

## ANÁLISE DO PERFIL DE ADSORÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE DIFERENTES BAGAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADOS COM SULFITO ÁCIDO

J. R. MONTE<sup>1</sup>, A. M. F. MILAGRES<sup>1</sup>, S. I. MUSSATTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), Universidade de São Paulo, Departamento de Biotecnologia, Lorena - SP

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB), Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga - Portugal  
E-mail para contato: joseanarocha@debiq.eel.usp.br

**RESUMO** – A produção de etanol de segunda geração é uma realidade brasileira que já vem sendo implementada na indústria. Porém, vários fatores que governam a sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos ainda necessitam ser melhor esclarecidos, de forma a baixar o custo e aumentar o rendimento final de monossacarídeos. A adsorção das enzimas durante a sacarificação da celulose é um fator determinante para uma hidrólise eficiente, que pode ser influenciada pelas características do substrato lignocelulósico, como conteúdo ou distribuição de hemicelulose e lignina. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de adsorção das enzimas envolvidas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito ácido em diferentes temperaturas. Os resultados revelaram que a adsorção varia com as características finais dos substratos gerados, como o teor de lignina remanescente e a quantidade de grupos sulfônicos.

### 1. INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido apontado como uma matéria-prima lignocelulósica de grande potencial para a produção de etanol de segunda geração, dentro do contexto de biorrefinaria, pelo fato desse material ser abundante e, principalmente, pela quantidade de produtos com alto valor agregado que pode ser gerada a partir de seu processamento.

Para que os materiais lignocelulósicos possam ser hidrolisados por enzimas, é essencial promover a desorganização da matriz lignocelulósica de forma a permitir um maior acesso das enzimas aos seus componentes. Para remover a hemicelulose e a lignina e aumentar a superfície de contato e a porosidade da parede celular, os materiais lignocelulósicos precisam ser submetidos a uma etapa de pré-tratamento que pode ser feita por métodos biológicos, mecânicos, químicos ou uma combinação destes.

O processo sulfito ácido tem sido considerado como um dos mais eficazes para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para a obtenção de etanol. Esta tecnologia foi patenteada e denominada SPORL (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of

lignocelulose). O tratamento SPORL baseia-se no uso de bissulfito de sódio (ou de cálcio, de magnésio, entre outros) variando a temperatura (160-190 °C), o pH (2-5) e o tempo (10-30 min) com subsequente refinamento dos materiais para gerar substratos fibrosos de tamanho reduzido (Wang et al., 2009, Zhu et al., 2009a).

A hidrólise enzimática da celulose ocorre pela ação coordenada das endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.4), as exo-1,4- $\beta$ -glucanases ou celobioidrolases (EC 3.2.1.91) e as 1,4- $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21). Na fase inicial de hidrólise, é necessário que as celulases adsorvam na superfície do material, o que resulta na baixa concentração de enzimas livres na fase líquida. Geralmente, quando a celulose já foi totalmente hidrolisada, as enzimas retornam ao meio. Entretanto, materiais lignocelulósicos ricos em celulose também contêm lignina, em cuja superfície também pode haver adsorção de enzimas. A presença de lignina reduz significativamente o desempenho da hidrólise enzimática e sua retirada e/ou modificação tende a favorecer a ação das enzimas hidrolíticas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de adsorção das enzimas envolvidas na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito ácido em diferentes temperaturas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Pré-tratamento com sulfito ácido

Para esse trabalho foram utilizadas amostras de bagaço de cana-de-açúcar obtidas de híbridos (H89, H146 e H166) e de uma variedade comercial de cana (VC). Vinte gramas dos respectivos bagaços, livres de sacarose, foram impregnados com solução de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a 5% (g de reagente/g seca de bagaço), em pH 2,1 (ajustado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sob vácuo por 15 min. Após a impregnação, os reatores foram mantidos a 130, 150 e 160 °C, em banho de silicone, por 2 h. Em seguida, os bagaços foram lavados, desfibrados e secos à temperatura ambiente. Os grupos sulfônicos foram determinados de acordo com Beatson (1992).

