

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ALTO TEOR DE SÓLIDOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO UTILIZANDO ENZIMAS RECICLADAS DE *TRICHODERMA SG2* SUPLEMENTADA COM UMA CELULASE COMERCIAL

JOSIANE PINHEIRO FARIAS¹; FERNANDA DIAS DE ÁVILA²; CAROLINA FACCIO DEMARCO²; THAYS FRANÇA AFONSO²; BENEDICT C. OKEKE³; ROBSON ANDREAZZA³

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

²*Universidade Federal de Pelotas - fehavila@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas - carol_demarco@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas - thaysafonso@hotmail.com*

³*Universidade de Auburn - bokeke@aum.edu*

³*Universidade Federal de Pelotas - robsonandreazza@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Devido à insustentabilidade dos combustíveis fósseis e aos efeitos ambientais negativos causados pela queima desses combustíveis, incentivou o desenvolvimento de bioproductos de recursos renováveis (KIM et al., 2019; SUI et al., 2021). Dentre os recursos renováveis, a biomassa lignocelulósica (composta por celulose, lignina e hemicelulose), chama atenção para produção açúcares fermentescíveis, que podem ser usados para a síntese integrada de biocombustíveis como biodiesel, bioetanol, bio hidrogênio e biogás (RASHID et al., 2022). No entanto, para tornar economicamente viável a conversão enzimática de biomassa lignocelulósica, é necessário realizar hidrólise enzimática em alto carga de sólidos ($\geq 20\%$) para garantir que uma concentração de açúcar correspondente seja produzida (SANT'ANA DA SILVA et al., 2016; SHI et al., 2022).

A hidrólise de alto carga de sólidos possui algumas limitações que afetam a taxa de conversão da celulose. Como a lenta transferência de massa, principalmente em meios porosos como lignocelulose, ligação desfavorável da celulase à lignina e redução da atividade enzimática pela formação de produtos finais, glicose e celobiose (HE et al., 2018; SANT'ANA DA SILVA et al., 2016). Deste modo, aumentar a quantidade de celulase para compensar a mistura insuficiente de celulase com o substrato é uma das alternativas. Porém, pode aumentar os custos de produção, visto que o custo da celulase utilizada na produção industrial de etanol lignocelulósico gira em torno de 20 a 30% (SHI et al., 2022). Neste contexto, mais estudos são necessários para desenvolver uma estratégia favorável para superar essas deficiências (HE et al., 2018);(VIGNESH; CHANDRARAJ, 2021).

O objetivo do presente estudo realizar uma hidrólise de múltiplos estágios com alta carga sólidos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando enzimas recicladas e determinar a carga máxima de sólidos que pode ser aplicada.

2. METODOLOGIA

2.1 Caracterização do Substrato e Produção de enzimas

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. *Trichoderma SG2* foi recebida do Laboratório de Pesquisa de

Bioprocessamento e Biocombustíveis da Auburn University em Montgomery. A produção da enzima a partir do fungo degradador de lignocelulose *Trichoderma* SG2 seguiu a metodologia descrita por FARIA et al (2020) que utilizou um meio enriquecido (EPM), descrito por OKEKE (2014) e papel impresso como substrato. A enzima comercial utilizada para a suplementação enzimática interna foi a Novozyme Cellic CTec2, adquirida da Sigma-Aldrich.

2. 2 Análise de atividades enzimáticas

O sobrenadante foi testado para atividades enzimáticas para celulase (celulase de papel de filtro) e xilanase como descrito anteriormente (OKEKE, 2014; OKEKE; LU, 2011). Posteriormente, o açúcar redutor total (ATR) foi determinado pelo método do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A atividade enzimática (μmol ou unidades $\text{mL}^{-1} \text{ 30 min}^{-1}$) foi lida a partir de uma curva de glicose padrão.

