

## HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAL PARTICULADO EMPREGANDO COQUETÉIS CELULOLÍTICOS FÚNGICOS

P. A. CASCIATORI<sup>1\*</sup>, F. P. CASCIATORI<sup>2</sup>, J. C. THOMÉO<sup>2</sup>, O. M. PERRONE<sup>1</sup>, R. DA SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/Ibilce), Departamento de Química e Ciências Ambientais

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/Ibilce), Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos

\*e-mail: pricasciatori@yahoo.com.br

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a aplicação, na hidrólise do bagaço de cana *in natura*, de um coquetel enzimático constituído por enzimas produzidas por fungos potencialmente produtores de celulasas em cultivo sólido em substrato composto por farelo de trigo e bagaço de cana. A degradação enzimática completa de moléculas complexas presentes na biomassa nativa do bagaço de cana requer a ação de várias enzimas. Diante disso, novas estratégias vêm surgindo na tentativa de aumentar o rendimento da hidrólise e uma explorada no presente trabalho é a consorciação de diferentes enzimas atuando de forma sinérgica sobre o material lignocelulósico particulado. Foi adotado um delineamento fatorial completo, tendo como fatores a composição do coquetel enzimático, cujos níveis foram de 1:0, 1:1, 1:3, 3:1 e 0:1 do extrato produzido por *T. reesei* e *M. thermophila*, respectivamente, e temperatura de hidrólise, cujos níveis foram de 45, 55, 65 °C e com alternância de temperatura entre 45 e 65 °C. Foram feitas análises de variância e comparação de médias através de testes de Tukey. A aplicação das diferentes composições resultaram em valores similares de conversão de celulose em glicose, com melhores resultados obtidos pela combinação de 75 % do extrato de *T. reesei* com 25 % de *M. thermophila* aplicado com alternância entre as temperaturas ótimas dos microrganismos, resultando em 13,1 % de conversão. Conclui-se, portanto, que houve efeito sinérgico entre as enzimas no processo de hidrólise.

### 1 INTRODUÇÃO

A produção de enzimas celulolíticas e sua aplicação na hidrólise de materiais particulados lignocelulósicos para produção de etanol celulósico são tecnologias em fase de desenvolvimento, para as quais determinadas ferramentas e estratégias podem ser aplicadas visando aumento de produtividade e redução dos custos. A fermentação em estado sólido (FES) é um processo eficiente para obtenção de enzimas hidrolíticas, as quais podem ser utilizadas na

hidrólise enzimática. Assim, estudos sobre a preparação de diferentes coquetéis enzimáticos são relevantes, englobando isolamento e identificação de microrganismos produtores, análise da produção enzimática, seleção do substrato hidrolisado, levando-se em conta o tamanho da partícula e avaliação da eficiência na hidrólise.

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática incluem o tipo de substrato, a atividade celulolítica e as condições de reação (temperatura, pH, presença de sais, entre outros parâmetros). Para melhorar o

rendimento e a taxa de hidrólise enzimática, as pesquisas focam na otimização do processo hidrolítico e no aumento da atividade celulolítica (Cantwell, 1988). Quanto ao tipo de substrato, os fatores mais importantes que afetam a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos são a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização, o conteúdo de umidade, a área superficial disponível e o conteúdo de lignina (Laureano-Perez et al., 2005). Grous et al. (1986) e Thompson et al. (1992) concluíram que o tamanho dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas é o principal fator limitante da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.

Sabe-se que a degradação enzimática completa de moléculas complexas como as hemiceluloses e celulosas, além de pectinas e proteínas presentes na biomassa nativa requer a ação de várias enzimas. Além disso, fatores como inibição enzimática contribuem para dificultar o processo. Diante disso, novas estratégias vêm surgindo na tentativa de aumentar o rendimento da hidrólise e uma explorada no presente trabalho é a consorciação de diferentes enzimas atuando de forma sinérgica sobre a biomassa. Neste sistema dificuldades e barreiras que uma enzima não vencer serão contornadas e ou complementada pela ação de outra enzima não sujeita à mesma situação, aumentando a eficiência global do processo.

