do equipamento por injeção de vapor ou mediante o calor gerado por serpentinas, sendo essa medida extensiva a todos os ductos de entrada e saída e às válvulas correspondentes e a esterilização do ar mediante filtros adequados<sup>11</sup>.

Comparados com os processos em superfície, os processos submersos oferecem várias vantagens como: facilidade na manipulação, maiores volume de meio, a massa de microrganismo fica totalmente submersa no meio de maneira uniforme, a absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são executados com mais eficiência, o que acarreta menor tempo de fermentação e, conseqüentemente, maior produtividade<sup>7</sup>.

A segunda parte dos bioprocessos é a seção de recuperação do produto (Downstream processing). Essa fase compreende a separação e purificação do produto e deve-se atentar para os aspectos citológicos e fisiológicos do microrganismo em questão onde a fisiologia microbiana indica tanto a geração como a localização do produto. Se o produto é excretado, as etapas de

recuperação seguem um roteiro diferente daquele produto que não é excretado, ou seja, intracelular<sup>7</sup>. Para o produto que não é excretado há a necessidade de romper a estrutura celular sendo importante a escolha de técnicas adequadas para a liberação do produto.

A opção pela operação de separação será influenciada pelo tamanho do próprio bioprocessos e pelo valor do produto. O grau de pureza dependerá da opção do produto, extrato bruto ou enzima purificada. O produto final poderá apresentar nas formas; cristalizado, liofilizado ou líquido concentrado. A seqüência de operações pelas quais o meio contendo a substância a ser separada deve passar para obtenção de um produto de alta pureza constitui-se, basicamente, de quatro etapas: remoção do material insolúvel, isolamento primário, purificação e isolamento do produto final. A remoção do material insolúvel se dá por filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação. O isolamento primário se dá pela extração por solventes, precipitação e ultracentrifugação<sup>7,12</sup>.

O processo de purificação destina-se a remoção de impurezas bem como a concentração do produto. Pode-se optar pelos vários tipos de cromatografia, a adsorção ou a precipitação fracionada. A última etapa, o isolamento do produto final, compreende a formulação final ou comercialização direta. As operações incluem centrifugação e subsequente secagem de um produto cristalizado, liofilizado ou seco por spray drying<sup>3,7,9</sup>. A Figura 7 resume todas as etapas utilizadas na produção e purificação de enzimas de interesse industrial.

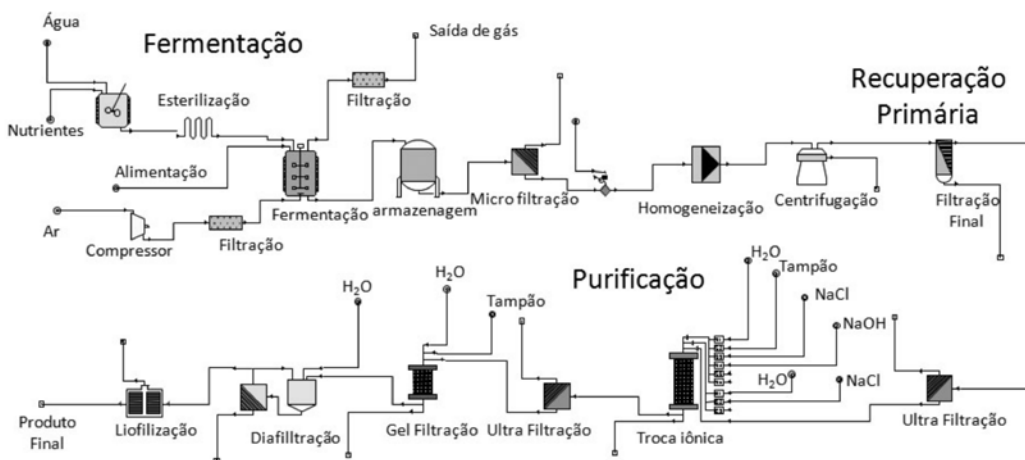


Figura 3: Gráficos esquemáticos do efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade enzimática.

## ENZIMAS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

As enzimas vêm sendo utilizadas há muitos séculos na indústria alimentícia. Um exemplo é o dos pastores da antiguidade que observaram que, ao guardar leite no estômago de um animal degolado, se produzia um alimento sólido, conhecido hoje como queijo. Plínio (23-79 d.C.) narrava ter visto um soldado romano que mexia o leite com uma rama de figueira. A enzima era a ficina, responsável pela solidificação. Os microrganismos, através de suas enzimas, também apresentam uma grande importância econômica e social para a produção de bebidas e alimentos. A fermentação alcoólica, por exemplo, é conhecida desde 3500 a.C. e a produção de vinho já se encontrava em seu apogeu entre os egípcios e assírios. Os babilônios, em 2800 a.C., preparavam cerveja de pão ou cevada malteada<sup>23</sup>.