2.3 Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de -açúcar pré-tratada com vapor e recuperação de enzimas

A enzima produzida de *Trichoderma* SG2 não otimizada apresentou atividade enzimática aproximadamente de $7,74 \pm 1,31 \text{ U mL}^{-1}$ para celulase e $34,78 \pm 3,67 \text{ U mL}^{-1}$ para xilanase. Porém, em estudo prévio (dados não apresentados) foi determinado que a enzima *Trichoderma* SG2 pode ser empregada em baixa dosagem, assim no teste de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foi utilizado *Trichoderma* SG2 a 50%. A enzima Cellic CTec2 foi aplicada conforme recomendado pelo fornecedor (CTEC, [s.d.]). A hidrólise enzimática foi realizada em Erlenmeyer de 125 ml a 50°C, utilizando um teor de sólidos inicial de 10% m/v, Lactostab foi adicionado como agente antimicrobiano e hidróxido de sódio 2M para ajustar o pH para pH 5,00. Os frascos foram selados com parafilme. A hidrólise de múltiplos estágios foi realizada em intervalos de 21h e a cada etapa foram separados as fases líquidas e sólidas por centrifugação. O resultado do primeiro estágio foi usado como controle. Experimentos de hidrólise de dois estágios (21+21h) e três estágios (21+21+21h) foram conduzidos para estudar o rendimento de conversão celulose utilizando enzimas reciclada e identificar a carga máxima de substrato com este processo. Então, para determinar a estratégia de reciclagem, os tratamentos “a” e “b” foram utilizadas: a - Reciclagem da enzima e adição de substrato fresco; b - Reciclagem da enzima e adição de substrato fresco e adição de enzima 1/6 da dosagem recomendada de Cellic CTec2 e enzima de *Trichoderma* SG2 com atividade enzimática $0,0387 \text{ U mL}^{-1}$ para celulase e $0,174 \text{ U mL}^{-1}$ xilanase. A dosagem de substrato variou de 1 a 10 % m/v. Devido o recolhimento da fração líquida o sistema foi fluidizado com uma solução de tampão acetato de sódio 50 mM, e foi novamente adicionado agente antimicrobiano Lactostab. Os testes de hidrólise foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 estam apresentados a eficiencia de converção da hidólise de alta carga de sólidos com reciclagem de enzima. A quantidade de açúcares produzida durante a reação de sacarificação, são provenientes do substrato fresco e residual (FARIAS et al, 2020). No entanto, para ambos tratamentos “a” e “b”, a conversão em açúcares diminui a medida que aumenta a carga de sólidos. A diminuição da conversão pode estar relacionada a uma menor relação enzima substrato, devido ao aumento da carga de sólidos (VISSER et al., 2015). Também pela perda da atividade enzimática pelo efeito da ligação desfavorável da celulase à lignina (HE et al., 2018), pela formação de produtos finais (YANG et al., 2010b) e pelo feito da desnaturação mecânica a 50°C, podendo ter uma fator de redução acima de 1/3 (SHI et al., 2022).

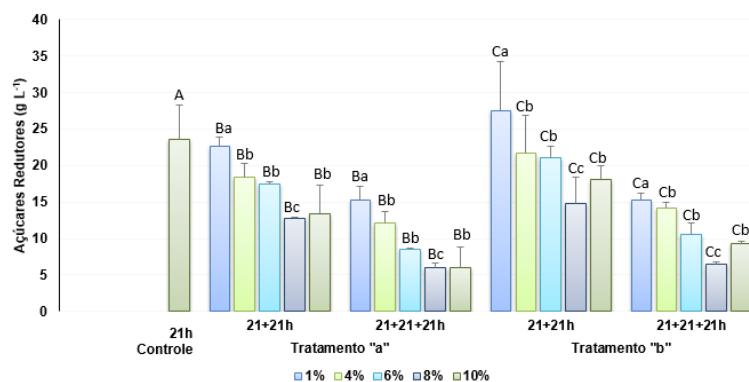


Figura 1 - Comparação do rendimento de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar explodida a vapor na hidrólise de múltiplos estágios. Tratamento “a”, reciclagem de enzima + substrato fresco. Tratamento “b”, reciclagem de enzima + adição de enzima fresca +substrato fresco. Letras minúsculas representam o teste de Tukey a 5% entre o teor de sólidos e letras maiúsculas entre tratamentos.

