



Avaliação de extrato enzimático holocelulolítico produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257 aplicado a processos de sacarificação de tortas de algodão e girassol

Ricardo S. Santos ^{1,2}, Jéssica L. Pimenta ³, Alice L. Macedo ², Augusto A. G. Munayer ⁴, Alexandre S. Santos ^{2,5}

¹Departamento de Farmácia - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM (ricardo.santos@ufvjm.edu.br); ²Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis – UFVJM/UFU; ³Instituto de Ciência e Tecnologia - UFVJM; ⁴Programa Jovens Talentos para a Ciência CAPES/UFVJM; ⁵Departamento de Ciências Básicas - UFVJM

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de um extrato enzimático holocelulolítico produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257 e concentrado por *salting out* em processos de sacarificação de tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas. Com uso do extrato enzimático produzido neste trabalho obteve-se valores de eficiência hidrolítica de 48% na sacarificação da holocelulose presente na torta de algodão *in natura* e 60% para torta de girassol *in natura*. Os açúcares assim obtidos, constituídos por pentoses e hexoses, podem ser destinados à produção de bioetanol. Logo, o referido estudo demonstrou ser uma alternativa atraente e promissora como forma de agregar valores a coprodutos de baixo custo.

Palavras-chave: Celulases, Xilanases, Coprodutos, Bioetanol.

Área Temática: Biocombustíveis

Evaluation of holocellulolytic enzymatic extract produced by *Aspergillus tubingensis* AN1257 in saccharification of cottonseed and sunflower seed cakes

Abstract

*The objective of this study was to evaluate the potential of a holocellulolytic enzyme extract produced by *Aspergillus tubingensis* AN1257 and concentrated by salting out in saccharification processes of *in natura* and pretreated cottonseed and sunflower seed cakes. With use of the extract produced in this work was obtained hydrolytic efficiency values of 48% in the saccharification of *in natura* cottonseed cake and 60% for *in natura* sunflower seed cake. The sugars thus obtained consisting of pentoses and hexoses, can be used for bioethanol production. Thus, this study proved to be an attractive and promising alternative as a way to add value to low-cost co-products.*

Key words: Cellulases, Xylanases, Co-products, Bioethanol.

Theme Area: Biofuels



1 Introdução

A valoração econômica e uso diversificado de resíduos agroindustriais fazem parte da lógica de mercado e do esforço de sustentabilidade de cadeias produtivas baseadas em biomassas. O emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos, além de economicamente interessante, contribui para minimizar os problemas ambientais decorrentes do seu descarte na natureza (VISSER et al., 2011). Neste panorama, coprodutos sólidos provenientes da agroindústria de óleos vegetais podem ser utilizados como substratos para produção de celulases e xilanases e também na produção de bioetanol de segunda geração (VIIKARI et al., 2012; VISSER, et al., 2011). A hidrólise de materiais lignocelulósicos é uma etapa fundamental no processo de produção do etanol de 2^a geração, cujo princípio é possibilitar a conversão da celulose e hemicelulose a açúcares fermentáveis que, por sua vez, poderão ser convertidos a etanol por micro-organismos específicos (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de um extrato enzimático holocelulolítico produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processos de sacarificação de tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas.

2 Metodologia

2.1 Obtenção e preparo da torta de algodão

A torta de algodão utilizada neste estudo foi doada pela Indústria de Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA – localizada no município de Montes Claros, MG. A torta de girassol foi doada pela indústria de biodiesel BIOSEP, localizada no município de Três Pontas, MG. Antes de serem avaliadas quanto à composição química e em processos de sacarificação, as referidas tortas foram inicialmente trituradas em moinho manual, posteriormente, secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 60 °C, por período de 48 horas. Em seguida os materiais obtidos foram cominuídos em moinhos de facas e peneirados em malhas de 0,5 e 0,2 mm.

Neste estudo foi avaliado o processo de sacarificação das tortas de caroço de algodão e girassol, *in natura* e pré-tratadas com ácido diluído. Para obtenção das tortas pré-tratadas empregou-se uma solução de ácido sulfúrico na concentração de 7% (p/p), a uma razão S/L de 30% em relação à torta de algodão e 20% para torta de girassol, sob temperatura de 120°C (1 atm) em autoclave por 60 minutos. Os materiais obtidos foram filtrados sob vácuo e os resíduos sólidos lavados com água destilada sob vácuo até atingir pH neutro. Os resíduos pré-tratados foram secos em estufa com circulação de ar forçada a 60 °C por 24 horas.

As tortas de algodão e girassol, *in natura* e pré-tratadas, foram caracterizadas quanto ao teor de celulose e hemicelulose segundo método descrito por Van Soest, (1967).

