

MODELAGEM CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADA

J. D. ANGARITA¹, R. B. A. SOUZA², A. J. G. CRUZ², E. C. BISCAIA Jr¹ e A. R. SECCHI¹

¹ Universidade Federal de Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química

² Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: arge@peq.coppe.ufrj.br

RESUMO – Um modelo semimecanístico multireacional foi usado para descrever a hidrólise enzimática da palha de cana de açúcar (PCA) pré-tratada hidrotermicamente. O modelo considera a reação de conversão homogênea da celobiose em glicose, duas reações heterogêneas para a conversão de celulose em celobiose e glicose, conversão da hemicelulose em xilose, inibição competitiva da enzima pelos produtos da hidrólise e uma isoterma tipo Langmuir para descrever a adsorção da enzima no substrato. O software EMSO foi utilizado para estimar os parâmetros do modelo a partir de uma condição de referência (15% m/v de sólidos e 10 FPU/g-celulose de enzima). O modelo mostrou ter capacidade para predizer o comportamento da hidrólise de PCA em diferentes condições de carga de sólidos (10-20% m/v), concentrações de enzima (5-60FPU/g-celulose) e cargas iniciais de açúcares (glicose de 30 e 60g/l, celobiose e xilose de 10g/l). Uma simplificação nos parâmetros do modelo, baseada nos fundamentos da cinética enzimática mostrou ser uma boa opção para superar a alta correlação paramétrica referida na literatura para este tipo de modelo, sem afetar a acurácia nas previsões. O modelo tem o potencial de ser utilizado em aplicações de projeto de reatores, simulação e otimização dentro do processo de produção do etanol de segunda geração.

1. INTRODUÇÃO

A modelagem matemática da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um tema desafiante na engenharia, refletido no grande número de modelos propostos (Bansal *et al.*, 2009). Na hidrólise enzimática ocorrem reações de múltiplos estágios em sistema heterogêneo onde a celulose insolúvel é inicialmente degradada na interface sólido-líquido pela ação sinérgica do pool de enzimas endoglicanases (EG) e exo-glicanases/celobiohidrolases (CBH's), acompanhada da hidrólise na fase líquida dos produtos intermediários solúveis (celobiose e cadeias curtas de oligossacarídeos) que são convertidos em glicose pelas β-glicosidases (BG) (Zhang e Lynd, 2004).

Em geral, a hidrólise depende das características das enzimas como: (1) adsorção da enzima no substrato, (2) inibição competitiva ou não competitiva pelo produto final, (3) sinergismo e (4) limitações da transferência de massa que afetam o transporte da enzima para o substrato. A hidrólise é também afetada pelas características do substrato como: (1) composição e distribuição dos componentes do substrato (lignina, hemicelulose, proteínas e gorduras), (2) tamanho de partícula e (3)

a cristalinidade (Brown *et al.*, 2010). Diferentes modelos semimecanísticos têm sido propostos para descrever a hidrólise enzimática de biomassa pré-tratada (Bansal *et al.*, 2009; Zhang e Lynd, 2004). Kadam *et al.* (2004) desenvolveram e validaram um modelo cinético para a hidrólise enzimática em batelada de palha de milho pré-tratada com ácido diluído. Este modelo considerou uma reação homogênea de cellobiose a glicose e duas reações heterogêneas de celulose a cellobiose e a glicose. A adsorção da enzima foi incorporada usando uma isoterma tipo Langmuir; a inibição competitiva pelos produtos finais da hidrólise e a reatividade do substrato foram incluídas no modelo. Uma extensão deste modelo foi proposta por Câmara (2012) para levar em consideração tanto a formação de xilose a partir da hemicelulose, quanto a inibição da xilose sobre as enzimas de acordo com a Figura 1.