Os resultados da hidrólise de três estágios (21+21+21h) para ambos tratamentos, “a” e “b”, indicaram que as celulases ligadas, até certo ponto, possuíam relativa atividade hidrolítica. Portanto, a hidrólise em batelada alimentada reduziu o tempo de processamento, que geralmente apresenta tempo mínimo de 72 h (SHI et al., 2022). Outro fator importante, a remoção de produtos finais, limitou o efeito negativo na atividade da celulase (KIM et al., 2019; YANG et al., 2010a).

O tratamento “b”, consiste no processo de reciclagem da enzima e adição de enzimas frescas 1/6 da dosagem recomendada de Cellic CTec2 e enzima de *Trichoderma* SG2 com atividade enzimática 0,0387 U mL⁻¹ para celulase e 0,174 U mL⁻¹ xilanase, melhorou o rendimento geral da hidrólise (figura 1). O aumento na eficiencia pode ser relacinado ao aumentar a quantidade de celulase que compensa parcialmente a mistura insuficiente de celulase com o substrato (SHI et al., 2022). A carga máxima de sólidos na hidrólise com reciclagem de enzima, com e sem adição de enzima fresca é de 22%. Demostrando a viabilidade de hidrólise de alta carga de sólidos em batelada alimentada com a reciclagem de enzimas através da recirculação da fração sólida. Assim diminuindo os custos com enzimas no processo de produção de biocombustíveis.

4. CONCLUSÕES

A reciclagem de celulase para hidrólise enzimática de alto teor de sólidos é importante e desafiadora. O estudo comprovou a possibilidade de hidrólise de alta carga de sólidos com reciclagem de enzima, através da recirculação de sólidos. A

remoção da glicose diminuiu o efeito negativo na atividade enzimática, possibilitando uma maior eficiência de conversão. E foi determinado que 22% é o teor máximo sólidos no processo de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CTEC, C. Cellulosic ethanol Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic. p. 1–8, [s.d.]
- FARIAS, J. P; De ÁVILA, F D DEMARCO, C.F; SANTOS, C.S; OKEKE, B.C; ANDREAZZA, R. Atividade enzimática e hidrólise do bagaço de cana-de- açúcar por enzima produzida pela *Trichoderma SG2*. In: **Semana Integrada UFPEL**, 6.Pelotas, 2020. **Anais**, Pelotas: XXII Encontro de Pós-Graduação, 2020.
- HE, L; HAN, Q; JAMEEL, H; CHANG, H.M; PHILLIPS, R; WANG, Z. Comparison of One-Stage Batch and Fed-Batch Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Hardwood for the Production of Biosugar. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1441–1452, 2018.
- KIM, J. K; YANG, J; PARK, S.Y; YU, J.H; KIM, K.H. Cellulase recycling in high-solids enzymatic hydrolysis of pretreated empty fruit bunches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2019.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 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.
- RASHID, S. S; MUSTAFA, A.B; RAHIM, M.H.A; GUNES, B. Magnetic nickel nanostructure as cellulase immobilization surface for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, n. PA, p. 1048–1053, 2022.
- SANT'ANA DA SILVA, A.; DE SOUZA, M.F; BALLESTEROS, I; MANZANARES, P; BALLESTEROS, M; BON, E.P.S. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1561–1567, 2016.
- SHI, X; WANG, L; SUN, L; CHEN, H. Sufficient premixing enhances enzymatic hydrolysis efficiency of lignocellulose at high-solids loading. **Chemical Engineering Journal**, v. 444, n. 1, p. 136612, 2022
- SUI, W.; LIU, X; SUN, H; LI, C; PARVEZ, H.M. Improved high-solid loading enzymatic hydrolysis of steam exploded corn stalk using rapid room temperature γ -valerolactone delignification. **Industrial Crops and Products**, v. 165, n. February, p. 113389, 2021.
- VISSEER, E. M; LEAL, T.F; DE ALMEIDA, M.N; GUIMARÃES.V.M. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, 2015.
- YANG, J; ZHANG, X; YONG, Q; YU, S. Three-stage hydrolysis to enhance enzymatic saccharification of steam-exploded corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4930–4935, 2010a.
- YANG, M; LI, W; LIU, B; LI, Q; XING, J. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4884–4888, 2010b.