A produção de enzimas industriais para uso no processamento de alimentos data de 1874, quando Christian Hansen extraiu a renina de estômagos secos de bezerros para fabricação de queijo. Atualmente, a quimosina é produzida por microrganismos que sofrem modificações pela tecnologia do DNA recombinante na qual o gene proquimosina bovina foi inserido na *Escherichia coli* K-12 e a enzima aprovada para uso em alimentos pelo Food and Drug Administration (FDA). Muitas enzimas usadas em alimentos são derivadas de microrganismos recombinantes como  $\alpha$ -amilases e proteases obtidas de microrganismos recombinantes como *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*<sup>24</sup>.

Embora as enzimas sejam utilizadas na indústria de alimentos por terem as propriedades de inocuidade, eficiência e adequação às matérias-primas utilizadas, apenas poucas variedades de enzimas, na maioria hidrolases, são usados em grande escala. Assim, amilases ( $\alpha$ -amilases e glicoamilases), proteases (quimosina, papaína, bromelina e pepsina) e pectinases possuem uso consagrado dentre as hidrolases e a glicose-isomerase como representante de enzimas de larga utilização dentro das isomerases<sup>7,25,26,27,28</sup>.

Na panificação, as enzimas são utilizadas para promover a decomposição do amido, função realizada pela  $\alpha$ -amilase, levando à formação de maltose, o que aumenta a maciez e a textura da massa e do miolo, mantendo o pão fresco por mais tempo. A xilanase dá

estabilidade à massa, enquanto que a protease altera a elasticidade e a textura do glúten e melhora a cor e o sabor do pão. No processamento de amidos, enzimas como glicose isomerase, alfa-amilase, beta-amilase, pululanase e isoamilase convertem o amido em dextrose ou xaropes ricos em açúcares simples. As  $\alpha$ -amilases bacterianas são mais utilizadas para o preparo de massas doces para bolos, biscoitos e crackers por serem mais estáveis a temperaturas. Essas são utilizadas para a hidrólise do amido em maior grau diminuindo a viscosidade<sup>29</sup>.

As proteases estão presentes na indústria de laticínios com a utilização da quimosina, que promove a coagulação do leite (para a produção de queijos), e a lactase, que decompõe a lactose em açúcares mais simples, impedindo assim, a tendência que a lactose possui para adsorção de odores, além de ser higroscópica, causando o endurecimento de laticínios em pó. As lipases são utilizadas na produção de alguns queijos como o roquefort. No amaciamento da carne são usadas proteases como papaína, bromelina e ficina<sup>30,31</sup>.

Na indústria de sucos de frutas, a pectinase facilita a extração, clarificação e filtração do suco e promove a desgeleificação da polpa durante a maceração e extração do suco, proporcionando a diminuição da viscosidade. Age desestabilizando as substâncias floculantes, provoca coagulação e precipitação com conseqüente clarificação<sup>17</sup>, a celulase liquefaz o tecido vegetal e permite extrair pigmentos do fruto e a glicoamilase decompõe o amido, evitando turvação e gelatinização durante o processamento. No caso das bebidas destiladas, a  $\alpha$ -amilase e a glicoamilase decompõem o amido. No caso dos vinhos, a pectinase facilita a prensagem, a filtração e a clarificação e reduz o tempo de processamento. Nos dois tipos de bebidas, as proteases quebram proteínas. As cervejarias usam diferentes enzimas para liquefazer e fermentar a matéria-prima através da  $\alpha$ -amilase, aumentar o teor de certos açúcares (glicoamilase), aumentar a velocidade de filtração (glucanase), remover compostos indesejáveis (pentosanases) e a papaína e a bromelina evitam a turbidez do produto final<sup>32</sup>.

A Tabela 1 mostra um resumo das principais enzimas utilizadas na indústria de alimentos, bem como sua origem e sua aplicação.



