

Produção, otimização e aplicação de celulases de *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA na hidrólise de biomassa para etanol de segunda geração

Tarcisio Michael Ferreira Soares de Oliveira^a, Daniel Pasquini^b, Vivian Machado Benassi^c

^aEstudante do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da UFVJM, nível mestrado. E-mail: tarcisio.michael@ufvjm.edu.br

^bProfessor do Departamento de Química da UFU. E-mail: daniel.pasquini@ufu.br

^cProfessora do Instituto de Ciência e Tecnologia da UFVJM. E-mail: vivian.benassi@ufvjm.edu.br

1

Resumo: As celulases de fungos filamentosos têm grande potencial para converter biomassa em biocombustíveis. Este estudo buscou hidrolisar bagaço e palha da cana-de-açúcar, utilizando um microrganismo otimizado em suas melhores condições de cultivo e sua enzima caracterizada bioquimicamente. O *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA foi cultivado em meio submerso CP com sais CP, ureia e farelo de trigo, pH inicial de meio 5,46 com 1 mL da solução de esporos, cultivado por cinco dias à 30°C, em estufa bacteriológica. Para ambas as biomassas hidrolisadas liberou 0,196 g/L de açúcares redutores em 20 horas. O coquetel enzimático mostrou-se potencial para a aplicação industrial, especialmente na produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: *fungo filamentoso, reação enzimática, fermentação submersa, etanol 2G.*

1 - Introdução

A busca por alternativas sustentáveis de combustíveis fósseis, como os biocombustíveis de segunda geração (2G), tem se mostrado uma estratégia promissora no combate às mudanças climáticas e na redução da dependência por uma única fonte de combustível no setor de transporte. Enquanto os biocombustíveis de primeira geração (1G), produzidos a partir de culturas agrícolas, geram preocupações devido à competição com a produção de alimentos, os biocombustíveis de segunda geração (2G) surgem como uma solução viável e de baixo impacto na segurança alimentar global (BRYNGEMARK, 2019a; KARIMI et al., 2021).

Uma área de pesquisa ainda pouco explorada no Brasil é a prospecção de fungos filamentosos que possam ser bons produtores de enzimas celulolíticas de interesse industrial. Esses microrganismos apresentam potencial biotecnológico significativo e sua investigação proporciona maior conhecimento sobre as

propriedades bioquímicas e estruturais das enzimas envolvidas (BRYNGEMARK, 2019b).

Essas enzimas têm sido amplamente exploradas na indústria de alimentos, têxtil, detergentes, farmacêuticas, biocombustíveis, entre outras (GUPTA et al., 2020). Dentre uma variedade de biocatalisadores, destacam-se as celulases, as quais são cruciais na hidrólise do homopolissacarídeo celulose.

Além disso, as enzimas oferecem alternativas para resolver problemas em diversos setores industriais, ao mesmo tempo em que contribuem para o equilíbrio ambiental. A substituição de reagentes químicos poluentes por enzimas, que são facilmente degradáveis após o uso, representa um avanço importante na preservação do meio ambiente (DONG et al., 2023).

No contexto brasileiro, em que a produção de biocombustíveis é estrategicamente relevante, o estudo das celulases ganha ainda mais importância. As celulases são fundamentais para a produção de etanol 2G, pois promovem a hidrólise da celulose presente na parede celular

vegetal, liberando glicose e oligossacarídeos para a fermentação por leveduras e formação de etanol.

Diante dessas considerações, este trabalho teve como objetivo principal hidrolisar a biomassa lignocelulósica, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar pré-tratado em organossolve para liberação de açúcares passíveis de fermentação.

2 - Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP) localizado no Instituto de Ciências e Tecnologia, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* JK, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

A etapa de identificação do fungo *Aspergillus* 3.7TA foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia, da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

O microrganismo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

O fungo *Aspergillus* 3.7TA foi isolado da palha de cana-de-açúcar na usina de álcool e açúcar São Judas Tadeu-SADA Bio-Energia e Agricultura LTDA, na cidade de Jaíba no Norte de Minas Gerais.

Realizou a manutenção da cepa de duas formas: (1) em tubo de ensaio contendo meio de cultura sólido inclinado composto por aveia (EMERSON, 1941), armazenados em geladeira à 4°C e (2) em tubo com tampa de rosca contendo sílica gel, lacrado e armazenados à 4°C.

