

INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE DE CELULASES E NO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA

Vanessa M. Vasconcellos^{1,2}, Paulo W. Tardioli¹, Raquel L. C. Giordano¹ e Cristiane S. Farinas^{1,2}

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

² Embrapa Instrumentação, Laboratório de Agroenergia, São Carlos

E-mail para contato: vanessamolina_10@yahoo.com.br

RESUMO

As enzimas envolvidas no processo de degradação da biomassa lignocelulósica para a produção do etanol de segunda geração (2G) agregam alto custo ao processo. Estudos reportados na literatura indicam que alguns íons metálicos, facilmente encontrados na natureza, ao serem adicionados ao coquetel enzimático atuam na melhoria da atividade e estabilidade das enzimas e no processo de sacarificação da biomassa. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a estratégia da adição de íons metálicos ao extrato enzimático bruto com o intuito de aumentar a atividade e estabilidade enzimática e a melhoria na conversão do processo de sacarificação, utilizando os íons metálicos bivalentes Ca, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Zn em duas concentrações (2 e 10 mM). A maioria dos íons metálicos utilizados influenciou, de forma distinta, a atividade e estabilidade enzimática em ambas as concentrações para as endoglucanases e β -glicosidases. O íon Mn^{2+} se destacou, propiciando um aumento de 57% na atividade de endoglucanase e mantendo a enzima estável por 72 horas, além disso não apresentou efeito negativo para β -glicosidase. Assim, o íon Mn^{2+} foi selecionado para o estudo da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos. A adição do íon Mn^{2+} (10 mM) no processo de sacarificação utilizando o extrato enzimático bruto produzido in-house mostrou-se eficaz no aumento da liberação de glicose, com ganhos percentuais de 34% para o bagaço pré-tratado em meio ácido.

1. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são produzidos a partir de recursos renováveis e têm potencial para serem o maior recurso energético mundial. Entretanto a utilização dos resíduos lignocelulósicos

para esse fim ainda tem como obstáculo o alto custo das celulases e hemicelulases, que são as enzimas envolvidas no processo de sacarificação da biomassa (Liu et al., 2013, Prevot et al., 2013).

O complexo (hemi)celulásico é composto por diferentes classes de celulases e hemicelulases altamente específicas, agindo sinergicamente na degradação da biomassa. Estudos reportados na literatura indicam que os íons metálicos são capazes de interferir nesse coquetel enzimático ligando-se nas enzimas, podendo modificar a sua conformação e alterar a atividade ou/e estabilidade (Kaur et al., 2007, Moreira et al., 2013).

A lignina é um composto presente no substrato lignocelulósico que interfere diretamente no processo de hidrólise, tanto dificultando o contato requerido pelas enzimas, como as adsorvendo de forma improdutiva e irreversível. Os íons metálicos podem ser novamente utilizados nessa etapa do processo, adsorvendo-se na lignina e ocupando o sítio onde poderiam ligar-se às enzimas de forma improdutiva, diminuindo, assim, a quantidade de enzimas que ficam inutilizadas (Liu et al., 2010).

Tendo em vista que as celulases agregam um grande custo nos processos que envolvem a produção de etanol 2G, o presente estudo visa investigar a influência na atividade e estabilidade a partir da adição dos íons metálicos no extrato enzimático bruto produzido por *A. niger* e no processo de sacarificação da biomassa.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Produção Enzimática

O extrato enzimático bruto foi obtido por fermentação em estado sólido (FES) utilizando como microrganismo o fungo filamentoso *Aspergillus niger* 3T5B8 pertencente à coleção da Embrapa Agroindústria e Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil). Foram inoculados 10^7 esporos/g de bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico lavado. A umidade do substrato indutor foi ajustada com a adição do meio de cultivo descrito por Mandels and Sternberg (1976). Os frascos permaneceram incubados em estufa a 32°C por 72 h. Para a obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada a extração com a adição de tampão acetato de sódio 200 mM e pH 4,5. A suspensão foi filtrada e centrifugada e o extrato foi mantido a -18°C para posteriores análises enzimáticas.

2.2. Íons Metálicos

Foram utilizados os íons bivalentes Ca e Co na forma de cloreto e Cu, Mg, Mn, Ni, Zn na forma de sulfato, o quelante EDTA e o desnaturante mercaptoetanol, em duas concentrações (2 e 10 mM).

