



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Comparação do Desempenho de Diferentes Complexos Celulásicos na Hidrólise em Alta Consistência do Bagaço de Cana Explodido a Vapor

Silvio Sandro Henich<sup>1</sup>, Luana Marcele Chiarello<sup>1</sup>, Luiz Pereira Ramos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ), Departamento de Química, UFPR

<sup>2</sup> INCT de Energia e Ambiente (INCT E&A) – luiz.ramos@ufpr.br

#### RESUMO

*Este trabalho teve por objetivo determinar a carga mínima de enzima que seria necessária para hidrolisar de 70% das glucanas presentes em amostra de bagaço explodido a vapor após 72 h de reação, empregando um teor inicial de 20% (m/v) de sólidos totais. Para isto foram empregadas preparações enzimáticas de diferentes gerações, que foram fornecidas pela Novozymes: Cellic<sup>®</sup> CTec1, Cellic CTec2, Cellic CTec3 e uma mistura Celluclast<sup>®</sup> 1,5L/Novozym<sup>®</sup> 188 (C/N). As cargas encontradas neste ponto de equivalência foram de 22,4%, 11,6%, 6,8% e 4,1%, obtendo-se com isto conversões de 69,4%, 69,5%, 71,8% e 72,7%, respectivamente. A hidrólise com Cellic CTec3 exigiu cargas 2,8 e 1,6 vezes menores do que os seus precursores, respectivamente e esta diferença foi ainda mais acentuada quando comparada à mistura C/N, cuja hidrólise exigiu uma carga aproximadamente 5 vezes superior.*

Palavras-chave: bagaço de cana, etanol celulósico, hidrólise enzimática, Cellic<sup>®</sup> CTec.

#### INTRODUÇÃO

O processo de produção do etanol de segunda geração compreende quatro etapas principais: o pré-tratamento do material lignocelulósico, com o objetivo de desestruturá-lo para tornar a celulose mais acessível ao ataque enzimático; a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa a açúcares fermentescíveis; a fermentação alcoólica; e, por fim, a recuperação do produto geralmente via destilação. A hidrólise enzimática pode agregar alto custo ao processo pelo alto valor comercial das enzimas. De modo a reduzir os custos referentes a esta etapa, procura-se diminuir a quantidade de água consumida e aumentar a concentração de açúcares obtidos na fração hidrolisada através do aumento do teor de sólidos totais, além de reduzir a carga de enzimas utilizada para atingir um objetivo definido (Ramos *et al.*, 2015). A hidrólise enzimática da celulose é uma reação heterogênea conduzida por um complexo enzimático que compreende três classes de hidrolases: as endo- $\beta$ -(1,4)-glucanases, as exo- $\beta$ -(1,4)-glucanases e as  $\beta$ -(1,4)-glucosidases, cuja sinergia é essencial para que todo o carboidrato disponível seja hidrolisado. As endoglucanases agem quebrando as ligações  $\beta$ -glicosídicas do tipo (1,4) da cadeia de celulose. As exoglucanases removem unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora e, por fim, as  $\beta$ -glucosidases convertem a celobiose e outros oligossacarídeos de baixa massa molar, formados pela sinergia entre endoglucanases e exoglucanases, em moléculas de glucose (Silveira *et al.*, 2014).

O complexo Celluclast<sup>®</sup> 1.5L da empresa Novozymes (Bagsværd, Dinamarca), rico em endo-glucanases e exo-glucanases, tem sido amplamente utilizado para a hidrólise



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

enzimática de substratos pré-tratados juntamente a outro complexo chamado Novozym<sup>®</sup> 188, rico em  $\beta$ -glucosidases, que evita a inibição das endo e exo pelo acúmulo de celobiose no meio reacional. Os complexos Cellic<sup>®</sup> CTec, também desenvolvidos pela Novozymes, já apresentam em sua composição alta atividade  $\beta$ -glucosidásica, além de outras enzimas auxiliares (Gusakov, 2011). O complexo celulásico Cellic CTec3 é considerado o mais desenvolvido desta linha, apresentando uma eficiência 1,5 vezes maior na conversão de materiais lignocelulósicos do que seu antecessor, Cellic CTec2. Estas evoluções vêm de encontro à necessidade de melhoramentos que o setor industrial busca para viabilizar a produção de etanol celulósico (Novozymes, 2012).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos apresenta um perfil cinético caracterizado por uma curva logarítmica com três fases distintas. A primeira apresenta uma alta taxa de conversão, que está relacionada à adsorção das celulasas na fração do substrato que esteja prontamente disponível, mantendo alta a conversão em um período de aproximadamente 24 h. Na segunda fase, 50% a 70% do substrato já foi hidrolisado, mas com uma taxa intermediária entre o período de 24 h e 72 h. Por fim, a última fase é caracterizada por apresentar uma taxa de conversão relativamente baixa e constante, que leva lentamente à conversão completa do substrato em algo como 96 h de reação (Arantes e Saddler, 2011). Como a última etapa do processo é lenta, o critério mínimo para um bom resultado seria o da produção de um hidrolisado em um tempo compatível com a realidade industrial, cuja concentração em açúcares possa viabilizar o processo fermentativo, principalmente no que tange à recuperação final do etanol por destilação. Isto levaria à possibilidade de tolerar conversões parciais em reações conduzidas em alto teor de sólidos totais, o que foi considerado neste estudo ao optar pela hidrólise de 70% das glucanas presentes no substrato após 72 h de reação, empregando um teor inicial de 20% (m/v) de sólidos totais. Sendo assim, esta pesquisa teve por objetivo determinar a carga mínima necessária de cada complexo enzimático para atingir este objetivo, utilizando como substrato amostras de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.