Definido o microrganismo de trabalho, realizou a otimização do meio de cultivo, analisando: (1) diferentes meios de cultivo; (2) efeito de diferentes fontes de nitrogênio; (3) diferentes sais; (4) várias fontes de carbono; (5) Influência do pH do meio; (6) variação da

concentração da solução de esporos no inóculo; e (7) tempo de cultivo do microrganismo.

Com o meio de cultivo padronizado em suas melhores condições, caracterizou-se bioquimicamente a endoglucanase, analisando: (1) efeito da temperatura e do pH na reação enzimática; (2) estabilidade da enzima em diferentes pH e temperaturas; (3) hidrólise de diferentes substratos; (4) efeito da enzima em diferentes sais e (5) efeito da adição de glicose na reação enzimática.

Após a caracterização enzimática, objetivou-se analisar a atuação do extrato bruto enzimático obtido pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA na hidrólise das biomassas pré-tratadas para a formação de açúcares fermentescíveis, visando a produção de etanol de segunda geração.

As amostras utilizadas na hidrólise foram o bagaço e palha da cana-de-açúcar, colhidas na safra de 2020 por meio do método de colheita mecanizada. A amostra do bagaço da cana-de-açúcar foi cedida pela empresa Bionergética Aroeira S/A, localizada na Rodovia BR-452, em Tupaciguara – MG. A palha de milho foi obtida na fazenda Bom Jardim Colombo, em Araguari-MG.

O processo de pré-tratamento organossolve da palha e do bagaço da cana-de-açúcar ocorreu no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQSC-USP), situado na cidade de São Carlos - SP. As reações foram conduzidas em um reator de alta pressão, com capacidade de 7L e foram controladas por agitação e aquecimento a uma temperatura de 180°C. O reator é constituído de uma liga altamente resistente à corrosão e pressão. Para o pré-tratamento foram utilizados 500 g de biomassa (massa seca) e 5 litros de uma solução etanol/água (1:1) (v/v).

O pré-tratamento foi realizado nas seguintes condições: temperatura de 180°C e tempo de reação de 2 horas em um sistema estático. A relação sólido-líquido foi mantida em

1:10 (m/v). Após essa etapa, as polpas obtidas foram dispersas em um desfibrador e, posteriormente, filtradas à vácuo para remover o licor.

Em seguida, as polpas foram submetidas a um processo de lavagem com abundante quantidade de água até que não houvesse mais resíduos presentes. Após esse procedimento, as polpas foram novamente filtradas à vácuo e, por fim, armazenadas para as etapas subsequentes do estudo.

Todo o processo foi realizado com cuidado e precisão, seguindo as técnicas adequadas para garantir a integridade e pureza das amostras. Todas as biomassas utilizadas neste estudo, bem como as polpas obtidas após serem submetidas ao processo de pré-tratamento orgânico, foram caracterizadas quanto a sua composição química.

Os ensaios ocorreram em tubo de ensaio com dimensões de 5cm x 1cm, à 55°C por 20 horas, em estado estacionário. A reação conteve 0,2 g de biomassa pré-tratada juntamente com 5 mL de solução tampão acetato de sódio 100 mM pH 2,57 e 5 mL de extrato enzimático.

A reação ocorreu em diferentes tempos reacionais (30 min., 60 min., 120 min., 960 min. e 1200 min.), após cada reação, foram retiradas alíquotas, centrifugadas e 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 100 µL de DNS, levando-o à fervura por 5 minutos, com posterior diluição em 1000 µL de água destilada.

A leitura da absorbância foi feita à 540 nm no leitor de placas de Elisa, para quantificação de açúcares redutores formados durante a hidrólise.

Os experimentos foram realizados em triplicata, onde as médias e desvios padrão foram calculados utilizando o software MS Excel. As análises estatísticas foram realizadas com programa livre Sisvar 5.8 – Build 92, sendo à estatística pelo Teste Tukey com α igual a 0,05. O teste de Tukey foi utilizado para examinar a

significância da diferença entre as médias de tratamento (SRIVASTAVA et al., 2020).

3 - Resultados e Discussão

A partir do material coletado do bagaço da cana-de-açúcar foram isolados seis fungos filamentosos dos gêneros *Mucor*, *Aspergillus* e *Neurospora*. Todos esses isolados demonstraram maior crescimento à 30°C, sendo classificados como fungos mesófilos.

Dentre os fungos testados em cultura submersa CP, o *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA apresentou a melhor atividade celulolítica, sendo selecionado para a otimização da produção enzimática.