2.2 Produção do extrato enzimático

O crescimento da linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257 para obtenção do inóculo destinado à produção de enzimas holocelulolíticas foi realizado por repicagem de cultura estoque em meio sólido PDA mantido a 30°C durante 7 dias. Os conídios produzidos foram recuperados assepticamente por adição de meio líquido composto por (m/v): 0,7% de (NH₄)₂SO₄, 0,20% de KH₂PO₄, 0,03% de CaCl₂, 0,02% de MgSO₄.7H₂O, e 0,10% de solução de sais (5 mg/L FeSO₄.7H₂O, 1,6 mg/L MnSO₄.H₂O, 1,4 mg/L ZnSO₄.7H₂O, e 2,0 mg/L CoCl₂), seguido de coleta com auxílio de pipeta Pasteur, filtração em gaze estéril e contagem de esporos em câmara de Neubauer. A suspensão foi devidamente diluída de modo que a concentração final do inóculo fosse 1x10⁷ conídios/grama de torta utilizada no processo fermentativo.



A produção do extrato enzimático neste trabalho foi realizada por fermentação em estado sólido (FES) em condição otimizada conforme descrito por Santos (2015). Para tanto, o processo de FES foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 30,0 gramas de torta de caroço de algodão, acrescidos de 56,0 ml de inóculo (razão sólido/líquido de 35%). Estes sistemas foram incubados a 30°C em estufa B.O.D. durante 8 dias. A obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada por adição de 200 ml de tampão acetato pH 4,5, 50 milimolar, em cada frasco, seguido de agitação vigorosa em vórtex e filtração em sistema a vácuo. Posteriormente, o volume total do extrato enzimático bruto obtido foi concentrado por *salting out* com sulfato de amônia até 90% de saturação, em banho de gelo e sob agitação magnética. Após solubilização completa do (NH₄)₂SO₄, a suspensão obtida foi centrifugada a 4000 rpm, 4 °C, por 10 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram separados e os pellets recolhidos em um único recipiente. O precipitado protéico obtido foi completamente solubilizado com o menor volume possível de tampão acetato 100 mM, pH 4,5. O extrato enzimático concentrado, denominado EC AN1257, foi armazenado em gelo até determinação das atividades de endoglucanase, FPase, β-glucosidase (GHOSE, 1987) e xilanase (BAILEY et al., 1992) e utilização nos processos de sacarificação.

2.3 Processo de sacarificação

Os ensaios hidrolíticos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 2,00 g de torta de girassol ou algodão (*in natura* ou pré-tratada), os quais foram inicialmente esterilizados em autoclave. Aos frascos contento tortas de algodão *in natura* e pré-tratada foram adicionados 8 mL de extrato enzimático concentrado EC AN1257 perfazendo uma razão sólido/líquido de 20%. Já a sacarificação das tortas de girassol *in natura* e pré-tratada foi realizada com razão sólido/líquido de 15%. Para atingir esta razão S/L foram utilizados o mesmo volume de extrato enzimático concentrado empregado na sacarificação da torta de algodão (8 mL), acrescidos de 3,33 mL de tampão acetato, pH 4,5, 100 mM. O processo de sacarificação foi conduzido em estufa incubadora sob agitação de 120rpm, a temperatura de 50°C. Foram avaliados os períodos de sacarificação com 24 e 48 horas quanto à liberação de açúcares redutores (MILLER, 1959) e glicose (LLOYD; WHELAN, 1969) como produtos de hidrólise. Para efeito de comparação foram realizados testes hidrolíticos utilizando o produto comercial Celluclast® (Novozymes) diluído 2, 4, 8, 16 e 32 vezes em tampão acetato, pH 4,5, 100mm, e mesmas condições experimentais descritas anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As atividades de endoglucanase, FPase, β-glucosidase (GHOSE, 1987) e xilanase (BAILEY et al., 1992) foram determinadas no extrato comercial Celluclast® e os valores encontrados foram utilizados para expressar as quantidades de enzimas envolvidas nos processos de sacarificação. Antes e após a sacarificação foram retiradas alíquotas para determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959) e glicose (LLOYD; WHELAN, 1969). A eficiência hidrolítica no período de 24 horas e 48 horas de sacarificação foi calculada considerando a quantidade de celulose e hemicelulose presentes nos mostos e a diferença entre as concentrações de açúcares redutores iniciais e após os tempos de sacarificação avaliados, conforme equação 1.

$$Ef\ 1 = \frac{AR\ sac\ (g\ 100\ g) - AR\ in\ (g\ 100\ g)}{Polissacarídeos\ (g\ 100\ g)} \quad (1)$$

Ef 1: Eficiência hidrolítica após o processo de sacarificação

AR sac: Açúcares redutores (g) liberados na sacarificação de 100 g de torta.