### MATERIAL E MÉTODOS

O pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor foi realizado na ausência de catalisador exógeno a 195 °C por 7,5 min, conforme condições previamente otimizadas (Pitarelo *et al.*, 2016). Este material continha 58,9 % de glucanas, 0,9% de hemiceluloses e 32,1% de lignina total em sua composição química. Os complexos enzimáticos utilizados foram a mistura entre Celluclast 1.5L e Novozym 188 (mistura C/N) na proporção de 1:0,3 (Breuil *et al.*, 1992), Cellic CTec1, Cellic CTec2 e Cellic CTec3. Foram empregadas quatro cargas enzimáticas diferentes para cada complexo enzimático que, no caso da Cellic CTec3, foram de 1,5%, 3%, 6% e 12% (m/m) de preparado em relação ao substrato seco, conforme a recomendação do fabricante. Supondo que o salto tecnológico no desempenho de cada produto da família Cellic CTec tenha sido de 1,5 vezes (Novozymes, 2012), as cargas dos demais complexos foram determinadas em relação a estes valores. Já as cargas utilizadas para a mistura C/N foram equivalente àquelas empregadas para a Cellic CTec1, que corresponde ao componente de menor desenvolvimento tecnológico dentre os membros desta família.

As hidrólises foram realizadas a 20% de sólidos totais em Erlenmeyers de 250 mL, empregando tampão ácido acético/acetato de sódio 50 mmol/L em pH 4,8 para Celluclast/Novozym, Cellic CTec1 e Cellic CTec2 e em pH 5,2 para Cellic CTec3, a 50 °C e

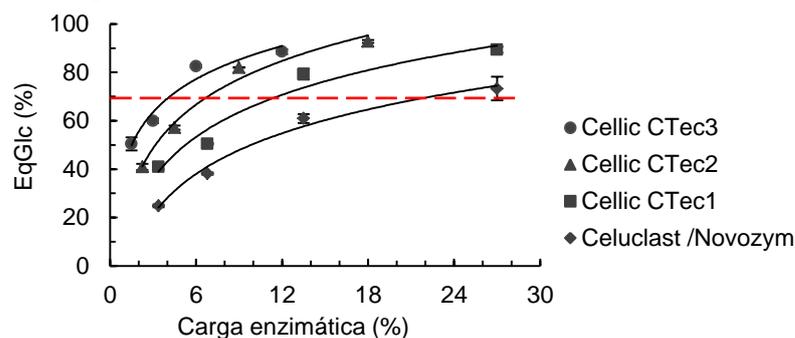


## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

150 rpm por 72 h. Foram coletadas alíquotas nos tempos de 0, 12, 24, 48 e 72 h para quantificação de glucose e celobiose, que foram posteriormente analisadas por cromatografia a líquido de alta eficiência utilizando Hi-Plex-H (Agilent) a 65 °C, com fase móvel  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mmol  $\text{L}^{-1}$  e vazão de 0,6 mL  $\text{min}^{-1}$ . As conversões foram dadas em termos de equivalentes de glucose ( $\text{EqGlc} = \text{glucose} + \text{celobiose} * 1.0526$ ) e a quantificação foi efetuada por padronização externa com curvas de calibração entre 0.25 e 5 g  $\text{L}^{-1}$  para cada componente.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Depois de realizadas as hidrólises enzimáticas aplicando quatro cargas diferentes para cada um dos complexos enzimáticos empregados neste estudo, foi construído um gráfico de dose-resposta (**Figura 1**) para o tempo de 72 h de reação, de modo a encontrar a carga mínima necessária para converter 70% das glucanas do bagaço em açúcares fermentescíveis. De todos os desempenhos de hidrólise, a mistura C/N foi a menos eficiente, apresentando conversões de 25% para a carga enzimática de 3,38%, 38% para a carga de 6,75%, 60% para a carga de 13,5% e 73% para a carga de 27%. Já a Cellic CTec1 produziu 41%, 50%, 79% e 89% utilizando estas mesmas cargas, respectivamente, o que representa conversões 10% a 20% maiores do que a mistura C/N. As conversões obtidas por Cellic CTec2 foram de 41% para a carga de 2,25%, 57% para carga de 4,5%, 82% para a carga de 9% e 93% para a carga de 18%, ou seja, rendimentos próximos aos da Cellic CTec1 com o emprego de uma menor quantidade de enzima em todos os experimentos. Finalmente, a Cellic CTec3 se destacou por apresentar as maiores conversões nas menores cargas enzimáticas, que foram de 50%, 60%, 82% e 89% para as cargas de 1,5%, 3%, 6%, e 12%, respectivamente. Mais uma vez, estas conversões foram próximas às obtidas com as outras enzimas, o que significa que o fator de evolução de 1,5 é válido para demonstrar o aumento do desempenho de enzimas obtidas a partir de uma base tecnológica mais evoluída.