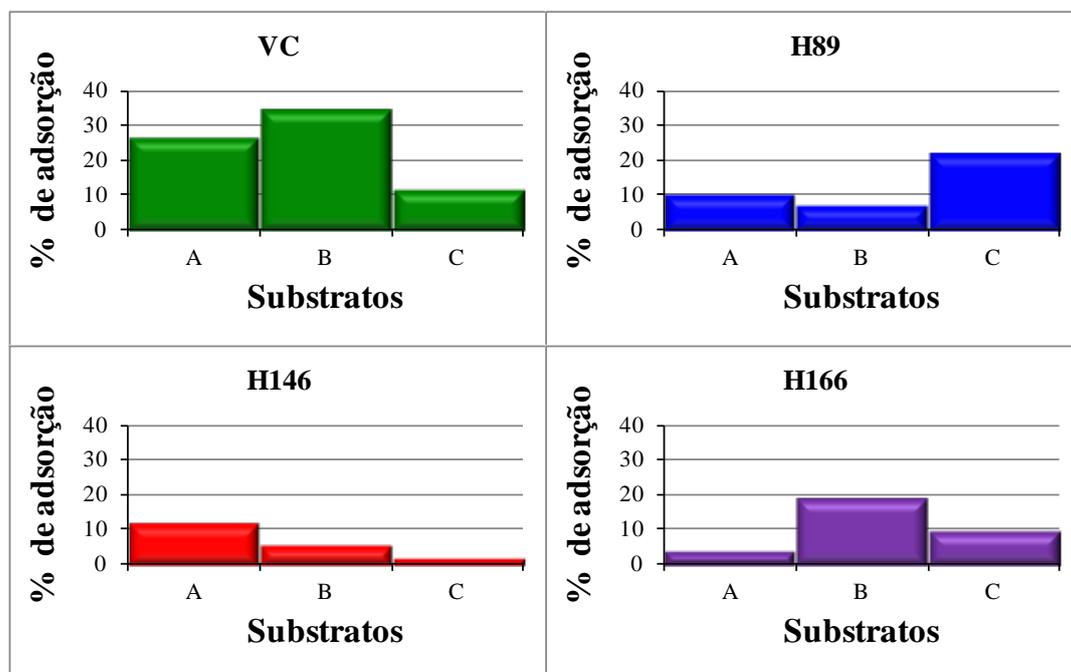
### 2.1. Adsorção enzimática

A análise de adsorção enzimática foi realizada de acordo a metodologia descrita por Zhu et al. (2009b). Em um volume total de 1 mL foram adicionados tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), 15 mg de Avicel ou 1,5 mg de bagaço de cana-de-açúcar e uma mistura das enzimas Cellubrix e Novozym, na proporção de 1:2. A concentração final de enzima utilizada foi de 0,7 mg/mL. As amostras foram mantidas a 4 °C por 10 min, sendo em seguida centrifugadas a 13000 g, por 5 min, e lavadas com 200  $\mu$ L de água destilada por 4 vezes sucessivas. Ao final, foram adicionados 100  $\mu$ L de água destilada e foi realizado o teste de ninidrina.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os perfis de adsorção enzimática da mistura Cellubrix/Novozym, na proporção 1:2, nas fibras dos diferentes bagaços pré-tratados com sulfito ácido nas temperaturas de 130, 150 e 160 °C. É possível observar que o perfil de adsorção foi diferente para as variedades de bagaço avaliadas. O aumento da temperatura proporcionou mudanças na

superfície das fibras que podem melhorar o desempenho das enzimas durante a hidrólise. Essas mudanças foram dependentes das características dos substratos empregados, como o teor de celulose, hemicelulose e lignina, assim como a drasticidade do pré-tratamento utilizado. Apesar da alta carga de enzima utilizada nesse ensaio (0,7 mg/mL), os dados mostram que a adsorção das enzimas nas fibras do bagaço ficou abaixo de 35 %.