O fungo *Myceliophthora thermophila* é um bom produtor de endoglucanase e endoxilanase, atuando internamente nos substratos, porém produz pequena quantidade de exoglucanase. O fungo *Trichoderma reesei* é reconhecido pela capacidade de produzir diversos sistemas extracelulares de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos, mas apresenta uma deficiência na produção de  $\beta$ -glicosidases (Béguin, 1990). Desta forma, um aumento na eficiência da hidrólise poderia ser obtido buscando o sinergismo entre enzimas dextrinizantes e sacarificantes dos

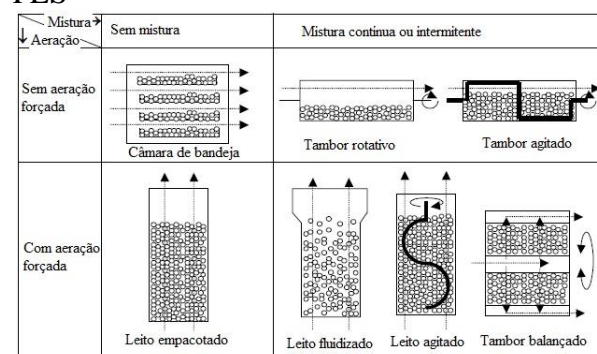
diferentes microrganismos. Assim, os coquetéis enzimáticos a partir da mistura de extratos de diferentes fungos são alternativas futuras para elevar a eficiência do processo de hidrólise enzimática.

### 1.1 Biorreatores de Leito Fixo para Fermentação no Estado Sólido

O biorreator, fermentador, reator biológico ou reator químico é o local onde ocorre o processo fermentativo, no qual substrato e microrganismo são colocados em contato para que a fermentação ocorra, de modo que se obtenha o bioproduto de interesse ao final do processo. A função do equipamento é, portanto, simular as condições do habitat natural de um microrganismo para que nele se realize a produção do composto desejado.

Os biorreatores de fermentação no estado sólido podem ser classificados de acordo com os regimes de agitação e aeração, podendo ser de leito empacotado, de bandeja, de tambor rotativo, de leito fluidizado, entre outros, conforme mostrado na Figura 1 (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

**Figura 1** – Classificação de biorreatores de FES



Fonte: MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER (2000)

O tipo de biorreator de interesse deste trabalho foi o de leito empacotado, o qual é operado com aeracão forçada e normalmente é composto por três seções: uma seção de entrada (para condicionamento das

propriedades do ar); uma seção térmica (onde ocorre a fermentação propriamente dita, devendo ser encamisada para manutenção da temperatura ótima do processo) e uma seção de saída (onde ocorre a exaustão, evitando contaminação do biorreator pelo ambiente e do ambiente pelo ar que sai do reator).

Em termos de construção e manutenção, os fermentadores de leito fixo são mais baratos que os de leito móvel. Seu projeto é relativamente simples, de fácil manuseio e baixo requisito operacional, configurando-se como um tubo interno, no qual é empacotado o substrato inoculado, circundado por uma camisa, pela qual circula água na temperatura ideal para a reação. Sua característica de leito estático o torna ideal para microrganismos sensíveis às tensões de cisalhamento, como é o caso de alguns fungos filamentosos, que podem ter suas hifas rompidas com a movimentação do leito, o que prejudicaria o desenvolvimento do microrganismo.

No entanto, as principais desvantagens deste reator são a segregação de umidade e a heterogeneidade térmica, que afetam a taxa e a seletividade das reações, com distribuição de produtos não homogênea no fermentador (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

## **1.2 Interação Sinérgica e os Coquetéis Enzimáticos**

Existem dois principais gargalos no processo de obtenção biotecnológica de etanol celulósico: os métodos de pré-tratamento impostos à biomassa e os altos custos de produção de celulasas, os quais poderiam ser reduzidos por meio da utilização de preparados enzimáticos com elevadas atividades específicas (SINGHANIA et al., 2010). Para aperfeiçoar a utilização das enzimas celulolíticas nos processos de sacarificação da biomassa diversas alternativas têm sido estudadas e dentre as possibilidades, algumas são apontadas com elevado potencial de sucesso (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).