**Tabela 1:** Resumo das principais enzimas utilizadas no processamento industrial de alimentos.

Enzimas	Origem	Aplicação
Amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,	Melhorador de massas e produção de xaropes
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Preparação de concentrados líquidos de café, clarificação sucos
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminação da glicose dos sólidos do ovo
Invertase	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Mel artificial
Lactase	<i>Sacharomyces fragilis</i>	Hidrólise da lactose
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> , <i>Mucor spp</i>	Sabor ao queijo
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> , <i>Penicillium</i>	Clarificação de vinho e de sucos de frutas
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Clarificação de cerveja e amaciamento de carne

## ENZIMAS NA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

O papel é um produto composto constituído basicamente por fibras de celulose. Para a obtenção do papel há a necessidade de reduzir a madeira a fragmentos bem pequenos e transformá-los em polpa. Para isso, a indústria em muitos países, incluindo o Brasil, utiliza compostos químicos como hidróxido de sódio e sulfato de sódio para a retirada da hemicelulose, da lignina e de certas resinas<sup>32</sup>. Esse tipo de tratamento causa vários problemas ambientais que podem ser minimizados com a utilização de enzimas que vêm em substituição a esses produtos químicos. Na indústria de papel e polpa a utilização de enzimas foi considerada por muitos anos uma técnica inviável até o surgimento de novas enzimas que favorecem tecnicamente o processo além de minimizarem a carga poluente dos efluentes desta indústria<sup>7</sup>.

Foi na década de 1950 que as enzimas foram primeiramente utilizadas na manufatura de celulose e papel com a utilização de amilases no processo de produção de amido modificado. Para melhorar a impressão e a resistência do papel é empregado o amido. Essa prática é muito limitada até hoje. As enzimas que

mais se destacam na indústria de papel e celulose são as xilanases, as quais possuem grande aplicação desde a década de 1980<sup>26</sup>.

As xilanases são as enzimas mais utilizadas no branqueamento da polpa. Essas enzimas atuam liberando fragmentos de lignina por hidrolisar a xilana residual, reduzindo consideravelmente a utilização de cloretos no branqueamento da polpa<sup>25</sup>.

A madeira tende a apresentar um excesso de resina natural formando manchas no papel. Para reduzir esse problema utiliza-se lipases nas fábricas de polpa mecânica para reduzir os problemas de resina. A adição dessas enzimas tornou-se obrigatória em muitas fábricas durante a estação de aumento de formação de breu. A redução dos custos do gerenciamento de resíduos é também de particular interesse para muitas fábricas, e as enzimas têm um importante papel a desempenhar aqui<sup>26</sup>.

Durante a fabricação de papel, pectinases podem ser usadas na fabricação de papel para despolimerizar substâncias pécicas e diminuir a demanda catiônica das soluções pécicas e do filtrado resultantes do branqueamento com peróxido, solucionar problemas de retenção no branqueamento mecânico da celulose e no tratamento dos efluentes dos moinhos de papel<sup>27</sup>.

Como ocorre com os produtos têxteis, a cobertura do papel é feita para proteger o papel contra danos mecânicos durante o processamento, além de melhorar a qualidade final do papel. Essa cobertura é feita com amido, aumentando assim a resistência do papel e melhorando a qualidade de impressão<sup>33</sup>.

Atualmente vários trabalhos vêm sendo publicados apresentando a aplicação de enzimas oxidativas como lacases e peroxidases. Essas enzimas teriam atuação no branqueamento da polpa e, também são atribuídas a essas enzimas, a degradação de extrativos.

Várias técnicas, como microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de força atômica (MFA), espectroscopia de infravermelho (FTIR) e de infravermelho próximo (FTNIR), espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS) e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN-1H/RMN-13C), são empregadas para determinação das alterações sofridas na composição e morfologia de madeiras, ligninas e polpas de celulose

durante o processo de branqueamento, com ou sem a utilização de enzimas<sup>34</sup>.

Essas técnicas permitiram analisar as propriedades físicas de polpas Kraft de eucalipto submetidas a um branqueamento, mostrando que houve mudanças no perfil da superfície das fibras e que o efeito mais comum atribuído a xilana é o “lixiviamento” parcial com remoção das fibrilas presentes junto às fibras. Entretanto, os trabalhos realizados enfatizam que não diferenças evidentes entre as superfícies como clivagem ou distorção, mas apenas uma certa “erosão”, o que mostra que houve uma ação conjunta na remoção das camadas subsequentes da superfície das fibras resultando em um polimento<sup>35,36</sup>. Acredita-se ainda que o tratamento com xilanases seja responsável pela abertura de poros na parede celular de polpas Kraft e as modificações morfológicas vistas no microscópio possam ser atribuídas à ação enzimática<sup>34</sup>.