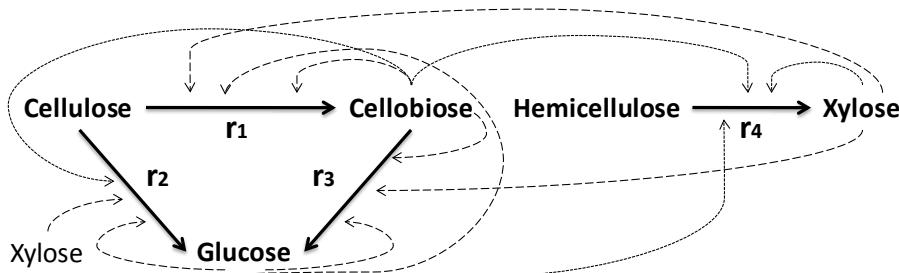


Figura 1 – Mecanismo cinético para a modelagem da hidrólise da celulose. Celulases (EG e CBH's) envolvidas em r_1 e r_2 , β -glicosidase em r_3 e hemicelulases em r_4 . Tanto as linhas pontilhadas quanto r_4 foram propostas por Câmara (2012), modificado de Kadam *et al.* (2004).

Nos últimos dez anos, o modelo de Kadam *et al.* (2004) tem sido verificado experimentalmente (Zheng *et al.*, 2009; Hodge *et al.*, 2009), analisado estatisticamente (Sin *et al.*, 2010), avaliado em aplicações de otimização, controle e configurações de processo (Hodge *et al.*, 2009; Morales-Rodríguez *et al.*, 2010, 2011; Mutturi e Lidén, 2013), e usado recentemente na modelagem da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar (Câmara, 2012).

Embora a hidrólise enzimática tenha vantagens sobre a conversão química de alto rendimento de açúcar como o baixo consumo de energia, condições de operação brandas (pressão e temperaturas baixas), biorreatores de baixo custo e formação mínima de subprodutos (Sun e Cheng, 2005), o custo da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é uma das principais barreiras da comercialização do etanol de segunda geração (Zheng, 2009). Uma das abordagens para reduzir esses custos é a operação em alta concentração de sólidos, geralmente apresentada com cargas de sólidos >15% (Hodge *et al.*, 2009). A hidrólise enzimática em alta concentração de sólidos apresenta vantagens econômicas em relação ao processo convencional em baixa concentração de sólidos, como: (1) menor custo de capital devido à redução do volume; (2) menor custo de operação devido à menor quantidade de energia para aquecer e resfriar; (3) menor custo na etapa de separação do produto devido às altas concentrações de produto, e (4) redução dos custos de eliminação e tratamento de resíduos devido ao baixo consumo de água (Mohagheghi *et al.*, 1992), porém, existem poucos modelos e dados experimentais da hidrólise de biomassa lignocelulósica em alta concentração de sólidos.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver a partir de dados experimentais, um modelo suficientemente sofisticado para descrever a hidrólise enzimática da PCA pré-tratada em alta

concentração de sólidos, a partir das propriedades macroscópicas do sistema, com o potencial de ser utilizado tanto no projeto de reatores, quanto em aplicações de simulação, otimização e controle no processo de produção do etanol lignocelulósico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados experimentais para a estimação dos parâmetros cinéticos e a verificação do modelo, foram gerados a partir de ensaios de hidrólise enzimática com PCA pré-tratada hidrotermicamente a 195°C por 10 min, seguindo as melhores condições de pré-tratamento descritas por Souza e Cruz (2013). O complexo enzimático comercial Cellic® CTec2 (203 FPU/ml, 36 mg-proteína/ml; Novozymes, Araucária, PR) foi usado nos experimentos sem adição de β -glicosidase. Outras condições são listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições experimentais para o desenvolvimento e validação do modelo cinético^a.

Condições Experimentais	Condição de Referência	Experimentos				
		Carga de Enzima	Carga de Sólidos	Glicose inicial	Cellobiose inicial	Xilose Inicial
Carga de enzima (FPU/g-celulose)	10	5, 15, 20, 25, 30, 60	10	10	10	10
Carga de sólidos (%m/v)	15	15	10, 20	15	15	15
Glicose inicial (g/l)	0	0	0	30, 60	0	0
Cellobiose inicial (g/l)	0	0	0	0	10	0
Xilose inicial (g/l)	0	0	0	0	0	10

^a Temperatura, pH, velocidade de agitação e tempo de hidrólise foram mantidos constantes em 50°C, 4.8, 250 rpm e 72 h, respectivamente.