2.3. Estabilidade Térmica

Para os ensaios de estabilidade térmica o complexo enzimático permaneceu incubado em condições estáticas, em banho termostático à 50 °C, pH 4,5 por 72 horas. As alíquotas foram retiradas após 24, 48, 72 horas, e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a

reação de inativação e analisadas de acordo com os procedimentos de atividades descrito na seção 2.5.

2.4. Sacarificação Enzimática

O processo de sacarificação da biomassa foi conduzido com 5% de carga de sólidos a 50°C por 24 horas. A quantificação da glicose liberada após 24 horas do processo foi determinada por um kit enzimático de glicose oxidase (Doles, Brasil). Na etapa de hidrólise utilizou-se seis substratos: celulose microcristalina (Avicel), bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico (BHT), hidrotérmico lavado (BHT_L), o explodido (BEX), o explodido lavado (BEX_L) e o ácido (BÁc), com $d_p < 0,5$. Para esse teste o extrato bruto foi concentrado utilizando a técnica de precipitação de proteínas com acetona.

2.5. Procedimento Analítico

Atividade de endoglucanase: a atividade de endoglucanase foi determinada de acordo com adaptações na metodologia de Ghose (1987). Os açúcares liberados foram determinados pelo método de DNS segundo Miller (1959).

Atividade de β -glicosidase: a atividade de β -glicosidase de acordo com adaptações na metodologia de Ghose (1987). A quantificação da glicose liberada foi determinada por um kit enzimático (Doles, Brasil).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da influência dos íons metálicos nas atividades enzimáticas foi realizada utilizando como referência o extrato enzimático bruto, que possui 2.431,1 \pm 122,5 UI/L de endoglucanase e 1.948,5 \pm 640,5 UI/L de β -glicosidase. Esses valores foram adotados como referência e a partir deles calculou-se o aumento ou a diminuição da atividade em termos de atividade percentual (%) para cada enzima. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, com 95% de confiança. A Figura 1 apresenta o resultado da influência do íon metálico na atividade enzimática. Para a endoglucanase (Figura 1A) pode-se observar que a utilização do EDTA na concentração de 10 mM reduz em 12% a atividade enzimática, assim, os íons inicialmente presentes no extrato bruto contribuem para aumentar a sua atividade. Os íons de Co²⁺ (2 mM) e Mn²⁺ (2 e 10 mM) aumentaram significativamente a atividade enzimática, com destaque para o manganês que aumentou a atividade em 57% e 42%, respectivamente. A atividade da β -glicosidase (Figura 1B) foi mais favorecida pela adição de diferentes íons metálicos quando comparadas as endoglucanases. Entretanto, o maior aumento de atividade foi de 33% utilizando-se os íons Co²⁺ a uma concentração de 2 mM.

Não foi possível encontrar um padrão de aumento, ou redução da atividade enzimática pela adição dos íons metálicos. Isso sugere que diferentes enzimas produzidas por um mesmo microrganismo ou enzimas produzidas por diferentes microrganismos apresentam diferença em sua composição estrutural. Assim, para a utilização de íons metálicos, visando ao aumento da atividade, é necessária a realização de testes experimentais para cada enzima de interesse.