## ENZIMAS NA INDÚSTRIA TÊXTIL

Os processos enzimáticos podem ser utilizados para alterar as propriedades das fibras têxteis e têm como principal vantagem, sobre a utilização de reagentes químicos, o fato de não implicarem qualquer efeito nocivo ao meio ambiente. Fato que levou, nos últimos anos, com a crescente conscientização e preocupação com o meio ambiente, ao desenvolvimento de muitas pesquisas com o objetivo de aplicar enzimas nas diferentes etapas do beneficiamento têxtil. A utilização de enzimas no processo têxtil visando à remoção das impurezas não celulósicas denomina-se biopreparação, biopurga, ou purga enzimática e apresenta inúmeras vantagens, contribuindo para o melhoramento ecológico do processo, pois substitui produtos químicos normalmente utilizados em alguns processos têxteis, reduzindo consideravelmente o impacto ambiental assim como os danos às fibras.

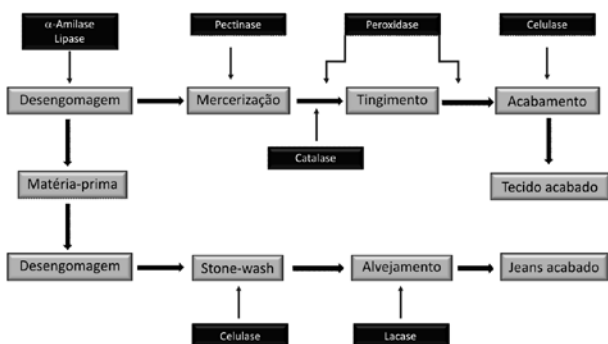
A primeira aplicação enzimática na Indústria Têxtil foi por volta de 1857, quando se utilizou o extrato de malte para retirar a goma de amido de um tecido a ser estampado<sup>35</sup>.

No acabamento têxtil, as enzimas são utilizadas para vários fins. Na indústria têxtil as lipases são usadas para remoção dos lubrificantes, e, recentemente, para melhorias do poliéster<sup>36</sup>. As lacases também podem ser utilizadas no alveijamento de algodão e também para limpeza de

efluentes. Em 1996, a empresa Novozymes lançou no mercado o produto DeniLite™ em uma preparação contendo lacase para aplicação em índigo<sup>37</sup>. As proteases são utilizadas para impedir o encolhimento, diminuição de feltagem, biopolimento (bio-polishing), melhoria de qualidade de tingimento e melhoria do brilho<sup>38,39</sup>. Enzimas proteolíticas também possuem aplicação no processamento da seda por facilitar o manuseio e aumentar a qualidade da fibra<sup>7</sup>. As amilases são utilizadas nos processos de desengomagem. Convencionalmente, as  $\alpha$ -amilases utilizadas na indústria têxtil são obtidas de culturas de bactérias como *Bacillus amyloliquefaciense* e *Bacillus subtilis* que trabalham em temperaturas entre 50 a 80° C, sendo sensíveis a variações de pH. Porém as termoestáveis de *B. licheniformis* apresentam temperaturas de trabalho entre 90 a 105° C<sup>40</sup>. A utilização de xilanases no pré-tratamento da polpa antes do branqueamento mostrou-se efetiva na redução do cloro necessário nessa fase.

Pectinases são utilizadas na indústria têxtil com diversas atuações tais como degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, tratar o resíduo líquido e a degomagem das fibras naturais, maceração das fibras vegetais, como linho, cânhamo e juta, na biopreparação de algodão e, no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão, a degomagem de fibras de rami com pectina liase produz fibras com qualidade superior àquelas produzidas por complexos enzimáticos comerciais ou utilizando processo químico com soda alcalina. Em algodão cru, a remoção da pectina, cera e agentes de goma com a utilização de pectinases em conjunto com amilases, lipases e hemicelulases em condições adequadas substitui o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia<sup>27</sup>. As celulasas são as enzimas mais utilizadas na indústria têxtil, sendo aplicadas na lavagem do jeans e de outros tecidos para obtenção de aspecto envelhecido e são utilizadas em novos tecidos sintéticos como o Lyocell, também chamado Tencel. O Lyocell é uma fibra de celulose regenerada com alta tenacidade resistência e maciez, obtido com a remoção de minúsculos filamentos projetados na superfície dos fios, o denominado *pilling*.

A Figura 8 mostra um resumo das etapas de processamento do algodão na indústria têxtil.