Amostras do sobrenadante foram coletadas em tempos de amostragem de 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72h (amostras adicionais foram coletadas para a condição de referência em t = 4, 8 e 96h) para medições de concentração de glicose, cellobiose e xilose pela técnica de HPLC. A concentração de proteína em solução foi medida pelo ensaio de proteínas de Bradford. Experimentos para a verificação do modelo foram conduzidos para diferentes cargas de enzima (5-60 FPU/g-celulose), cargas de sólidos (10 e 20% m/v) e diferentes concentrações iniciais de açúcares, incluindo glicose (30 e 60 g/l), cellobiose (10g/l) e xilose (10g/l). Os dados experimentais em condições diferentes das condições de referência foram utilizados para validar as previsões do modelo e para avaliar a fidelidade do modelo ao descrever o efeito inibidor dos açúcares. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos da Universidade Federal de São Carlos.

2.1. Desenvolvimento do Modelo

A Figura 1 apresenta um esquema da hidrólise da celulose em glicose baseado em três reações (r_1 , r_2 , r_3). Uma reação a mais (r_4) foi considerada para modelar a hidrólise da hemicelulose em xilose, seguindo a proposta de Câmara (2012). As equações do modelo são listadas na Tabela 2.

O complexo enzimático foi modelado como uma pseudo-enzima com diferentes atividades

enzimáticas, sem distinção entre celulose amorfa e cristalina. A atividade enzimática foi considerada proporcional à concentração de proteína na fase aquosa (Ooshima *et al.*, 1990), considerou-se que a composição na superfície varia pouco durante a hidrólise (Liao *et al.*, 2008), a adsorção foi descrita por isoterma tipo Langmuir, a conversão de cellobiose em glicose em solução foi descrita pela cinética de Michaelis-Menten e a inativação térmica e mecânica da enzima foi desprezada.

Tabela 2 - Modelo cinético da hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica

Adsorção da enzima e equações de taxa	Balanços de massa
Isoterma de adsorção tipo Langmuir. $\frac{E_B}{S} = \frac{E_{\max} K_{ad} E_F}{1 + K_{ad} E_F}$	(1) Enzima total $E_T = E_F + E_B$ (8)
Enzima adsorvida na celulose (C). $E_{BC} = E_B \frac{C}{S}$	(2) Sólidos insolúveis (S) $S = C + H + L$ (9)
Enzima adsorvida na hemicelulose (H). $E_{BH} = E_B \frac{H}{S}$	(3) Celulose $\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_2$ (10)
Conversão da celulose (C) em cellobiose (G2). $r_1 = \frac{k_{1r} E_{BC} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{1IG2}} + \frac{G}{K_{1IG}} + \frac{X}{K_{1IX}}}$	(4) Cellobiose $\frac{dG2}{dt} = 1,056r_1 - r_3$ (11)
Conversão da celulose (C) em glicose (G). $r_2 = \frac{k_{2r} E_{BC} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{2IG2}} + \frac{G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}}$	(5) Glicose $\frac{dG}{dt} = 1,111r_2 + 1,053r_3$ (12)
Conversão da cellobiose (G2) em glicose (G). $r_3 = \frac{k_{3r} E_F G2}{K_{3M} \left(1 + \frac{G}{K_{3IG}} + \frac{X}{K_{3IX}} \right) + G2}$	(6) Hemicelulose $\frac{dH}{dt} = -r_4$ (13)
Conversão da hemicelulose (H) em xilose (X). $r_4 = \frac{k_{4r} E_{BH} R_S S}{1 + \frac{G2}{K_{4IG2}} + \frac{G}{K_{4IG}} + \frac{X}{K_{4IX}}}$	(7) Xilose $\frac{dX}{dt} = 1,136r_4$ (14)

2.2. Metodologia Computacional

O software EMSO (Soares e Secchi, 2003) foi utilizado para estimar tanto os parâmetros de adsorção quanto os parâmetros cinéticos do modelo. Os parâmetros da isoterma tipo Langmuir foram estimados independentemente a partir dos dados experimentais de proteína no sobrenadante das

hidrólises com diferentes cargas de enzima de acordo com a Tabela 1. A constante de reatividade do substrato (α) foi considerada unitária segundo o valor usado por Câmara (2012) para bagaço.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros foram estimados pelo método dos Mínimos Quadrados Ponderados usando o algoritmo dos poliedros flexíveis. Os dois conjuntos de parâmetros estimados (adsorção e cinéticos) são listados na Tabela 3 (na coluna Modelo Original).