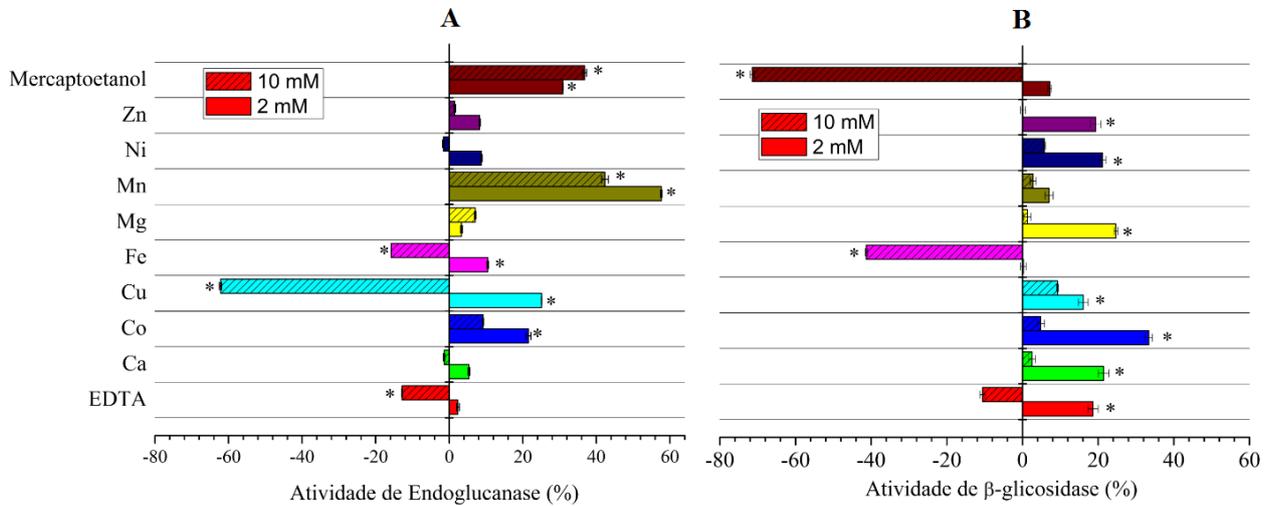


Figura 1. Percentual da atividade de endoglucanase (A) e β-glicosidase (%) (B) obtidos com a adição dos íons metálicos bivalentes, EDTA e β-mercaptoetanol. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, * apresenta diferença significativa em relação ao valor de referência ($\alpha=5\%$).

Devido ao aumento na atividade de endoglucanase com a adição do íon de Mn^{2+} , esse cátion foi selecionado para o teste de estabilidade térmica em ambas as concentrações (Figura 2). A estabilidade térmica enzimática, na presença do cátion Mn^{2+} , apresentou um comportamento semelhante e positivo em relação ao controle (sem a adição do íon). Assim, o íon foi selecionado para o teste na etapa de sacarificação.

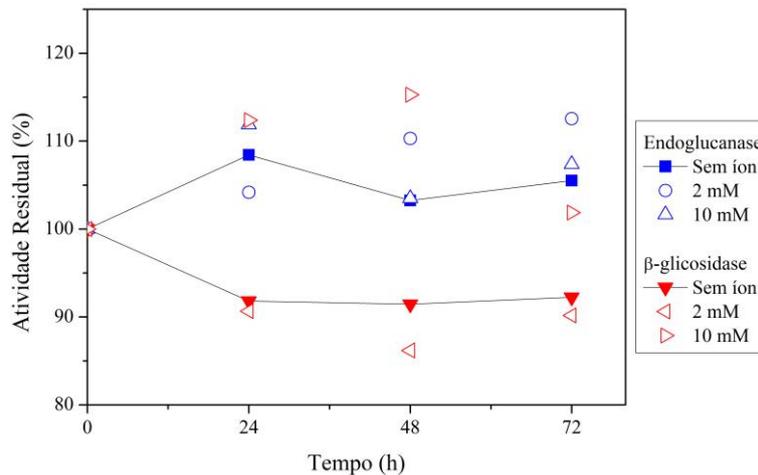


Figura 2. Termoestabilidade a 50°C e pH 4,5 de endoglucanase e β-glicosidase incubadas na ausência e presença de Mn^{2+} na concentração de 2 e 10 mM.

A influência do íon metálicos na sacarificação enzimática foi determinada pela quantidade de glicose liberada (GL) após as 24 horas de hidrólise. Utilizou-se como referência a quantidade de glicose liberada nos experimentos de hidrólise sem a adição do íon de manganês. A partir desses

resultados, calculou-se a variação da quantidade de glicose liberada, em ganho percentual (GL%), em relação a hidrólise realizada com a adição de Mn^{2+} na concentração de 2 e 10 mM.

A GL e GL% obtidos utilizando o extrato bruto concentrado (2,4 mg de proteínas/ g substrato) para a hidrólise dos diferentes substratos estão apresentados na Figura 3.

