



ATIVIDADE ENZIMÁTICA E HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR ENZIMA PRODUZIDA PELA *TRICHODERMA* SG2

JOSIANE PINHEIRO FARIAS¹; FERNANDA DIAS DE ÁVILA²; CAROLINA FACCIO DEMARCO²; CAROLINE SOARES SANTOS²; BENEDICT C. OKEKE³; ROBSON ANDREAZZA³

¹Universidade Federal de Pelotas - Jo.anetst@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas - fehavila@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - carol_demarco@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - carol.soar20@gmail.com

³Universidade de Auburn - bokeke@aum.edu

³Universidade Federal de Pelotas - robsonandrezza@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos são fontes econômicas para a produção de biocombustíveis, devido à abundância de biopolímeros como celulose, lignina e hemicelulose (ANU et al, 2020). No entanto, a recalcitrância das biomassas lignocelulósicas é um importante obstáculo na produção biológica de açúcares da biomassa vegetal. Por isso, uma hidrólise efetiva de alto rendimento requer um processo de pré-tratamento dos substratos (TRIWAHYUNI et al, 2015) e múltiplas atividades enzimáticas que apresente atividades balanceadas de celulasas (endo, exoglucanases e β -glicosidade), xilanase, e ligninolíticas (BRIJWANI et al, 2010; OKEKE; LU, 2011). Então, diversas pesquisas têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira mais efetiva (EZEILO et al, 2019; METREVELI et al, 2017).

Celulasas e xilanase são geralmente isoladas de fungos, pois esses microrganismos secretam extracelularmente grandes quantidades dessas enzimas. Essas enzimas são produzidas por espécies de *Trichoderma* que incluem *Trichoderma viride* MMS 3, *T. reesei*, *T. virens*, *T. asperellum* MR1, *T. virens* UKM1, *A. awamori* MMS4 e *T. tubingensis* NKBP-55. Essas enzimas são cruciais para degradar a parede celular da biomassa para liberar os componentes de açúcar valiosos (EZEILO et al, 2019).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de enzimas lignocelulósicas produzidas pelo fungo *Trichoderma* SG2, em substrato papel impresso e avaliar a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor.

2. METODOLOGIA

2.1 Matéria-prima e Pré-tratamento

O bagaço de cana-de-açúcar foi adquirida da região sudeste do Brasil. O bagaço de cana foi pré-tratada por explosão a vapor em reator contínuo por 10 min a temperatura de 190°C. A composição química do bagaço apresenta: 57.68% de celulose, 12.41% de hemicelulose, 27.89% de lignina e 2,20% de cinzas.

2.2 Enzimas

No estudo foram utilizados dois complexos enzimáticos: a enzima comercial Cellic CTec2 (Sigma-Aldrich); enzima lignocelulósica produzida pela *Trichoderma* SG2 (SG2).

A produção da enzima SG2 utilizou-se um meio enriquecido (EPM) como descrito por Okeke (2014) e papel impresso como substrato. Em erlenmeyers de 125 mL, foram colocados 0,5 g de pó de papel impresso, adicionou-se 50 ml do meio enriquecido (EPM), e autoclavado em 21°C por 20 minutos. Arrefecer até à temperatura ambiente. Em cada erlenmeyer foi inoculado a *Trichoderma* SG2 aderida em ágar batata-dextrose com tamanho aproximado de 1cm². Posteriormente o inóculo foi incubado por 6 dias a temperatura de 30°C e agitação de 200rpm. As enzimas foram recuperadas por centrifugação. O sobrenadante foi testado para atividades enzimáticas para filtro de celulase de papel e xilanase.