O conceito de engenharia de produto pode ser aplicado em processos de produção de celulasas, visando a obtenção de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas do complexo celulolítico, em particular endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. O formulado ideal pode ser obtido pelo cocultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulasas (WEN; LIAO; CHEN, 2005); pela produção em separado das celulasas e posterior mistura dos extratos, em proporções pré-otimizadas (KÁDÁR; SZENGYEL; RÉCZEY, 2004; XIAO et al., 2004; IMAI; IKARI; SUZUKI, 2004); ou ainda pela incorporação controlada de genes de celulasas em organismos hospedeiros, de forma que a célula modificada já excrete as enzimas em proporções ideais (SRIVASTAVA; VERMA; SRIVASTAVA, 1999).

As enzimas celulolíticas são produzidas por diferentes microrganismos, que em sua maioria apresenta grandes restrições que dificultam ou geram custos adicionais ao processo de produção de celulasas. A biologia molecular é uma ferramenta que pode ser utilizada como alternativa para superar as restrições e dificuldades na produção enzimática, possibilitando a expressão somente das enzimas desejáveis, reduzindo ou anulando a produção de proteínas interferentes; aumentando a velocidade de crescimento, minimizando o tempo de produção; aprimorando a produtividade enzimática e as propriedades cinéticas e físico-químicas da enzima; e facilitando as etapas de *downstream*, sobretudo quando há secreção da proteína para o meio de cultivo (FERREIRA, 2010).

Sabe-se que o substrato é atacado pelas enzimas do complexo celulolítico de modo sinérgico, resultando num aumento da eficiência pela ação conjunta dos componentes de um sistema quando comparado a atuação isolada dos mesmos. Assim, o sinergismo observado nas enzimas

celulolíticas provoca um aumento significativo na velocidade de formação de produtos solúveis em comparação à velocidade de atuação isolada das celulases (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

Essa interação sinérgica pode ocorrer entre uma endoglucanase de determinada espécie de microrganismos e uma celobiohidrolase de outra espécie. As celobiohidrolases possuem a capacidade de atuar de modo acelerado na extremidade gerada pela ação das endoglucanases na cadeia do polissacarídeo, evidenciando que as enzimas encontram-se distribuídas ao longo da fibra de celulose. Além disso, é possível que ocorra sinérgismo entre os diversos subtipos de celobiohidrolases, pois existem enzimas que atuam nas extremidades redutoras (celobiohidrolases do tipo I – CBHI) e enzimas que atuam nas extremidades não-redutoras (celobiohidrolases do tipo II – CBHII) das fibras de celulose (LYND et al., 2002). O grau de sinérgismo varia de acordo com o tipo de celulose empregada como substrato, uma vez que na presença de celulose cristalina o sinérgismo do tipo endo-exo é elevado, diminuindo na celulose amorfa e tornando-se muito baixo ou ausente em derivados solúveis da celulose como, por exemplo, a carboximetilcelulose (CMC) (BHAT; BHAT, 1997).

Atualmente existem no mercado diversos consórcios enzimáticos comerciais, os quais são constituídos pelos três grupos de celulases: Endoglucanases, Celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosídeses. No entanto, esses preparados enzimáticos possuem baixa atividade  $\beta$ -glucosídica, o que faz necessária a suplementação desta enzima para efetiva atuação na hidrólise enzimática da biomassa.