Após a otimização do meio de cultivo, as melhores condições para o *Aspergillus* 3.7TA foram em meio de cultura submerso CP (PEIXOTO et al., 2003) contendo ureia como fonte de nitrogênio, sais do próprio meio CP e farelo de trigo como fonte de carbono, com pH inicial do meio de cultura igual a 5,46 e 1mL de solução de esporos do fungo para o inóculo, sendo o cultivo mantido em condições estacionárias durante cinco dias, em estufa bacteriológica.

Os melhores parâmetros para a reação enzimática para a enzima CMCase foi em pH 2,75 em tampão citrato de sódio 100 mM em temperatura de reação de 55°C, resultando em uma atividade máxima de CMCase de $0,25 \pm 0,02$ U/mL

Durante o estudo foi observado que a degradação da biomassa da cana-de-açúcar aumentou progressivamente com o tempo reacional para as duas amostras testadas, apresentando um perfil exponencial até atingir os 60 minutos.

Notavelmente, as duas hidrólises (do bagaço da cana e da palha da cana) mostraram perfis semelhantes, onde, após 120 minutos de reação, houve um decaimento na atividade enzimática de 15,08% no caso do bagaço e

3,57% na palha. No entanto, a atividade enzimática voltou a aumentar durante a hidrólise de ambas as biomassas, atingindo a liberação de 0,196 g/L de açúcares redutores em 1200 minutos de reação para as duas amostras (Figura 1).

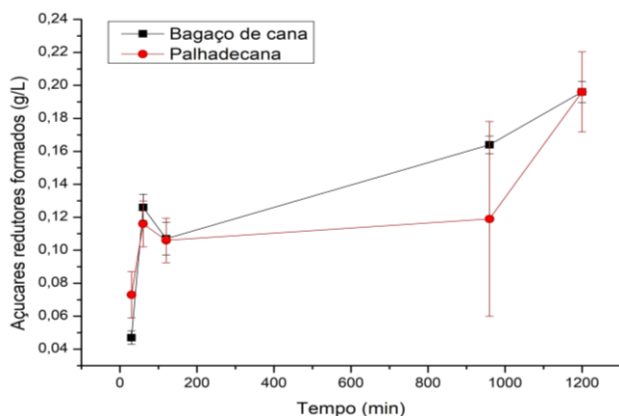


Figura 1. Hidrólise da biomassa da cana-de-açúcar pré-tratada com tratamento organossolve.

Essa variação na atividade enzimática ao longo do tempo de reação sugeriu a atuação de enzimas com diferentes pontos de ação na hidrólise da biomassa.

Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que as enzimas celulolíticas atuam em diferentes estágios do processo de hidrólise da celulose, que é uma estrutura complexa formada por cadeias de glicose.

As enzimas endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases trabalham sinergicamente para a despolimerização da celulose em açúcares fermentáveis, e cada uma delas atua em diferentes regiões da molécula de celulose.

O pré-tratamento desempenhou um papel essencial no aumento da acessibilidade das enzimas na redução das interações não atuantes das celulases. Um método de pré-tratamento eficaz converte a celulose nativa do tipo I em uma forma chamada alomorfo de celulose III. Isso resulta em uma melhoria significativa na

atividade hidrolítica de celulases fúngica (GAO et al., 2013).

A combinação de pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática foi uma abordagem comum na sacarificação de biomassa lignocelulósica. O pré-tratamento tem como objetivo desestruturar a complexa e resistente estrutura da biomassa lignocelulósica, preparando-a de forma adequada para a subsequente hidrólise enzimática. Esse processo é fundamental para a eficácia global da conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e representa uma etapa crucial no processo (CHUNDAWAT et al., 2021).

Portanto, o decaimento e subsequente aumento na atividade enzimática ao longo do tempo de reação são indicativos do processo dinâmico e complexo de hidrólise da celulose pela ação de múltiplas enzimas. Esses resultados destacam a importância da otimização das condições de reação para garantir uma ação eficiente e coordenada das enzimas envolvidas no processo de hidrólise da biomassa.

A compreensão desse comportamento enzimático pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes na produção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa celulósica, especialmente no contexto da produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado de forma mais sustentável.