**Figura 8:** Principais enzimas utilizadas nas etapas de beneficiamento industrial do algodão.

## ENZIMAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Após os antibióticos, enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica. Podemos afirmar que hoje a indústria farmacêutica representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas. Elas podem ser aplicadas tanto na produção de medicamentos e desenvolvimento de novos produtos, quanto em diagnóstico clínico e terapia. Somado a isso, na área de cosmética, também chamado de “Enzimocosmética”, as enzimas estão inseridas cada vez mais em produtos de higiene pessoal, esfoliação de pele e anti-sinais. O mercado de enzimas é considerado hoje o mais promissor para as indústrias farmacêuticas, e uma única enzima com aplicação terapêutica pode, por exemplo, custar US\$ 5 mil/grama<sup>8</sup>.

Hoje, a diversidade de aplicação de enzimas na indústria farmacêutica vai desde auxiliar em digestão, debridamento e cicatrização de feridas até terapia anti-câncer. Entretanto, a terapia enzimática apresenta algumas limitações que devem ser resolvidas através de pesquisas científicas, dentre elas, baixa potência e seletividade, regulação inadequada da atividade, instabilidade, imunogenicidade e altos custos de manufatura, principalmente na recuperação e purificação final do produto. De acordo com a finalidade, as formulações que contêm enzimas podem ser administradas por via tópica, oral ou parenteral, sendo que estas devem apresentar alto grau de pureza, o que pode aumentar o custo de

produção.

As principais enzimas utilizadas em terapia estão resumidas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Principais enzimas utilizadas em terapia. Adaptado de Said e Pietro (2004).

Enzima	EC	Fonte	Aplicação
Plasmina	E.C. 3.4.21.7	Plasma humano ou bovino	Agente fibrinolítico, cicatrizante de feridas
Uroquinase	E.C. 3.4.21.73	Urina humana	Agente fibrinolítico, cicatrizante de feridas
Estreptoquinase	E.C. 3.4.21.31	Streptococcus β-hemolíticos grupo C Lancefield; Cultura de bactérias recombinantes	Agente fibrinolítico
L-asparaginase	E.C. 3.5.1.1	Escherichia coli	Agente anticancerígeno
Papaína	E.C. 3.4.22.2	Látex de Carica papaya	Auxiliar na digestão de proteínas em pacientes com dispepsia crônica e gastrite. Pode ser utilizada também como nematocida.
Quimiotripsina	E.C. 3.4.21.1	Pâncreas de bovino	Auxiliar de digestão/protease
Tripsina	E.C.3.4.21.4	Pâncreas de bovino	Auxiliar de digestão; debridamento de úlceras/protease
Bromelina	E.C. 3.4.22.32	Caulo de ananas comosus	Empregada em processos inflamatórios de origem traumática, cirúrgico infecciosa, vascular e reumática. A Bromelina também pode ser usada como auxiliar na digestão e para o tratamento de queimaduras de grau elevado.
α-amilase	E.C. 3.2.1.1	Pâncreas de suíno	Usada no tratamento da deficiência de secreção do suco pancreático e nas inflamações crônicas do pâncreas, entre outros benefícios.
Lipase	E.C. 3.1.1.3	Rhizopus arrhizus	Indicada nos casos de deficiência em enzimas pancreáticas e indigestão.
Pepsina	E.C. 3.4.23.1	Estômago de suíno	Auxiliar de digestão/protease
Celulase	E.C. 3.2.1.4	Trichoderma viride	Auxiliar digestão/carboidrase
Lisozima	E.C. 3.2.1.17	Clara do ovo	Antibiótico
Colagenase	E.C. 3.4.24.3	Clostridium histolyticum	Debridamento de queimaduras e úlceras dérmicas
Hialuronidase	E.C. 3.2.1.35	Testículo bovino	Agente de dispersão, anti-inflamatório
Ribonucelase	E.C. 3.1.27.5	Pâncreas bovino	Cicatrizante de feridas

As enzimas aplicadas em cosmética estão resumidas na Tabela 3.

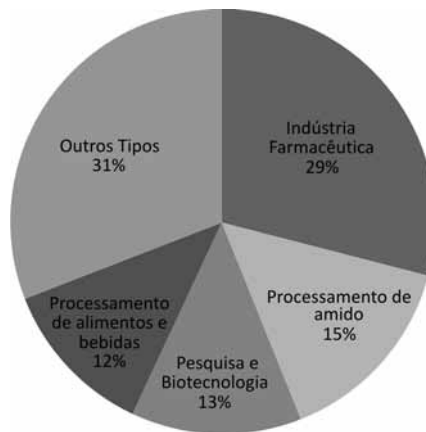
**Tabela 3:** Enzimas aplicadas diretamente na cosmética.