As enzimas comerciais são uma mistura de enzimas obtidas de diferentes microrganismos com a finalidade de formar um coquetel enzimático com altas concentrações das principais frações

enzimáticas que compõem as celulases (AFONSO, 2012). Essas enzimas são produzidas por empresas internacionais e os principais preparados enzimáticos disponíveis no mercado utilizam, em sua maioria, fungos filamentosos como fonte para o *pool* enzimático (FERREIRA, 2010). Entre os microrganismos mais empregados pelas empresas produtoras destacam-se os preparados enzimáticos constituídos por celulases secretadas por *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma viride*, os quais podem ser empregados isoladamente ou pela consorciação de enzimas de outro microrganismo para suplementação das celulases.

Apesar da interação sinérgica já mencionada, a impressionante eficiência de degradação da biomassa demonstrada por vários microrganismos na natureza não podem ser atribuídas isoladamente a este mecanismo endo-exo hidrolítico. Extrair e processar uma única cadeia de celulose a partir de seu ambiente compacto e recalcitrante demanda energia, considerando a alta cristalinidade da celulose e sua forte associação a outros polissacarídeos da parede celular. Sistemas de liberação de oxidantes de baixo peso molecular tais como o radical livre hidroxila, que ataca aleatoriamente o substrato por reações químicas do tipo Fenton, tem sido supostos a atuar em conjunto com celulases na degradação da lignocelulose. Estes incluem: celobiose desidrogenase, quinona cíclica redox e reação Fenton glicopeptídica (BALDRIAN; VALÁSKOVÁ, 2008).

Além das enzimas que atuam diretamente sobre as ligações covalentes em polissacarídeos da parede celular de plantas, enzimas que atuam indiretamente, também podem ser importantes na degradação da lignocelulose. Há três categorias de tais enzimas. O primeiro grupo é composto pelas proteínas não-enzimáticas, que contribuem para afrouxamento da parede, tais como



expansina e seus homólogos fúngicos e bacterianos. Um segundo grupo é constituído por enzimas que podem ser indiretamente críticas, sendo as que degradam os componentes não-glicosídicos de parede, tais como a lignina e proteínas, facilitando deste modo o acesso das glicosil-hidrolases. Um terceiro grupo potencialmente importante de enzimas auxiliares pode ser aquele que degrada moléculas pequenas, liberadas pelos pré-tratamentos, que inibem as enzimas degradativas centrais ou os passos posteriores de fermentação (BANERJEE; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2010).

Uma maior eficiência dos coquetéis enzimáticos aplicados na hidrólise dos materiais lignocelulósicos provavelmente pode ser obtida por misturas não somente focadas nas enzimas principais da degradação da celulose (endoglucanase, celobiohidrolase,  $\beta$ -glicosidase, endoxilanase e  $\beta$ -glicosidase), mas sim em inúmeras outras denominadas acessórias que atuam sobre as ligações menos abundantes encontradas na parede celular vegetal. Entre as enzimas acessórias de maior importância podem ser citadas: arabinases, glucanases, liases, pectinases e vários tipos de esterases (BERLIN et al., 2007). Assim, os coquetéis enzimáticos a partir da mistura de extratos de fungos distintos são alternativas futuras para elevar a eficiência do processo de sacarificação enzimática, permitindo a ação sinérgica de diferentes enzimas sobre a biomassa (SØRENSEN et al., 2007).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos e Substratos

Os microrganismos empregados foram *Trichoderma reesei* QM9414 e *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Como substratos, foram empregados bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. O farelo foi comprado no comércio local e foi utilizado nos ensaios tal como adquirido. O bagaço foi doado pela Usina Vale, de Onda Verde-SP,

tendo sido lavado com água corrente para remoção de terra e de açúcares residuais do processo de moagem da cana-de-açúcar, sendo esses dosados na água de lavagem pelo reagente DNS (MILLER, 1959) até não ser possível sua detecção, após o que foi seco em estufa a 65 °C até peso constante. Para fins de padronização do tamanho das fibras, o bagaço foi peneirado em peneiras de 4 e 3 mm, separando-se para uso nos experimentos apenas o bagaço retido na peneira de 3 mm, separando-se as fibras maiores e o excesso de pó fino. Bagaço de cana e farelo de trigo foram acondicionados em sacos de polietileno de parede espessa em câmara de refrigeração até utilização. Para os ensaios, o substrato foi autoclavado, bem como a solução nutritiva. Posteriormente, o substrato foi inoculado com a suspensão fúngica e incubado na temperatura ótima para crescimento e fermentação.