2.3 Análise de atividades enzimáticas

Celulase em papel de filtro: utilizando uma mistura reacional de 0,5 ml de enzima, 0,5 ml de tampão de acetato de sódio 0,1M (pH 5,0) e dez discos de papel de filtro (7 mm de diâmetro), correspondendo a 0,033 gramas de papel filtro da Whatman número 1. Os tubos foram incubados durante 30 min em banho-maria a 50 °C. Posteriormente, o açúcar redutor foi determinado pelo método Ácido Dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959). Sendo, 1,5 ml de reagente de DNS (solução estoque contendo 300 ml ácido dinitrosalicílico 1% e 150 ml tartarato de sódio e potássio a 40%) adicionado a cada mistura reacional. Cada tubo foi mantido em banho-maria por 15 minutos a 95 °C e resfriado à temperatura ambiente e antes de a absorbância ser lida a 575 nm o espectrofotômetro foi zerado com água destilada.

A atividade da xilanase foi medida usando o procedimento descrito na celulase, no entanto, a mistura de reação foi utilizado 0,01 grama de xilanase (espelta de aveia xilana) em substituição ao papel filtro. A atividade enzimática é expressa em unidades. mL⁻¹(U.mL⁻¹) foi obtida através de uma curva padrão de glicose.

2.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise foi realizada com 1 e 1,5 gramas de bagaço pré-tratado:

a) Hidrólise com enzima SG2 (T10 e T15): Em erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 10 ml de enzima SG2, 60 microlitros de agente antimicrobiano diluído (diluído 100 vezes) e 60 microlitros de hidróxido de sódio 2M para ajustar o pH para pH 5,00.

b) Hidrólise suplementada com enzima comercial Cellic CTec2 (T10S e T15S): o experimento segue de acordo com item a, e a este foi adicionada 30 microlitros de enzima comercial Cellic CTec2.

Os meios foram incubados a 50°C com agitação mínima (apenas o suficiente para manter o substrato e o líquido misturados) por 18 horas. O hidrolisado inteiro foi colocado na centrífuga a 5.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi usado para a análise de açúcar redutor usando o método DNS conforme descrito acima com uma curva padrão de glicose como referência. Após a coleta do hidrolisado, o resíduo foi transferido aos respectivos erlenmeyers, ressuspensão em 10 ml de tampão de acetato de sódio a 0,05 mol (Na 50 mM) e 60 microlitros de agente antimicrobiano diluído e inubado por mais 48 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima produzida pela *Trichoderma* SG2 apresenta no sexto dia de incubação uma atividade enzimática para celulase $12,29 \pm 0,74 \text{ U.mL}^{-1}$ e xilanase $29,42 \pm 1,99 \text{ U. mL}^{-1}$. No estudo de Li *et al* (2018), uma monocultura de *Trichoderma reesei* apresenta atividade para celulase de 6 U.mL^{-1} e Xilanase 1000 U.mL^{-1} de extrato enzimático, com uso de palha de milho como substrato, em 120 horas de cultivo.

Utilizar enzimas eficientes na bioconversão de lignocelulose em alta concentração de açúcares são necessárias para se obter biocombustíveis, o que resulta em uma diminuição no custo de produção (LU *et al.*, 2012). Na figura 1, ilustra as quantidades de açúcares redutores do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada por explosão de vapor por meio das enzimas SG2 e SG2 suplementada com Cellic CTec2.

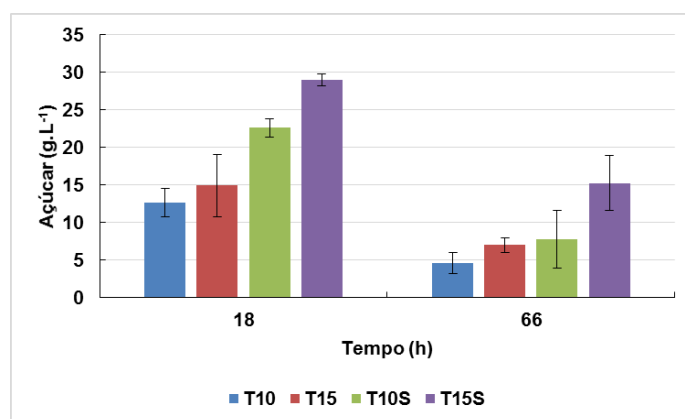


Figura 1-Total de açúcares redutores produzido a partir do filtrado de *Trichoderma* SG2 (T10 e T15) e *Trichoderma* SG2 + Cellic CTec2 (T10S e T15S) após o processo de hidrólise.