Tabela 3 - Parâmetros estimados do modelo

Parâmetro	Valor		
	Parâmetros de adsorção		
K_{ad} (l/g)		7,16	
E_{max} (g/kg)		8,32	
	Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos dados de sacarificação		
	Modelo Original	Modelo Simplificado	Com todos os dados*
k_{1r} (l/g/h)	0,028	0,104	0,015
k_{2r} (l/g/h)	4,78	2,76	0,548
k_{3r} (1/h)	187,8	143,2	170,9
k_{4r} (l/g/h)	15,66	21,42	6,85
K_{IIG2} (l/g)	0,545	1,98	6,02
K_{IIG} (l/g)	2,93	0,546	3,57
K_{IIIX} (l/g)	5,07	1,60	5,45
K_{2IG2} (l/g)	117,2		
K_{2IG} (l/g)	0,329		
K_{2IX} (l/g)	0,325		
K_{3M} (l/g)	25,50	45,49	45,6
K_{3IG} (l/g)	0,216	0,409	0,032
K_{3IX} (l/g)	59,07	73,10	79,42
K_{4IG2} (l/g)	20,68		
K_{4IG} (l/g)	0,728		
K_{4IX} (l/g)	196,4		

* Parâmetros estimados com o Modelo Simplificado usando todos os dados experimentais disponíveis.

O conjunto de parâmetros do Modelo Original forneceu um bom ajuste para os dados experimentais na condição de referência conforme mostra a Figura 2a, porém, não foi possível estimar a significância, o intervalo de confiança (IC), e a matriz de correlação dos parâmetros, devido à alta correlação entre eles que gerou mau condicionamento da matriz de informação de Fisher. Sin *et al.* (2010) analisaram estatisticamente este modelo e observaram que todos os parâmetros têm IC muito grande, isto significa que os parâmetros são estatisticamente não identificáveis e que o modelo está sobreparametrizado em relação às medições disponíveis.

Baseado nos fundamentos da cinética enzimática uma simplificação do modelo foi proposta para superar a correlação paramétrica. Dado que o complexo enzimático foi modelado como uma pseudo-enzima com múltiplas atividades, as constantes de inibição das reações cinéticas que acontecem na interface sólido-líquido (r_1 , r_2 e r_4) K_{ilG2} , K_{ilG} e K_{iIX} ($i=1,2$ e 4) nas Eq. (4), (5) e (7),

foram substituídas por um só conjunto de constantes de inibição (K_{IG2} , K_{IG} e K_{IX}) que representam o efeito global da inibição dos produtos da hidrólise sobre as atividades da pseudo-enzima. Os parâmetros estimados para o modelo simplificado e o ajuste do modelo nas condições de referência são apresentados na Tabela 3 (na coluna Modelo Simplificado) e na Figura 2b, respectivamente.

