



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

REUSO DA ENZIMA CELULASE DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FIBRA DE CAJU

ARAÚJO, L.G.S.¹; MATIAS, G.A.B.¹; ROCHA, M.V.P.¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: guedeslayanne@gmail.com; valderez.rocha@ufc.br;
gabmatias2@gmail.com

RESUMO – *O reuso da enzima celulase é uma estratégia potencial para reduzir o custo da etapa de hidrólise enzimática durante a bioconversão de produtos lignocelulósicos para diferentes produtos. Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar o reuso da celulase durante a hidrólise enzimática da fibra de caju pré-tratada com ácido (FC-H), ácido seguido de álcali (FC-HOH) e peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA). Diferentes concentrações do resíduo hidrolisado (FC-HE) foram avaliadas no reuso enzimático, e observou-se que, utilizando alta quantidade de FC-HE, foi obtida maior concentração de glicose. Os resultados mostraram que a adsorção da celulase na fibra de caju a partir do resíduo hidrolisado foi um meio potencial de recuperação das celulases, além disso foi observado que a fibra pré-tratada com FC-HOH apresentou os melhores resultados, com 87,3% de recuperação da carga enzimática inicial e um rendimento igual a 32% ± 1 %.*

1. INTRODUÇÃO

A fibra de caju é considerada um material lignocelulósico de elevado potencial, cujo aproveitamento permite a obtenção de produtos de alto valor agregado, alimentos e biocombustíveis (Correia *et al.*, 2013). Para produção de etanol ou outros bioprodutos é necessária a transformação da celulose e hemicelulose em seus monômeros, glicose e xilose, respectivamente, e em seguida sua conversão no produto de interesse. O processo de bioconversão consiste em várias etapas: pré-tratamento, que aumenta a acessibilidade da enzima aos materiais lignocelulósicos, seguida por hidrólise dos polissacarídeos e oligossacarídeos e a conversão dos monossacarídeos para bioprodutos de interesse por via microbiana ou enzimática (Barros *et al.*, 2017). No entanto, ainda há um entrave para comercialização desses bioprodutos, devido aos custos gerados pelas enzimas celulásicas (pihlajaniemi *et al.*, 2014).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o reuso da celulase durante a hidrólise enzimática da fibra de caju, visando encontrar uma possível solução para reduzir os altos custos gerados na aquisição destes biocatalisadores. Para verificar como a composição do material pode influenciar na reutilização do complexo celulolítico e no rendimento de hidrólise, a fibra de caju foi submetida a três tipos de pré-tratamento: ácido diluído (FC-H), ácido seguido de álcali (FC-HOH) e peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Matéria – prima e pré-tratamentos:

A fibra de caju utilizada neste estudo foi doada pela indústria de sucos Jandaia, no Ceará, Brasil. O FC *in natura* foi lavado, seco a 60 °C por 24 horas, moído e foram selecionadas partículas com tamanho entre 0,25-0,84 mm. O pré-tratamento ácido foi realizado segundo a



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

metodologia (Rocha *et al.*, 2009), o FC *in natura* foi pré-tratada com H_2SO_4 0,6 M a 121 °C durante 15 min utilizando 30% m/v. Foram feitas lavagens com água até atingir pH igual a 7. O material foi nomeado FC-H. Para o pré-tratamento ácido seguido de álcali, foi utilizado a FC-H após o processo de lavagem, e foi submetido a um segundo pré-tratamento com NaOH 1M a 121 °C durante 30 min, utilizando uma proporção mássica de 30% m/v. Foram selecionadas partículas com tamanho entre 0,25-0,84 mm o material foi nomeado como FC-HOH. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio foi realizado segundo a metodologia descrita por Correia *et al.* (2013), que consistiu da imersão da fibra de caju em solução de H_2O_2 na concentração de 4,3% v/v a pH 11,5 ajustado usando NaOH. Foi conduzido em agitador orbital a 35 °C, 250 rpm por 6 horas, em frasco Erlenmeyer e uma porcentagem de sólidos de 5% m/v. O sólido foi recuperado por filtração a vácuo. Ao término de todos os pré-tratamentos utilizados, o resíduo foi lavado com água destilada até atingir um pH = 7,0; foi seco a 50 °C por 24 h, as partículas foram selecionadas com tamanho entre 0,25-0,84 mm.

2.2 Cinética e isoterma de adsorção da enzima celulase

A cinética de adsorção da celulase (*Trichoderma reesei* ATCC 26921) foi realizada utilizando a fibra de caju (FC) submetida aos diferentes pré-tratamentos (FC- H; FC-HOH e FC-PHA). O material foi adicionado a 100 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH=4,8), a uma concentração de substrato de 1% m/v (baseado no teor de celulose) e carga enzimática de 15 FPU/g_{celulose}. Os experimentos foram conduzidos a 45 °C e 150 rpm, foram retiradas amostras de 1 mL e foi analisada as concentrações de proteínas.