Enzima	EC	Fonte	Aplicação
Proteases	E.C. 3.4..	Várias fontes	Peeling, estrias, depiladores progressivos, controle de oleosidade e seborréia
Superóxido-dismutase	E.C. 1.15.1.1	Eritrócito bovino	Antienvelhecimento cutâneo
Catalase	E.C. 1.11.1.6	Penicillium amagasakiense	Anti-sinais, combate radicais livres
Glicocamilase	E.C. 3.2.1.3	Aspergillus oryzae	Renovação ou prevenção da placa dentaria
Glicose oxidase		Aspergillus niger	Enxaguantes bucais
Lipase	E.C. 3.1.1.3	Aspergillus niger	Limpeza profunda da pele, tratamento de acne e caspa
Lactase	E.C. 3.2.1.23	Aspergillus oryzae	Tinturas de cabelos
Uricases	E.C. 1.7.3.3	Arthrobacter protophormiae	Tintura de cabelos
Hialuronidase	E.C. 3.2.1.35	Testículo bovino	Auxiliar no tratamento de celulite
Fosfatase alcalina	E.C. 3.1.3.1	Intestino de bezerro	Estimulo a proliferação dos fibroblastos
Tirosinase	E.C. 1.10.3.1	Lentinula boryana	Bronzeamento
Celulase	E.C. 3.2.1.4	Trichoderma viride	Auxiliar digestão/carboidrase
Lisozima	E.C. 3.2.1.17	Clara do ovo	Antibiótico
Colagenase	E.C. 3.4.24.3	Clostridium histolyticum	Debridamento de queimaduras e úlceras dérmicas
Hialuronidase	E.C. 3.2.1.35	Testículo bovino	Agente de dispersão, antiinflamatório
Ribonucelase	E.C. 3.1.27.5	Pâncreas bovino	Cicatrizante de feridas

## O MERCADO DE ENZIMAS INDUSTRIAIS NO BRASIL

Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated, “Word Enzyme to 2009”, a indústria mundial de enzimas obteve um faturamento total de US\$ 3,7 bilhões em 2004, com uma previsão de crescimento da demanda mundial de 6,5% ao ano até 2009. Existe uma projeção segundo a qual só nos EUA a demanda de enzimas deve chegar US\$ 2,5 bilhões até 2012. O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). Hoje, as enzimas de uso industrial representam 60% do mercado mundial. Dentre elas se destacam o grande uso de amilases, com uma projeção de 25,4%, celulasas (17,1%) e lipases (7,2%), só para este ano de 2009. A demanda dessas enzimas está distribuída em

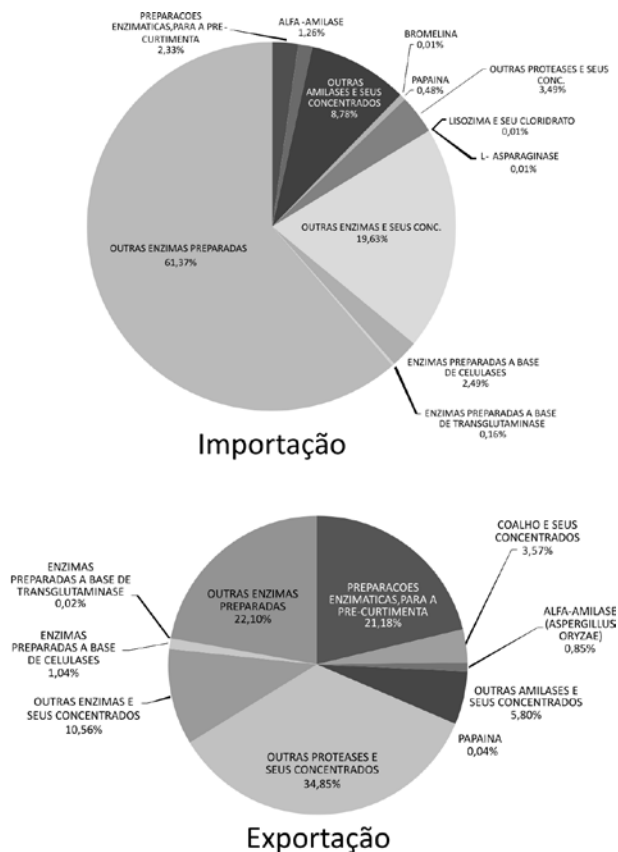
várias áreas e representada na Figura 9.