A concentração de açúcares redutores nos hidrolisados aumentou com o aumento da porcentagem de sólidos, ou seja, um aumento da concentração de substrato normalmente resulta em um aumento do rendimento e da taxa de reação da hidrólise (SUN: CHENG, 2002).

As preparações enzimáticas diferem significativamente em sua capacidade de converter celulose e hemicelulose. A suplementação de SG2 com cellic cTec2 melhorou significativamente o rendimento geral da hidrólise (figura 1). O aumento da eficiência de rendimento da hidrólise com a suplementação pode ser atribuída a alta taxa de β -glicosidase presente no Cellic Ctec2 (TRIWAHYUNI *et al.*, 2015). Assim, a mistura de enzimas atua mais efetivamente no substrato utilizado, visto que a composição majoritária do bagaço de cana é celulose (57.68%). A celulases (endo, exoglucanases e β -glicosidade) são responsáveis por degradar a celulose.

No estudo de AFIFI; MASSOUD; EL- AKASHER (2015) com uma enzima produzida por *Aspergillus niger* o total de açúcares redutor obtido foi de $38,3 \text{ g.L}$ em 24 horas na hidrólise de palha de arroz. Valor coerente encontrado no presente trabalho na hidrólise com a enzima SG2 suplementada.

Com a ressuspensão do bagaço de cana em tampão de acetato de sódio a $0,05 \text{ mol}$ ($\text{Na } 50 \text{ mM}$) e 60 microlitros de agente antimicrobiano diluído, o processo de converção de açúcares permanece ativo, pois o sistema possui uma baixa atividade enzimática proveniente da hidrólise anterior. Porém, como é baixa a atividade enzimática, ocorre uma conversão menor de celulose e hemicelulose que é observada pela diminuição da concentração de açúcares redutores ao final das 66 horas de hidrólise.



4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que *Trichoderma* SG2 produziu níveis consideráveis de enzimas primárias (celulase, xilanase) para a bioconversão de lignocelulose em açúcares fermentáveis. Um aumento da concentração de substrato resulta em um acréscimo de rendimento da conversão da celulose e hemicelulose em açúcares. O rendimento da enzima produzida pela *Trichoderma* SG2 duplica com a suplementação com a enzima Cellic Ctec2, devido a efetividade de degradação da celulose do substrato pela presença de β -glicosidade na enzima comercial Cellic Ctec2. Aderido ao sólido ao ser ressuspensão em tampão permanecem enzimas com atividade enzimática residual com capacidade de degradar a celulose e hemicelulose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFIFI, M. M. I.; MASSOUD, O. N.; EL- AKASHER, Y. S. Bioethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation using Pretreated Rice Straw. **Middle East Journal**, n. 3, p. 769-776, 2015.
- ANU et al. Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review. **Renewable Energy**, v. 160, p. 1228-252, 2020.
- BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120-128, 2010
- EZEILO, U. R. et al. Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 243, p. 206-217, 2019.
- LI, Y. H. et al. Optimization of cellulolytic enzyme components through engineering *Trichoderma reesei* and on-site fermentation using the soluble inducer for cellulosic ethanol production from corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2018.
- LU, J. et al. Enzymatic saccharification and ethanol fermentation of reed pretreated with liquid hot water. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-9, 2012.
- METREVELI, E. et al. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpe lacteus* and *Schizophyllum commune*. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 652-660, 2017.
- MILLER, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Anal. Chem.**, 31, 426, 1959
- OKEKE, B. C. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High β -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1581-1598, 2014.
- OKEKE, B. C.; LU, J. Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for bioprocessing of cellulose and hemicelluloses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 7, p. 869-881, 2011.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- TRIWAHYUNI, E. et al. The effect of substrate loading on simultaneous saccharification and fermentation process for bioethanol production from oil palm empty fruit bunches. **Energy Procedia**, v. 68, p. 138-146, 2015.