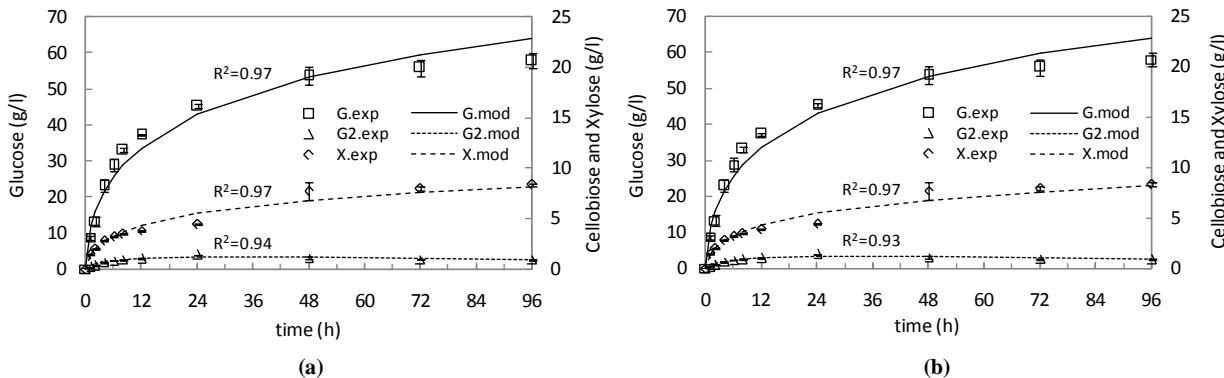


Figura 2 - Hidrólise enzimática de PCA pré-tratada nas condições de referência. (a) Modelo Original (com todos os parâmetros); (b) Modelo Simplificado.

De acordo com a Figura 2, o ajuste do modelo não foi afetado pela simplificação no número de parâmetros. Embora o modelo simplificado permitisse avaliar a significância, IC e a matriz de correlação dos parâmetros (dados não apresentados), alguns parâmetros continuaram fortemente correlacionados (17 pares de parâmetros com coeficiente de correlação paramétrica $|\rho_{ij}| > 0,90$). Assim, uma nova estimativa de parâmetros foi feita na tentativa de reduzir a correlação usando todos os dados experimentais disponíveis. Os parâmetros obtidos e o ajuste do modelo na condição de referência são apresentados na Tabela 3 (na coluna "Com todos os dados") e na Figura 3, respectivamente.

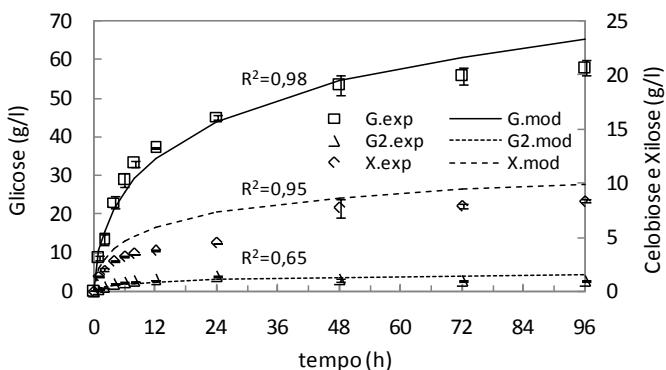


Figura 3 - Hidrólise enzimática de PCA pré-tratada nas condições de referência. Parâmetros estimados para o modelo simplificado com todos os dados experimentais disponíveis.

A nova estimação melhorou a significância e o IC dos parâmetros além de reduzir a correlação em 50%. Apesar de ter degradado o ajuste para a concentração de celobiose na condição de referência, as previsões de glicose e xilose continuaram sendo boas e foram melhoradas as previsões de celobiose para outras condições experimentais como é apresentado na Tabela 4 (colunas sombreadas).

Tabela 4 - Comparaçāo do ajuste (R^2) do modelo para diferentes condições experimentais

Efeito da carga enzimática (FPU/g-celulose)																								60							
5						15						20						25						30							
G		G2		X		G		G2		X		G		G2		X		G		G2		X		G		G2		X			
MO	0,98	0,87	0,99	0,99	0,67	0,97	0,98	0,16	0,96	0,98	0,09	0,93	0,93	0,21	0,89	0,89	0,02	0,87													
MS	0,98	0,85	0,99	0,99	0,66	0,97	0,98	0,15	0,96	0,98	0,07	0,94	0,93	0,19	0,90	0,89	0,01	0,87													
TE	0,98	0,91	0,99	0,99	0,39	0,98	0,99	0,96	0,97	0,98	0,97	0,95	0,92	0,89	0,93	0,88	0,87	0,89													
Efeito da carga de sólidos (%m/v)						Efeito da inibição pelos açúcares (g/l)																									
10						20						10X						30G						60G						10G2	
G		G2		X		G		G2		X		G		G2		X		G		G2		X		G		G2		X			
MO	0,96	0,38	0,83	0,94	0,67	0,99		0,97	0,54	0,82	0,87	0,82	0,74	0,91	0,08	0,43	0,96	0,83	0,75												
MS	0,96	0,35	0,83	0,94	0,66	0,99		0,96	0,56	0,85	0,88	0,83	0,75	0,91	0,06	0,44	0,96	0,78	0,75												
TE	0,96	0,78	0,86	0,94	0,82	0,97		0,96	0,85	0,87	0,87	0,87	0,80	0,91	0,04	0,50	0,96	0,77	0,79												

MO: Modelo Original; MS: Modelo Simplificado; TE: Modelo Simplificado usando todos os dados experimentais.