4 - Conclusões

A partir do material coletado do bagaço da cana-de-açúcar foram isolados seis fungos filamentosos dos gêneros *Mucor*, *Aspergillus* e *Neurospora*. Todos esses isolados demonstraram maior crescimento à 30°C. Dentre os fungos testados o *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA apresentou a melhor atividade celulolítica, sendo selecionado para otimização da produção enzimática. Essa produção foi otimizada em meio submerso CP contendo ureia, sais CP e

farelo de trigo, com pH 5,46 e inóculo de 1mL de solução de esporos, em condições estacionárias durante cinco dias, em estufa bacteriológica.

A hidrólise da biomassa da cana-de-açúcar apresentou perfil de hidrólise semelhante para as duas biomassa pré-tratadas com tratamento organossolve, atingindo a liberação de 0,196 g/L de açúcares redutores em 1200 minutos. Observou-se que a enzima apresentou estabilidade, sendo benéfico em processos industriais.

Os resultados obtidos indicaram que este trabalho possuiu potencial de aplicabilidade em nível industrial para a produção de celulases. Isso se deve ao uso de fontes residuais de carbono e fontes de nitrogênio menos onerosas, bem como ao menor consumo de reagentes químicos na formulação do meio de cultivo e inóculo. Além disso, a produção de um coquetel enzimático capaz de liberar açúcares fermentescíveis e hidrolisar biomassa lignocelulósica de grande abundância em nosso país, a cana-de-açúcar, rica em celulose.

Em conclusão, o estudo demonstrou a viabilidade e eficiência do *Aspergillus brasiliensis* 3.7TA. Esses resultados destacam o potencial industrial dessa abordagem, que pode contribuir para a produção de enzimas celulolíticas de forma mais econômica e sustentável, utilizando resíduos agrícolas como fonte de carbono e minimizando o uso de reagentes químicos. Assim, o presente estudo abre caminho para aplicações biotecnológicas relevantes e pode ser útil no desenvolvimento de processos industriais mais eficientes e ambientalmente amigáveis.

5 - Agradecimentos

À UFMG, Ao ICT e ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis pela estrutura e recursos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior

– Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradecimento especial à Fundação de Amparo do Estado de Minas Gerais (FAPEMG) pelo apoio financeiro (Demanda Universal APQ-02178-21).

6 - Referências

BRYNGEMARK, E. Second generation biofuels and the competition for forest raw materials: A partial equilibrium analysis of Sweden. **Forest Policy and Economics**, v. 109, Dez, 2019a. Doi :<https://doi.org/10.1016/j.forpol.2019.102022>.

BRYNGEMARK, E. Second generation biofuels and the competition for forest raw materials: A partial equilibrium analysis of Sweden. **Forest Policy and Economics**, v. 109, March, p. 102022, 2019b. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2019.102022>.

CHUNDAWAT, S. P. S.; NEMMARU, B.; HACKL, M.; BRADY, S. K.; HILTON, M. A.; JOHNSON, M. M., ... GNANAKARAN, S. Molecular origins of reduced activity and binding commitment of processive cellulases and associated carbohydrate-binding proteins to cellulose III. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100431, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100431>.

DONG, C.; PATEL, A. K.; MADHAVAN, A.; CHEN, C.; SINGHANIA, R. R. Significance of glycans in cellulolytic enzymes for lignocellulosic biorefinery – A review. *Bioresource Technology*, V. 379, 128992, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128992>.

EMERSON, R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces. *Lloydia*, v. 4, p. 77–144, 1941.

GAO, Y.; GUO, M.; WANG, D.; ZHAO, D.; WANG, M. Advances in extraction, purification, structural characteristics and biological activities of hemicelluloses: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 225, P. 467- 483, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.099>.

4º WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS
UFVJM-UFU

GUPTA, S. K.; KATAKI, S.; CHATTERJEE, S.; PRASAD, R. K.; DATTA, S.; VAIRALE, M. G.; SHARMA, S.; DWIVEDI, S. K.; GUPTA, D. K. Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application. *Journal of Cleaner Production*, V. 258, 2020, 120351. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120351>.

KARIMI, S.; KARRI, R. R.; TAVAKKOLI YARAKI, M.; KODURU, J. R. Processes and separation technologies for the production of fuel-grade bioethanol: a review. ***Environmental Chemistry Letters***, v. 19, n. 4, p. 2873–2890, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01208-9>.

SRIVASTAVA, N.; ELGORBAN, A. M.; MISHRA, P. K.; MARRAIKI, N.; ALHARBI, A. M.; AHMAD, I.; GUPTA, V. K. Enhance production of fungal cellulase cocktail using cellulosic waste, *Environmental Technology & Innovation*. V. 19, 10094, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100949>.