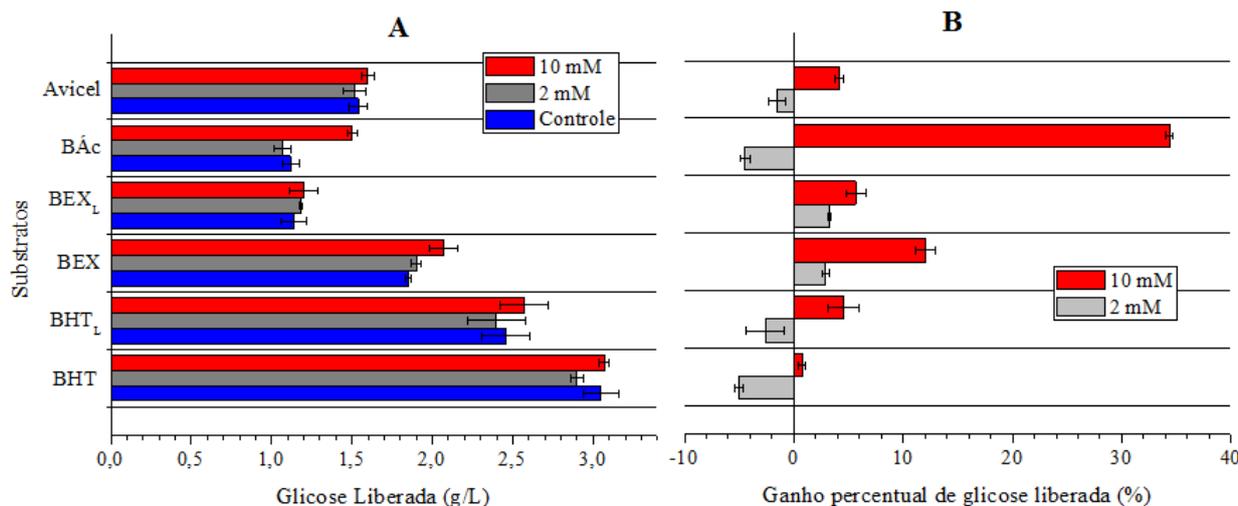


Figura 3. Glicose liberada (A) e ganho percentual de glicose liberada (%) (B) na presença do íon Mn^{2+} após 24h de processo a 50°C da hidrólise de diferentes substratos.

Pode-se observar que a adição do íon em ambas as concentrações apresentaram diferentes respostas à degradação enzimática, provavelmente devido as diferenças químicas e estruturais intrínsecas a cada pré-tratamento aplicado. Foi possível visualizar o efeito positivo da adição do íon metálico quando utilizado na concentração de 10 mM. A resposta mais expressiva à adição do íon foi para o BÁC, que teve GL elevado em 34%. Pode-se observar também que a adição do íon é mais positiva para o substrato que não passou pelo processo de lavagem, essa etapa pode estar removendo uma fração de oligossarídeos solúveis e celulose mais amorfa. A hidrólise do Avicel não apresentou ganho percentual de glicose liberada, tal fato evidencia o papel da interação íon-lignina, pois o avicel é um substrato comercial de celulose pura e de difícil degradação.

Neste estudo, a maior liberação de glicose no processo de hidrólise com a adição do íon metálico pode estar relacionada à neutralização das cargas negativas presentes na lignina, diminuindo assim, a adsorção enzimática.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição de íons metálicos é capaz de influenciar positivamente tanto a atividade e estabilidade como o processo de sacarificação enzimática, despontando-se como alternativa potencial para contribuir na redução do custo do processo de produção de etanol 2G.

5. AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES, PPG-EQ UFSCar, Embrapa Instrumentação.

6. REFERÊNCIAS

- GHOSE, T. K. 1987. Measurement Of Cellulase Activities. *Pure and Appl Chem.*, 59, 257-268.
- KAUR, J., CHADHA, B. S., KUMAR, B. A. & SAINI, H. S. 2007. Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus* sp MTCC 3922. *Bioresource Technol*, 98, 74-81.
- KO, J. K., XIMENES, E., KIM, Y., LADISCH, M. R.,. 2015. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. *Biotechnol Bioeng*, 112, 447-456.
- L. NELSON, D. & M. COX, M. 2012. *Lehninger: Principles of Biochemistry*.
- LIU, D. Y., LI, J., ZHAO, S., ZHANG, R. F., WANG, M. M., MIAO, Y. Z., SHEN, Y. F. & SHEN, Q. R. 2013. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnol for Biofuels*, 6, 16.
- LIU, H., ZHU, J. Y. & FU, S. Y. 2010. Effects of Lignin-Metal Complexation on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *J AgrFood Chem*, 58, 7233-7238.
- MANDELS, M. & STERNBERG, D. 1976. RECENT ADVANCES IN CELLULASE TECHNOLOGY. *J Ferment Technol*, 54, 267-286.
- MILLER, G. L. 1959. Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31, 426-428.
- MOREIRA, L. R. D., CAMPOS, M. D., DE SIQUEIRA, P., SILVA, L. P., RICART, C. A. O., MARTINS, P. A., QUEIROZ, R. M. L. & FERREIRA, E. X. 2013. Two beta-xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genet Biol*, 60, 46-52.
- PAREEK, N., GILLGREN, T. & JONSSON, L. J. 2013. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresource Technol*, 148, 70-77.
- PREVOT, V., LOPEZ, M., COPINET, E. & DUCHIRON, F. 2013. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioresource Technol*, 129, 690-693.