**Figura 9:** Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes áreas.

A América Latina representa 3,4% da demanda mundial de enzimas, sendo o Brasil o país mais expressivo desta região, respondendo por 60% do consumo de enzimas na região. Em termos mundiais, dados de 2005 mostram que o Brasil representa 3,7% do mercado internacional com uma movimentação em torno de US\$ 147 milhões. Mesmo assim, ainda somos um país que importa uma quantidade expressiva de enzimas, 86%, frente a 14% de exportação, revelando um atraso tecnológico e estratégia em termos de produção de biocatalisadores. Este quadro pode se modificar com um avanço no mercado de biocombustíveis, seja ele de origem amilácea ou celulósico, além de outras áreas promissoras como a de rações para alimentação animal. Outros mercados devem crescer, porém em menor proporção, como é o caso do de polpa e papel. Aliado a esses fatores, o Brasil instituiu em 2007 uma política de Desenvolvimento da Biotecnologia PDB, que inclui a produção e o uso industrial de enzimas no Brasil (Decreto nº 6.041, de 8 de Fevereiro de 2007).

Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior do Brasil mostram que só no ano de 2008 o Brasil importou cerca de 7,2 mil toneladas de enzimas industriais, perfazendo um total de US\$ 72,5 milhões, frente a um volume aproximado de 4,5 mil toneladas (US\$ 30,5 milhões) de enzimas industriais exportadas. As porcentagens das principais enzimas de aplicação industriais importadas e exportadas estão



**Figura 10:** Distribuição das enzimas industriais importadas e exportadas no ano de 2008 pelo Brasil.

apresentadas na Figura 10.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mercado de enzimas tem crescido muito nos últimos anos. Isso se deve a um aumento na produção industrial de enzimas e desenvolvimento de novas tecnologias e novos campos de aplicação de enzimas. Os fatores que dificultam a produção de enzimas no Brasil vêm sendo vencidos com novas leis e parcerias principalmente entre o setor privado e as universidades. A transferência de tecnologia para as empresas é de fundamental importância para a geração de conhecimento de novos processos. Novos campos estão sendo criados, como a produção de biocombustíveis através da degradação de biomassa vegetal, bem como a produção de enzimas como aditivos a ração animal. Na área de produção de papel, espera-se o desenvolvimento de novos processos que diminua a

poluição química gerada atualmente e, na área alimentícia, um aumento no desenvolvimento de novos alimentos funcionais é esperado. Talvez a área que mais cresça seja a enzimologia industrial farmacêutica. Aqui se espera a produção de novos fármacos mais específicos e mais individualizados principalmente na terapia de reposição enzimática e vacinas e grandes avanços na área de terapia cosmética antienvhecimento.

A busca no desenvolvimento e descoberta de novas enzimas mais tolerantes aos processos industriais deve ser aumentada nos próximos anos. O uso de engenharia enzimática aliada à tecnologia do DNA recombinante e expressão heteróloga de enzimas vão ter um novo salto na próxima década e será um dos pontos básicos no desenvolvimento de novos produtos industriais produzidos por via enzimática. Outra área bastante promissora para a tecnologia enzimática se refere ao controle ambiental. A preocupação do mundo em poluir menos e despoluir mais acarretará na substituição gradual dos processos químicos por processos enzimáticos, a chamada tecnologia branca.

Entretanto, as enzimas não podem ser consideradas como a única ferramenta para um ganho nos processos industriais. É necessário o conhecimento da fisiologia, bioquímica e a genética dos microrganismos. Portanto, a contribuição de novas áreas da biologia, como a genômica, proteômica e metabolômica serão de fundamental importância para a aplicação de microrganismos em escala industrial e o desenvolvimento de tecnologias mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

1. Gama, M., Aires-Barros, M. R., Cabral, J.; *Engenharia Enzimática*, Lidel: Portugal, 2003.
2. Michaelis L., Menten M.; *Biochem. Z.* **1913**, 49; 333.
3. Said, S.; Pietro, R.; *Enzimas de Interesse industrial e biotecnológico*, Ed Eventos: Rio de Janeiro, 2002.
4. Brandão, R. L; Castro, I.M.C.; *A Biologia Molecular e a Produção de Enzimas de Interesse Comercial*. In: Suraia Said; Rosemeire C.L.R. Pietro. (Org.). *Enzimas como agentes biotecnológicos*. 1 ed. Ribeiro Preto: Legis Summa Ltda, 2004.