### 2.2 Fermentação em Reator de Leito Empacotado

A fermentação em reator de leito empacotado foi realizada em sistema similar ao empregado por Casciadori et al. (2013). O fermentador foi construído em módulos encamisados em aço inox, com 7,62 cm de diâmetro interno e 10 cm de comprimento, de modo que seu comprimento totalizou 1 m de altura por meio da adição consecutiva dos 10 módulos.

O cultivo foi realizado em substrato composto por bagaço de cana e farelo de trigo na proporção de 7:3 m/m e umidade inicial de 75 % para o termofílico *M. thermophila* e 9:1 m/m e 70 % para o mesofílico *T. reesei*. As temperaturas do ar e da camisa foram de 45 °C e 28 °C e tempo de fermentação de 96 e 168 horas, respectivamente. A taxa de aeração para ambos os fungos foi de 240 L/h.

### 2.3 Preparo do material e padronização do tamanho da fibra hidrolisada

Como matéria prima para a hidrólise enzimática, o bagaço de cana coletado na Usina Vale de Onda Verde-SP, já lavado e seco conforme descrito anteriormente para utilização como substrato na FES, foi nesta etapa triturado em um triturador industrial utilizando duas peneiras, uma de poros de 1 mm e outra de poros de 3 mm, e separado em peneira granulométrica de 0,84 mm, 1,41 mm e 3,36 mm para padronização do tamanho da fibra, aproveitando-se a porção que conseguiu atravessar a malha da peneira. Após a separação em peneiras granulométricas, a fibra foi submetida à hidrólise enzimática com enzima comercial (Prozyn®). Após a hidrólise o sobrenadante foi filtrado e utilizado para quantificar glicose, xilose e arabinose por HPLC para avaliar a influência da área superficial disponível na hidrólise.

## 2.4 Hidrólise Enzimática

As hidrólises enzimáticas foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL, pesando-se 0,2 g de bagaço, adicionando-se 7,0 mL de extrato enzimático e completando-se o volume final para 10 mL com tampão acetato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0. Foi adotado um planejamento fatorial completo, tendo como fatores a composição do coquetel e a temperatura de hidrólise, respectivamente, com 5 e 4 níveis. Nas hidrólises aplicaram-se os extratos puros e na forma de coquetéis enzimáticos. As composições do coquetel enzimático foram: 1:1; 1:3 e 3:1 e as temperaturas de hidrólise: 45, 55, 65 °C e com alternância de temperatura entre 45 e 65 °C, variando-se a cada uma hora, com duração total de 6 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata em banho termostático com agitador orbital a 150 rpm. Os açúcares redutores do hidrolisado foram determinados pelo método de Miller (1959).

O cálculo de conversão de glicose em celulose foi feito a partir da Equação 1 descrita de acordo com Afonso (2012).

$$X = C_{\text{glicose}} \cdot \frac{v}{m_{\text{hidrolisável}}} \cdot \frac{1}{f} \cdot FE \cdot 100 \quad (1)$$

onde X (%) é a porcentagem de glicose convertida; C<sub>glicose</sub> (g/L) é a concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática, determinada pelo método de dosagem de açúcar redutor (MILLER, 1959); v (L) é o volume total da solução adicionada à hidrólise, a qual no presente trabalho foi igual a 10 mL; m<sub>hidrolisável</sub> (g) é a massa de material hidrolisável utilizada descontando-se o teor de umidade presente no bagaço de cana (massa de água), determinado por peso seco; f (g<sub>celulose</sub>/g<sub>hidrolisável</sub>) é a fração de celulose no material hidrolisável utilizado, o qual foi tomado como sendo igual a 38,3 % do bagaço de cana, valor experimental da fração de celulose presente no bagaço de cana e FE é o fator estequiométrico da relação de celulose a glicose, que é igual a 0,9 (AFONSO, 2012).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Determinação do tamanho da partícula de hidrólise

Na Tabela 1 são exibidos os teores de glicose, xilose e arabinose do hidrolisado dos diferentes tamanhos de fibra.