**Figura 1.** Comparação entre os quatro complexos enzimáticos estudados, demonstrando a relação dose-resposta no tempo de 72 h de hidrólise de bagaço de cana explodido a vapor.

Posteriormente, as cargas calculadas a partir da **Figura 1** foram aplicadas em novos experimentos de hidrólise em triplicata para a validação dos resultados obtidos até então e as conversões alcançadas encontram-se registradas na **Tabela 1**. Apesar das considerações feitas sobre a eventual equivalência entre o desempenho catalítico das enzimas C/N e Cellic CTec1, os resultados demonstram que Cellic CTec1 apresentou uma eficiência aproximadamente 2 vezes maior que a do seu antecessor, requerendo, portanto, a metade da carga enzimática requerida da mistura C/N para atingir a meta estabelecida como referência neste trabalho. A



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Cellic CTec3 exigiu a menor quantidade de enzima para este mesmo fim, indicando a sua eficiência para a condução da hidrólise de substratos complexos sob alto teor de sólidos totais.

**Tabela 1.** Cargas mínimas necessárias para se obter 70% de conversão da celulose em 72 h de hidrólise com 20% de consistência, para todos os complexos.

Preparação enzimática	Carga necessária (%)	Conversão (%)
Celluclast 1.5 L/Novozym 188	22,4	69,4 ± 1,13
Cellic CTec1	11,6	69,5 ± 0,45
Cellic CTec 2	6,8	71,8 ± 2,76
Cellic CTec 3	4,1	72,7 ± 3,49

### CONCLUSÃO

A etapa de hidrólise enzimática encarece significativamente a produção de etanol celulósico e, portanto, devem ser estudadas formas de reduzir os seus custos operacionais. Neste trabalho, foi determinada a menor carga enzimática necessária para conversão de 70% das glucanas do substrato em 72 h de reação, utilizando complexos celulásicos de diferentes gerações. Enzimas de última geração, como a Cellic CTec3, apresentaram desempenho muito superior ao de suas precursoras, o que foi caracterizado pela possibilidade de redução da carga enzimática requerida sem comprometer as metas estabelecidas como referência e tais reduções refletem o avanço tecnológico que a área enzimática tem alcançado nos últimos anos. Além disto, as hidrólises em alta consistência realizadas neste trabalho chegaram a concentrações de equivalentes de glucose de 8,6% (m/v) para Cellic CTec1 e a mistura C/N, de 8,9% (m/v) para Cellic CTec2 e 9,0% (m/v) para Cellic CTec3. Sabe-se que a energia necessária para a destilação é diminuída se o produto da fermentação possuir mais de 4% (m/v) de etanol e este valor pode ser atingido a partir de hidrólises que rendam em torno de 8% (m/v) de açúcares fermentescíveis. Portanto, os resultados até então obtidos contribuem à identificação dos principais parâmetros de processo que possam convergir a uma redução do custo operacional da produção de etanol celulósico.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arantes V, Saddler, JN. 2011. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnol Biofuels* 4:3.
- Breuil C, Chan M, Gilbert M, Saddler JN. 1992. Influence of  $\beta$ -glucosidase on the filter paper activity and hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Bioresour Technol* 39:139-142.
- Gusakov AV. 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol* 29:419-425.
- Novozymes. 2012. Application sheet. Secure your plant's lowest total cost 1-5 [Online]. Disponível em: [http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/Cellic-HTec3/Documents/CE\\_APP\\_Cellic\\_Ctec3.pdf](http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/Cellic-HTec3/Documents/CE_APP_Cellic_Ctec3.pdf). Acesso em 05 de abril de 2016.
- Pitarelo AP, Fonseca SF, Chiarello LM, Gírio FM, Ramos LP. 2016. Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric acid-catalyzed steam explosion. *J Braz Chem Soc*. doi: 10.5935/0103-5053.20160075.
- Ramos LP, Silva L, Ballem, AC, Pitarelo AP, Chiarello, LM, Silveira MHL. 2015. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour Technol* 175:195-202.
- Silveira MHL, Siika-Aho M, Krungs K, Garriga LM, Ramos LP. 2014. The Essential Role of Plant Cell Wall Degrading Enzymes in the Success of Biorefineries: Current Status and Future Challenges. *Biofuels in Brazil*, Springer, 1ª Edição, pp. 151-172.