

# Imobilização de extrato celulolítico produzido por *Aspergillus niger* e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Viviane C. B. Brasil<sup>1</sup>, Thais D. Mendes<sup>2</sup>; Silviane Z. Hubinger<sup>3</sup>; Cristiane Farinas<sup>3</sup>; Mônica T. C. Damaso<sup>2</sup>, Dasciana S. R. Gambetta<sup>2</sup>

## Introdução

Materiais lignocelulósicos podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis para a obtenção de etanol e outros bioprodutos. A desconstrução desses materiais envolve duas etapas: pré-tratamento e posterior conversão de polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. A despolimerização da celulose em glicose pode ser catalisada pela atuação sinérgica de três tipos de enzimas: endo- $\beta$ -1,4-glicanase (E.C. 3.1.2.4), exoglicanase (E.C. 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (E.C. 3.2.1.21) (MARGEOT et al., 2009). Embora a conversão enzimática de celulose esteja se tornando viável, técnica e economicamente, o aperfeiçoamento deste processo, como por exemplo, pelo emprego de um biocatalisador imobilizado, pode levar a redução de custos (TISCHER; WEDEKING, 1999). O objetivo deste trabalho foi caracterizar o extrato celulolítico produzido por *Aspergillus niger* quanto às atividades em diferentes substratos celulósicos e avaliar seu desempenho, nas formas livres e imobilizadas, na hidrólise bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

## Métodos

**Concentração e caracterização do extrato:** O extrato celulolítico produzido por *A. niger* 3T5B8 foi concentrado em membrana Vivaspin® (GE Life Sciences) de 10 kDa. O extrato, antes e após concentração, foi caracterizado quanto ao teor de proteínas solúveis (Bradford – Biorad) e atividades enzimáticas ( $\beta$ -glicosidase, endoglicanase, exoglicanase e FPase). As atividades foram determinadas por ensaios miniaturizados adaptados de protocolos previamente descritos (GHOSE, 1987; XIAO et al., 2004).

**Imobilização do extrato:** O extrato foi imobilizado por entrecruzamento, em meio reacional pH 8, empregando iso-propanol como agente precipitante e glutaraldeído como agente interligante. O derivado imobilizado foi recuperado por centrifugação, lavado e ressuspensionado em solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M, pH 5.

1 1 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, 70770-901

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, 70770-901;

3 Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, São Carlos/SP, 13506-970.

\*viviane.brasil@colaborador.embrapa.br; dasciana.rodrigues@embrapa.br

**Hidrólise enzimática de biomassa:** O desempenho do extrato enzimático como catalisador, em sua forma livre e imobilizada, foi avaliado na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ( $H_2SO_4$  1,5% (v/v), 53 min a 120°C). Os ensaios de hidrólise foram realizados em tampão citrato de sódio/ácido cítrico, 0,1 M, pH 5, empregando concentração de 2% de sólido (m/v), 1,5 mL de catalisador (enzima livre ou suspensão do derivado imobilizado), em volume final de 5 mL. Os experimentos foram conduzidos, em triplicata, em reatores encamisados e agitação magnética, a 50°C, por período de 24 horas. Periodicamente, alíquotas foram retiradas e o teor de glicose quantificado por método colorimétrico (Glicose Monoreagente – Bioclin). Os resultados apresentados referem-se à média da triplicata dos ensaios.

## Resultados e Conclusões

O extrato celulolítico produzido por *A. niger* apresentou os seguintes teores de proteína e valores de atividades, antes e depois da concentração, respectivamente:

- (i) proteínas solúveis: 0,73 e 7,02 mg/mL;
- (ii)  $\beta$ -glicosidase: 0,24 e 1,46  $\mu$ mol/min.mL;
- (iii) endoglicanase: 0,43 e 1,23  $\mu$ mol/min.mL;
- (iv) exoglicanase: 0,13 e 1,11  $\mu$ mol/min.mL; e
- (iv) FPase: 0,24 e 1,46  $\mu$ mol/min.mL.

Observou-se que os teores de proteínas solúveis e atividades enzimáticas apresentadas pelo extrato celulolítico antes da concentração são baixos, sendo necessária uma etapa de concentração para que seja viável empregar métodos de imobilização e avaliar o desempenho do extrato na hidrólise de biomassa pré-tratada. Porém, métodos de concentração de enzimas, em geral, resultam em perda de atividade. Comparando-se o teor de proteína nos extratos antes e após a concentração, o fator de concentração foi cerca de 10 vezes. Esse fator também foi observado para a atividade de exoglicanase. Para as demais atividades, o fator de concentração foi menor, cerca de 6 vezes para FPase e 3 vezes para endoglicanase e  $\beta$ -glicosidase.

Os resultados indicam que as enzimas endoglicanase e  $\beta$ -glicosidase são mais sensíveis ao processo empregado para a concentração. O método empregado para a imobilização do extrato celulolítico foi eficaz. O extrato, tanto em sua forma livre, como imobilizado, foi capaz de atuar como catalisador na hidrólise de biomassa pré-tratada. Após 24 h de hidrólise, foi possível obter um hidrolisado contendo 8,6 g/L de glicose, quando empregada a forma livre e 2,7 g/L, quando empregada a forma imobilizada. O menor rendimento obtido pelo emprego da forma imobilizada é resultante do menor poder catalítico do derivado, já que, no método empregado, parte da proteína é utilizada como suporte. Ajustes no método de imobilização e no processo de hidrólise serão avaliados para que a aplicação do derivado imobilizado resulte em um maior rendimento de glicose.

Pode-se concluir que o extrato celulolítico produzido por *A. niger* pode ser imobilizado por entrecruzamento e pôde ser aplicado na hidrólise de biomassa, tanto em sua forma livre como imobilizada.

## Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado por recurso SEG (Projeto ETANOL2G).

## Referências

- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxon, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.
- TISCHER, W.; WEDEKING, F. Immobilized enzymes: methods and applications. **Topics in Current Chemistry**, Berlin, v. 200, p. 95-126, 1999.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-base filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.