**Tabela 1.** Teores de glicose, xilose e arabinose do hidrolisado e B.E.T. dos diferentes tamanhos de fibra.

| Tamanho da peneira (mm) | Glicose (mg/g) | Xilose (mg/g) | Arabinose (mg/g) | Área superficial (BET) (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|----------------|---------------|------------------|--|
| 0,84                    | 75±8           | 22±1          | 8,0±0,9          | 0,8 ± 0,1  |
| 0,84-1,41               | 54±4           | 16±1          | 5,6±0,4          | 0,6 ± 0,1  |
| 1,41-3,36               | 35±1           | 13±1          | 3,5±0,1          | 0,4 ± 0,1  |

Os dados obtidos indicam que com a utilização da fibra peneirada em 0,84 mm obtém-se melhor desempenho na liberação de açúcares durante a hidrólise enzimática, o que pode ser explicado principalmente pelo aumento da área superficial disponível,

facilitando a enzima no acesso a seu substrato. Por ter sido mais representativo, as hidrólises empregando-se os coquetéis enzimáticos foram realizadas com o bagaço peneirado em 0,84 mm. Foi feita a caracterização química desse material de acordo com a metodologia descrita por Sluiter et al. (2002). Os resultados indicam que o material particulado empregado nas hidrólises contém 38,3 % de celulose, 19,3 % de hemicelulose, 28,7 % de lignina e 2,7 % de cinzas.

### 3.2 Aplicação dos coquetéis na hidrólise

Os resultados da liberação de açúcares redutores e do percentual de conversão de celulose a glicose na hidrólise do bagaço de cana *in natura* empregando os coquetéis enzimáticos são apresentados na Tabela 2.

Na Figura 2 são apresentadas as concentrações de açúcares redutores por grama de bagaço de cana *in natura* obtidas da hidrólise aplicando coquetéis enzimáticos dos extratos celulolíticos produzidos por *T. reesei* e *M. thermophila* em diferentes composições e temperaturas.

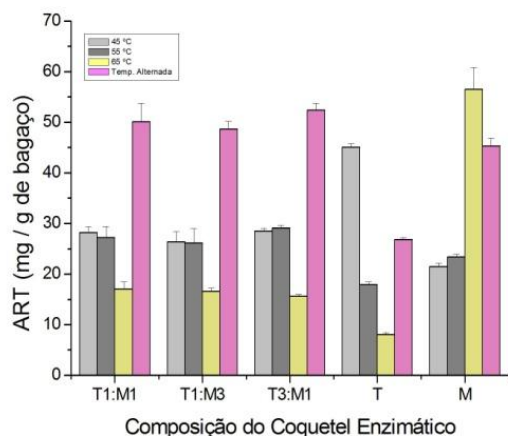
**Tabela 2** – Liberação de açúcares redutores e percentual de conversão na hidrólise do bagaço *in natura* empregando os coquetéis enzimáticos.

| Ensaio* | ART (mg / g de bagaço) |       |       |             | Glicose (%) |       |       |             |
|---------|------------------------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|
|         | 45 °C                  | 55 °C | 65 °C | Alternada** | 45 °C       | 55 °C | 65 °C | Alternada** |
| T1:M1   | 28,2                   | 27,0  | 17,0  | 50,1        | 7,0         | 6,8   | 4,3   | 12,5        |
| T1:M3   | 26,5                   | 26,2  | 16,6  | 48,7        | 6,6         | 6,5   | 4,2   | 12,1        |
| T3:M1   | 28,6                   | 29,2  | 15,7  | 52,4        | 7,1         | 7,3   | 3,9   | 13,1        |
| T       | 45,1                   | 17,9  | 8,1   | 26,9        | 11,3        | 4,5   | 2,0   | 6,7         |
| M       | 21,5                   | 23,4  | 56,5  | 45,3        | 5,4         | 5,9   | 14,1  | 11,3        |

\* Composições do coquetel enzimático a partir da mistura dos extratos produzidos por *T. reesei* (T) e *M. thermophila* (M), respectivamente.