Para realização da isoterma de adsorção da celulase utilizou-se a fibra de caju pré-tratada por diferentes métodos (FC- H; FC-HOH e FC-PHA), variando-se a quantidade de proteína do extrato enzimático (0,01 a 1,00 mg/mL). O processo de adsorção foi conduzido em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) a 45 °C, usando uma concentração da fibra pré-tratada de 1% m/v (com base no conteúdo de celulose) até atingir o equilíbrio. Amostras foram coletadas para a determinação do teor de proteína.

2.2. Hidrólise enzimática: reuso

A hidrólise enzimática da fibra pré-tratada (FC- H; FC-HOH e FC-PHA) foi realizada segundo a metodologia de Rodrigues *et al.*, (2011) nas seguintes condições: 1% m/v de celulose em tampão citrato 50 mM a pH 5,0 com uma carga enzimática de 15 FPU/g_{celulose}, conduzida em agitador orbital (Tecnal - TE 422) a 45 °C, 150 rpm por 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. No final da hidrólise enzimática, os resíduos hidrolisados foram separados por filtração e foi executado dois ciclos sucessivos de hidrólise, utilizando diferentes percentuais de resíduos hidrolisados (30, 50, 80 e 100% m/m) e substratos frescos, para completar a concentração de sólidos. O processo foi conduzido a 45 °C, 150 rpm por 72 h, sem suplementação enzimática. A concentração de carboidratos foi quantificada por HPLC utilizando uma coluna HPX-87H, usando como eluente 5 mmol.L⁻¹ H_2SO_4 a um fluxo volumétrico de 0,5 mL/min sob uma temperatura de 65 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 pode ser observado os resultados obtidos a partir do estudo isotérmico da enzima celulase.

O substrato pré-tratado com o ácido diluído (FC-H) teve uma rápida adsorção nos primeiros 40 minutos, e atingiu o equilíbrio após 120 minutos (Fig. 1A). No entanto, a adsorção da enzima em FC-PHA e FC-HOH, resultou em tempos de equilíbrio iguais a 360 e 480 minutos, respectivamente.

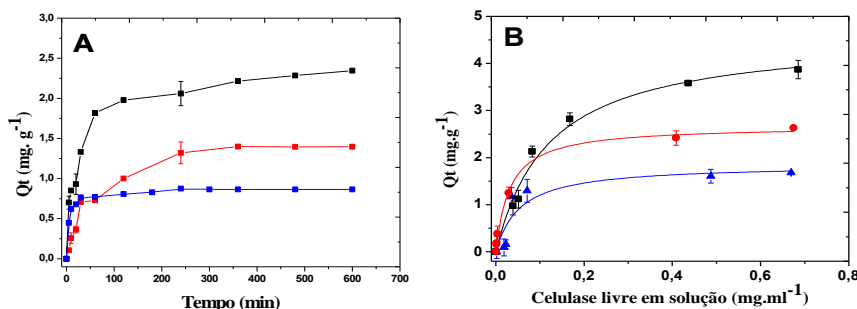


Figura 1 – Estudo isotérmico do complexo enzimático celulase submetido a diferentes pré-tratamentos e concentração de 1% m/v (com base no conteúdo de celulose). Condições: 45 °C e 150 rpm. (■) FC-HOH; (●) FC-PHA; (▲) FC-H. A) Cinética de adsorção; B) Isotherma de adsorção.

A fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos continha diferentes teores de lignina (62,2% para a FC-H; 11,0% para a FC-HOH e 2,9 % para a FC-PHA); logo, diferentes características de adsorção e dessorção seria esperado durante a hidrólise. Então, por a fibra de caju pré-tratada com ácido apresentar um maior teor de lignina, adsorveu-se mais rápido a celulase a este material, porém a quantidade de celulase adsorvida por grama de material (Q_t) é menor, por ser necessário uma quantidade maior de material FC-H para obter o teor de celulose necessário para realizar os tratamentos na mesma concentração de celulose. Na Figura 1B pode ser observado a isoterma de adsorção da enzima celulase, e verificou-se o ajuste do modelo de Langmuir aos dados experimentais, com os valores dos parâmetros mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros do modelo de Langmuir para as isotermas de adsorção da celulase nos substratos lignocelulósicos avaliados.

Substrato	E_{max} (mg/g)	K_p (mL/mg)	R^2
FC-HOH	4,67	8,15	0,9834
FC-PHA	2,67	31,82	0,9966
FC-H	1,86	18,58	0,8541

Os valores dos coeficientes de correlação resultantes do ajuste da isoterma de Langmuir indicam a qualidade do ajuste do modelo matemático aos dados experimentais. Os parâmetros encontrados (ver Tabela 1) são úteis para investigar a interação entre enzimas e substratos. Para o substrato tratado com o ácido (FC-H) a constante de Langmuir foi maior ($K_p = 18,58$ mL/mg), do que para FC-HOH, com um valor de $K_p = 8,15$ mL/mg, o que aponta uma maior afinidade da celulase pelo substrato FC-H do que ao substrato FC-HOH. Esse fato pode ser justificado pela diferença no teor de lignina nos dois substratos. Sabe-se que a lignina não pode ser hidrolisada, no entanto, ela pode adsorver a celulase de forma não produtiva por meio da ligação de hidrogênio ou interação hidrofóbica com os grupos hidrofóbicos nos domínios de ligação da celulose (Qi *et al.*, 2011). O valor de E_{max} encontrado para o substrato FC-H foi de 1,86 mg/g, para o FC-PHA foi de 2,67 mg/g e para o FC-HOH foi igual a 4,67 mg/g, que são os valores máximos que podem ser adsorvidos por cada substrato lignocelulósico.