**Figura 1 – Porcentagem de adsorção das enzimas presentes na mistura Cellubrix:Novozym (1:2) na superfície de diferentes bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito ácido, pH 2,13, em diferentes temperaturas. Bagaços pré-tratados a 130 °C (A); a 150 °C (B) e a 160 °C (C).**

**Tabela 1 – Relação entre a quantidade de enzima adsorvida na fibra, suas características químicas e conversão enzimática da celulose.**

Amostras	T (°C)	Adsorção (mg/mL)	Remoção de lignina (%)	<sup>1</sup> GS (mmol/kg de lignina)	<sup>2</sup> CEC (%)
VC	130	0,177±0,015	24,09	201,07±6,13	23,84
	150	0,234±0,018	24,75	68,26±17,02	40,29
	160	0,077±0,005	37,54	92,94±0,01	59,67
H89	130	0,069±0,017	6,84	139,85±29,88	31,50
	150	0,048±0,003	34,42	44,29±0,01	49,60
	160	0,148±0,007	31,94	136,60±10,50	55,64
H146	130	0,078±0,005	10,46	69,46±7,78	30,40
	150	0,035±0,004	10,74	90,41±10,03	32,31
	160	0,014±0,001	28,56	106,70±0,16	72,30
H166	130	0,025±0,002	0,00	103,67±27,82	28,17
	150	0,125±0,011	16,83	73,63±0,00	62,29
	160	0,063±0,006	24,09	83,00±0,02	48,74

<sup>1</sup>GS – grau de sulfonação; <sup>2</sup>CEC – Conversão Enzimática da Celulose

Pela Tabela 1, pôde-se notar que o aumento da temperatura do pré-tratamento resultou na diminuição do conteúdo de lignina na fibra do substrato gerado. Esse resultado era esperado, uma vez que elevação da temperatura a torna mais solúvel. Já para o grau de sulfonação da lignina residual, não se pôde estabelecer um padrão. Para o H146, o maior conteúdo de grupos sulfônicos foi detectado a 160 °C e, para as demais variedades estudadas, isso ocorreu a 130 °C e pode estar relacionado a diferenças na distribuição da lignina na superfície do bagaço.

Correlacionando os valores de adsorção com a CEC, podemos observar que para VC e H146, os maiores valores de conversão se dão quando há um menor valor de adsorção. Porém, para as outras variedades testadas, H89 e h166, verifica-se o contrário. Isso mostra que a adsorção irreversível das enzimas envolvidas na sacarificação da celulose pode influenciar diretamente a conversão, porém não é um fator decisivo. Existem outras características que também podem ser relevantes, como a estrutura e acessibilidade da celulose e mudanças nas características do substrato durante a hidrólise (Pribowo et al., 2012).

O aumento da temperatura de pré-tratamento do bagaço H146 promoveu a sulfonação e a remoção da lignina, ao passo que diminuiu a adsorção enzimática. Esses fatores associados favoreceram o aumento da hidrólise da celulose, que atingiu 72,3 %, na carga mais baixa de enzima (5:10, Cellubrix:Novozym).

#### 4. CONCLUSÃO

As variedades de bagaço estudadas apresentaram diferenças nos perfis de adsorção enzimática, as quais estão relacionadas com as características dos substratos após o pré-tratamento, ficando abaixo de 35 %, mesmo com uma alta concentração de enzima.

#### 5. REFERÊNCIAS

BEATSON, R. P. Determination of sulfonate groups and total sulfur. In: LIN S.Y and DENCE C.W (eds). *Methods in lignin chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 473-483, 1992.

PRIBOWO, A.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N. The adsorption and enzyme activity profiles of specific *Trichoderma reesei* cellulase/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover. *Enzyme Microb. Tech.*, 50, 195-203, 2012.

WANG, G.S.; PAN, X.J.; ZHU, J.Y.; GLEISNER, R.L. 2008. Sulfite pretreatment for biorefining biomass. US Patent Application. Filed by Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF) 61/047024. Provisional application 4/22/2008. Utility Conversion 4/17/2009.

ZHU, J.Y.; PAN, X.J.; WANG, G.S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technol.*, 100, 2411-2418, 2009. (a)

ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y., -H, P. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. *Analyst*, 134, 2267-2272, 2009. (b)