\*\*Alternada = Hidrólise com alternância da temperatura entre 45 e 65 °C a cada 1 hora.

**Figura 2** – Teores de ART liberados na sacarificação do bagaço de cana *in natura* pela ação dos coquetéis enzimáticos.

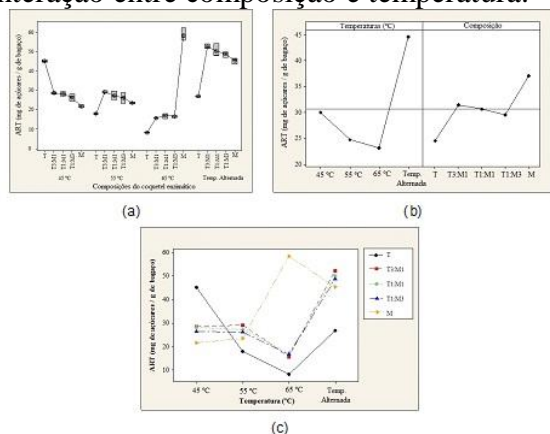


A Figura 3 mostra os resultados das análises estatísticas da hidrólise do bagaço de

cana *in natura* em que são apresentados o box-plot dos dados, efeitos principais de composição e temperatura de hidrólise e efeito de interação entre composição e temperatura.

Na Figura 3 observa-se que a aplicação do extrato puro produzido pelo fungo *M. thermophila* a 65 °C resulta em maiores teores de ART. Para aplicação dos coquetéis enzimáticos ocorreu liberação máxima de ART quando aplicado o coquetel constituído por 75 % do extrato enzimático produzido por *T. reesei* e 25 % do produzido por *M. thermophila* (T3:M1) com alternância de temperatura entre 45 e 65 °C, resultando em uma conversão de 13,1 % de celulose em glicose, com nível de significância estatística de 5 %.

**Figura 3** – Análises estatísticas dos resultados da hidrólise do bagaço de cana *in natura* por ação dos coquetéis enzimáticos: (a) Box-Plot; (b) Efeitos principais de composição e temperatura; (c) Efeito de interação entre composição e temperatura.



No entanto, o emprego das diferentes composições do coquetel enzimático resultou em valores similares de conversão de celulose a glicose, conforme observado na Tabela 2. Quando da aplicação dos extratos puros na temperatura ótima de cada microrganismo obteve-se conversão máxima de 14,1 % para o termofílico e 11,3 % para o mesofílico. Portanto, na condição ideal da reação, ambos os fungos respondem de maneira similar à hidrólise do bagaço de cana *in natura*. Assim, independente da quantidade dos extratos mistos aplicados (diferentes composições empregadas), os resultados da hidrólise desse substrato serão semelhantes.

Para os ensaios realizados em 45 °C, possivelmente, as celulasas do fungo termofílico, ao participarem da hidrólise do substrato, liberam para o meio reacional celobiose, que ocasiona inibição das enzimas do fungo mesofílico. Ademais, as celulasas de *M. thermophila* podem ter sofrido redução de atividade por não trabalhar em sua temperatura ótima. Por outro lado, nas hidrólises realizadas a 65 °C, a aplicação das celulasas puras do fungo *T. reesei* resultou em valores muito baixos de ART, indicando que sofreram desnaturação térmica. Diante disso,

observou-se que para aplicação individual das celulasas do fungo *T. reesei* a liberação de ART reduz com a elevação da temperatura, devido à desnaturação térmica. Já para as celulasas do fungo *M. thermophila* os teores de ART aumentam com o aumento da temperatura, pois em baixas temperaturas, as enzimas do fungo termofílico não atuam com sua máxima capacidade, reduzindo a eficiência da hidrólise enzimática.