Na Figura 2 pode ser observado os rendimentos de hidrólise, que foram obtidos a partir da reutilização dos resíduos hidrolisados (FC-HOH; FC-PHA e FC-H) em contato com o substrato fresco adicionado a reação de hidrólise. Os resultados apresentados na Figura 2, mostram que quanto maior o percentual do resíduo da hidrólise anterior for utilizado na hidrólise subsequente, mais altos são os rendimentos de hidrólise.

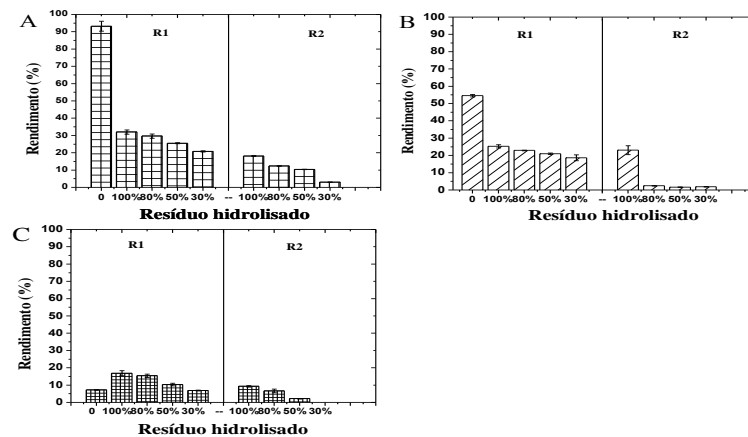


Figura 2 - Reuso da celulase adsorvida ao resíduo hidrolisado utilizando fibra de caju submetida a diferentes pré-tratamentos. Condições: 45 °C, 150 rpm por 72 horas. (A) FC-HOH; (B) FC-PHA; (C) FC-H.

No primeiro reuso, utilizando 100% do resíduo FC-HOH contato com o substrato fresco, foi obtido $32,06\% \pm 1,22\%$ de rendimento, tendo uma recuperação de 87,33% da enzima adicionada inicialmente no processo (15 FPU/g_{celulose}); para 80% do resíduo hidrolisado, o rendimento foi de $29,73\% \pm 1,24$; usando 50%, o rendimento foi igual a $25,58\% \pm 0,31\%$, e com apenas 30% de substrato fresco, o resultado obtido foi de $20,81\% \pm 0,35\%$. Pelos valores apresentados é notório que quanto maior a quantidade do resíduo hidrolisado, mais enzimas estão sendo adicionadas na suspensão da próxima hidrólise, implicando num maior rendimento de hidrólise enzimática. Além disso, é constatado que as enzimas celulásicas permanecem ativas para o reuso de hidrólise, porém ocorre uma diminuição no rendimento e na recuperação enzimática ao longo dos ciclos de reuso, o que pode ser atribuído ao acúmulo de lignina no processo, dificultando o contato da enzima com a celulase, ou inibição pelos produtos gerados durante a reação, como celobiose. Além disso, a enzima também pode ter se desnaturado devido aos ciclos sucessivos de hidrólise. Comportamentos semelhantes foram encontrados por QI *et al.* (2011) e TU *et al.* (2007). Contudo, ainda assim reduz a necessidade de adição de enzima fresca durante os processos de bioconversão.

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que foi possível reutilizar a celulase durante a hidrólise da fibra de caju. Os melhores resultados obtidos foram com o substrato FC-HOH. Contudo, ainda há necessidade de estudos que consigam melhorar a recuperação e o rendimento ao longo dos ciclos de hidrólise.

5. REFERÊNCIAS

- BARROS, E. M. *et al.* Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production. **Chemical Engineering Journal**, 2017. v. 307, p. 939–947.
- CORREIA, J. A. Da C. *et al.* Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Bioresource Technology**, 2013. v. 139, p. 249–256.
- PIHLAJANIEMI, V. *et al.* Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw: Comparison of solids-recycling, sequential hydrolysis and batch hydrolysis. **bioresource technology**, 2014. v. 153, p. 15–22.
- QI, B. *et al.* Bioresource Technology Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. 2011. v. 102, p. 2881–2889.
- TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the Distribution of Cellulases and the Recycling of Free Cellulases during the Hydrolysis of Lignocellulosic Substrates. 2007. p. 398–406.