5. Paiva, C. L. A.; Sá-Pereira, P. In: Elba P.S.Bon; Maria Antonietta Ferrara; Maria Luísa Corvo. *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.
6. Lorenz, P.; Eck, J. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 510.
7. Bon, E. P.S.; Pereira Jr, N.; *Tecnologia Enzimática*, Rio de Janeiro, 1999.
8. Said, S.; Pietro, R.; *Enzimas de interesse industrial e biotecnológico*, Editora Eventos: Rio de Janeiro, 2003.
9. Vaz, R.S.; Prado, M. R. M.; Carvalho, F.; *Biotec. Ciênc. & Desenv.* **2007**, *37*, 36.
10. Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U.A.; *Biologia Industrial*, Edgard Blücher: São Paulo, 2001.
11. Malajovich, M.A.; *Biologia*, Axcel Books: Rio de Janeiro, 2004.
12. 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: Elba P.S.Bon; Maria Antonietta Ferrara; Maria Luísa Corvo. *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.
13. Pandey, A.; *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 81.
14. Vargas, G. D. L. P.; *Dissertação de Mestrado* Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, **2004**.
15. Krishna, C. *Crit.; Rev. Biotechnol.* **2005**, *25*, 1.
16. Palma, M.B.; Pinto, A.L.; Gombert, A. K.; Seitz, K. H.; Kivatinitz, S.C.; Castilho, L.R.; Freire, D. M. G. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **2000**, *1137*, 84.
17. Lima, A. R. S.; *Dissertação de Mestrado* Universidade Federal do Amazonas, Brasil, **2006**.
18. Pandey, A., Soccol, C. R.; *Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications*, Asiatec Publishers: Londres, 2001.
19. Gervais, P., Molin, P.; *Biochem. Eng.J.* **2003**, *13*, 85.
20. Sato, K., Sudo, S. *Manual of industrial Microbiology and Biotechnology- Small- scale solid-state fermentations*, 2 ed., Washington, 1999.
21. Von Meien, O. F., Mitchell, D. A.; *Biotechnol. and Bioeng.* **2002**, *79*, 416.
22. Roveda, M.; *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Passo Fundo. Brasil, **2007**.
23. Sondergaard, H. A.; Grunert, K. G.; Scholderer, J.; *Trends Food Sci. & Technol.* **2005**, *16*(10), 466.
24. Olempska-Beer, Z. S.; Merker, R. I.; Ditto, M. D.; Dinovi, M. J.; *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* **2006**, *45*, 144.
25. Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, Jorge, H. F.; J. A.; Amorim, D. S.; *Appl. Microbiol Biotechnol.* **2005**, *67*, 577.
26. Novozymes. Lento, porém constante progresso na área de celulose e papel. Ano XXI, Nº 3, 2006.
27. Uenojo, M. & Pastore, G. M.; *Quim. Nova*, **2007**, *30* (2), 388.
28. Vaz R. S.; Prado, M. R. M.; Carvalho, F.; *Biotec. Ciênc. & Desenv.* **2007**, *37*, 36.
29. Van Der Maarel, M.J.E.C.; Van Der Veen, B.; Uitdehaag, J.C.M.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L.; *J. Biotechnol.* **2002**, *94*, 137.
30. Farahat, S.M.; Rabie, A. M.; Farag, A. A.; *Food Chem.*, **1990**, *36* (3), 169.
31. Whitaker, J.R.; Law, B.A.; *Sheffied Food Technology*, **2001**. 8.
32. Mussatto, S. I.; Fernandes, M.; Milagres, A. M. F.; *Ciência Hoje.* **2007**, *41*.
33. Spier, M. R.; *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal do Paraná, Brasil, **2005**.
34. Duran, N.; Marques, S.; Salles, B. C.; Medeiros, R. G.; Filho, E. X. F. Enzimas na Indústria de Polpa e Papel. In: Elba P.S.Bon; Maria Antonietta Ferrara; Maria Luísa Corvo. *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.



35. Cunha, R. T.; Pereira Jr, N.; Andrade, C. M.M.C.;  
*Revista Química Têxtil*, **2007**, n.E.
36. Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. *Enzyme and  
Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
37. Couto, S. R.; Toca, J. L. H. *Biotechnology and  
Molecular Biology Review*, **2006**, *1* (4), 117.
38. Guimarães, C. J. S. M. S.; *Tese de Doutorado*.  
Universidade do Minho, Portugal, **2005**
39. Jacinto, M. A. C.; Silva, A. G. S.; Costa, R. G.O.;  
*Rev. Bras. Zoot.* **2004**, *33* (4)
40. Genencor. Int. *Folheto Técnico*, **2001**.

---

## Valdirene Neves Monteiro<sup>1</sup> & Roberto do Nascimento Silva\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da  
Universidade Estadual de Goiás-UnUCET/UEG, BR 153, Km 98,  
Campus Henrique Santillo, Anápolis, GO, CEP 75000-000.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas,  
Laboratório de Enzimologia, Campus II – Samambaia, Goiânia,  
GO, CEP 74001-970

\*E-mail: rsilva@icb.ufg.br