Assim, para aplicação do coquetel constituído por enzimas dos fungos *T. reesei* e *M. thermophila* na sacarificação do bagaço de cana *in natura*, pode-se considerar que a condição térmica ideal é aquela que permite trabalhar com alternância entre as temperaturas ótimas dos microrganismos, possibilitando a ação das celulasas de ambos os fungos e evitando a desnaturação e a inativação enzimática.

## 4 CONCLUSÃO

A menor granulometria do material particulado apresentou melhor desempenho na hidrólise enzimática, pois o aumento da área superficial disponível facilita o acesso da enzima ao substrato. A aplicação dos coquetéis enzimáticos na hidrólise do bagaço de cana *in natura* mostrou-se favorável para o processo, estando correlacionado com a composição do coquetel celulolítico e temperatura de hidrólise. As diferentes composições dos extratos celulolíticos resultaram em valores similares de conversão de celulose em glicose, com melhores resultados trabalhando-se com alternância entre as temperaturas ótimas dos microrganismos, evidenciando o efeito de sinergia entre as enzimas fúngicas.

## REFERÊNCIAS

AFONSO, L. C. **Produção de celulasas por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.**



2012. 119p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n.3, p.501-521, 2008.

BANERJEE, G., SCOTT-CRAIG, J. S., WALTON, J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective. **Bioenergy Research**, v.3, n.1, p.82-92, 2010.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, n.2, p.287-296, 2007.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.15, n.3/4, p.583-620, 1997.

CANTWELL, B. A.; SHARP, P. M.; GORMLEY, E.; MCCONNELL, D. J. Molecular cloning of bacillus b-glucanases. In: Aubert, J. P., Beguin, P., Millet, J. (Ed.). **Biochemistry and genetics of cellulose degradation**. San Diego: Academic Press, p. 181-201, 1988.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Cellulase production in packed bed bioreactor by solid-state fermentation. **European Biomass Conference and Exhibition Proceedings**, p.1539-1546, 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, n.1, p.181-188, 2010.

FERREIRA, V. **Produção de  $\beta$ -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 132p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

GROUS, W. R.; CONVERSE, A. O.; GRETHLEIN, H. E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme and Microbial Technology**, v.8, n.5, p.274-280, 1986.

IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.17, n.2, p.79-83, 2004.

KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, v.20, n.1, p.103-110, 2004.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.124, n.1-3, p.1081-1099, 2005.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.

**Microbiology and molecular biology reviews**, v.66, n.3, p.506-577, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.68, p.61-138, 2000.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation**. Berlin: Springer-Verlag, 2006.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.89, n.3, p.246-291, 2005.

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

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D.; **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP)**. NREL, Golden, Co., USA, 2002.

SØRENSEN, H. R., PEDERSEN, S., JØRGENSEN, C. T., MEYER, A. S. Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant "minimal" enzyme cocktail

containing beta-xylosidase and novel endo-1, 4-beta-xylanase and alpha-l-arabinofuranosidase activities. **Biotechnololy Progress**, v.23, n.1, p.100-107, 2007.

SRIVASTAVA, K. K.; VERMA, P. K.; SRIVASTAVA, R. A recombinant cellulolytic *Escherichia coli*: Cloning of the cellulase gene and characterization of a bifunctional cellulase. **Biotechnology Letters**, v.21, n.4, p.293-297, 1999.

THOMPSON, D. N.; CHEN, H. C.; GRETHLEIN, H. E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology**, v.39, n.2, p.155-163, 1992.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.115, n.1/3, p.1115-1126, 2004.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, p.93-104, 2005.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, pelas bolsas MS processos 2013/01756-1 e 2013/06234-3 e DR processo 2011/07453-5.