4. CONCLUSÕES

Um modelo semimecanístico multireacional simplificado foi gerado para descrever a hidrólise enzimática da palha de cana de açúcar pré-tratada hidrotermicamente. Além de melhorar a correlação paramétrica, o modelo simplificado mostrou ter capacidade de predizer o comportamento da hidrólise enzimática da PCA para diferentes condições de carga de sólidos, enzima e açúcares iniciais. Embora o modelo ainda tenha alguma dificuldade em estimar a celobiose e xilose sob o efeito inibitório da glicose (60g/l), o modelo prediz com boa acurácia a concentração de glicose ($R^2 > 0,87$) e o importante efeito inibitório da enzima pelos produtos em altas concentrações de sólidos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 833-848, 2009.
- BROWN, R. F.; ABOGBO, F. K.; HOLTZAPPLE, M. T. Comparison of mechanistic models in the initial rate enzymatic hydrolysis of AFEX-treated wheat straw. *Biotechnol. Biofuels*, v.3:6, doi:10.1186/1754-6834-3-6, 2010.
- CÂMARA, M. M. *Modelagem e simulação da hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio em meio alcalino* (Dissertação de M.Sc.). Universidade Estadual de Maringá, 2012.

- HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; McMILLAN, J. D. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.152, p. 88-107, 2009.
- KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Progr.*, v.20, p. 698-705, 2004.
- LIAO, W.; LIU, Y.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure. *Biotechnol. Bioeng.*, v.101, p. 441-451, 2008.
- MOHAGHEGHI, A.; TUCKER, M.; GROHMANN, K.; WYMAN, C. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.33, p. 67-81, 1992.
- MORALES-RODRIGUEZ, R.; CAPRON, M.; HUUSOM, J. K.; SIN, G. Controlled fed-batch operation for improving cellulose hydrolysis in 2G bioethanol production. *20th European Symposium on Computer Aided Process Engineering – ESCAPE20*. Ischia, Naples, Italy, June 6-9, 2010.
- MORALES-RODRIGUEZ, R.; MEYER, A. S.; GERNAEY, K. V.; SIN, G. Dynamic model-based evaluation of process configurations for integrated operation of hydrolysis and co-fermentation for bioethanol production from lignocellulose. *Bioresour. Technol.*, v.102, p. 1174-1184, 2011.
- MUTTURI, S.; LIDEN, G. Model-based estimation of optimal temperature profile during simultaneous saccharification and fermentation of *Arundo donax*. *Biotechnol. Bioeng.*, doi:10.1002/bit.25165, 2013.
- OOSHIMA, H., BURNS, D. S., CONVERSE, A. O. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignacious residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotechnol. Bioeng.*, v.36, p. 446-452, 1990.
- SIN, G.; MEYER, A. S.; GERNAEY, K. V. Assessing reliability of cellulose hydrolysis models to support biofuel process design-Identifiability and uncertainty analysis. *Comput. Chem. Eng.*, v.34, p. 1385-1392, 2010.
- SOARES, R. P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation. *Comput. Aided Chem. Eng.*, v.14, p. 947-952, 2003.
- SOUZA, R. B. A.; CRUZ, A. J. G. Pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação da palha de cana-de-açúcar. *XIX simpósio nacional de bioprocessos e X simpósio de hidrólise enzimática de biomassas*, Foz de Iguaçu, Brasil, 30 de julho-02 de agosto, 2013.
- SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermuda grass for ethanol production. *Bioresour. Technol.*, v.96, p. 1599-1606, 2005.
- ZHANG, Y-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 88, p. 797-824, 2004.
- ZHENG, Y.; PAN Z.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnol. Bioeng.*, v.102, p. 1558-1569, 2009.