AR in: Açúcares redutores (g) antes do processo de sacarificação de 100 g de torta

Polissacarídeos: Celulose e hemicelulose (g) presentes em 100 g de torta.



3 Resultados e discussão

Os teores de celulose encontrados na torta de algodão *in natura*, torta de algodão pré-tratada, torta de girassol *in natura* e torta de girassol pré-tratada foram $33,29\% \pm 1,13\%$, $46,33\% \pm 1,18\%$, $23,22\% \pm 0,30\%$ e $48,69 \pm 2,68$, respectivamente. Já os percentuais de hemicelulose para torta de algodão *in natura*, torta de algodão pré-tratada, torta de girassol *in natura* e torta de girassol pré-tratada foram, respectivamente, $8,76\% \pm 0,92\%$, $1,85\% \pm 0,27\%$, $20,55\% \pm 1,22\%$ e $1,89\% \pm 0,15\%$. Pode-se perceber que estas biomassas se destacaram pela quantidade elevada de carboidratos passíveis de serem hidrolisados e utilizados para produção de etanol de segunda geração.

Ante o exposto, pode-se perceber que, em decorrência do pré-tratamento ácido utilizado, houve um aumento significativo no teor de celulose nos resíduos pré-tratados quando comparados às tortas *in natura*, por consequência à remoção de grande parte da hemicelulose. Este tipo de pré-tratamento promove alterações radicais na estrutura da parede celular vegetal, favorecendo a acessibilidade das enzimas para a hidrólise subsequente da celulose. Vale ressaltar que uma das vantagens do método de pré-tratamento ácido é a possibilidade de se recuperar no processo de filtração a maior parte da hemicelulose a qual foi hidrolisada em açúcares. Isto indica que a aplicação de pré-tratamento ácido para diferentes substratos lignocelulósicos leva a produção de hidrolisados ricos em açúcar provenientes da hidrólise da hemicelulose e resíduos sólidos ricos em celulose. Destarte, tanto os hidrolisados como os resíduos sólidos podem ser destinados à produção de etanol.

Os valores de atividades das enzimas holocelulolíticas, expressas em unidades por grama de biomassa a ser sacarificada (U/g), nos ensaios hidrolíticos utilizando o extrato comercial Celluclast® e o extrato EC AN1257 encontram-se expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividades enzimáticas nos extratos enzimáticos utilizados em processos de sacarificação

Extrato enzimático	Diluição	FPase (U/g)	Endoglucanase (U/g)	β -glucosidase (U/g)	Xilanase (U/g)
Celluclast 1	32x	25	218	50	375
Celluclast 2	16x	50	437	100	750
Celluclast 3	8x	100	875	200	1500
Celluclast 4	4x	200	1750	400	3000
Celluclast 5	2x	400	3500	800	6000
EC-AN1257	-	100	50	650	6400

O extrato enzimático EC-AN1257 empregado neste trabalho apresentou elevados títulos de enzimas com atividades holocelulolíticas, sobretudo em relação à xilanase e β -glucosidase. Com base nos resultados expostos na Tabela 1 pode-se observar que o extrato enzimático EC-AN1257 apresentou atividade xilanolítica semelhante ao extrato comercial Celluclast® diluído 2 vezes. Em relação à atividade β -glucosidásica, o extrato EC-AN1257 apresentou atividade semelhante ao extrato Celluclast® diluído 2,5 vezes.

Os teores de açúcares redutores e glicose encontrados após 24 horas e 48 horas de sacarificação das tortas de algodão e girassol, *in natura* e pré-tratadas, utilizando o extrato enzimático EC-AN1257 e o extrato Celluclast® em diferentes diluições encontram-se expressos na Tabela 2. Considerando os teores de polissacarídeos (hemicelulose e amido) presentes nas tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas, e a diferença entre as concentrações de açúcares redutores iniciais e após 24/48h de sacarificação, pode-se calcular os valores de eficiências hidrolíticas nos referidos períodos (Tabela 2).

Avaliando tais resultados expressos na Tabela 2 percebe-se que o extrato enzimático produzido neste trabalho, EC-AN1257, foi mais eficiente na sacarificação das tortas de algodão e girassol *in natura* quando comparado ao uso do extrato Celluclast®, nas condições utilizadas neste estudo. Já nos processos de sacarificação dos resíduos de algodão e girassol pré-tratados, o extrato Celluclast® demonstrou ser mais eficiente.



5º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente

Bento Gonçalves – RS, Brasil, 5 a 7 de Abril de 2016

Tabela 2 - Concentrações de açúcares redutores e glicose após 24 e 48 horas de sacarificação das de torta de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas e valores de eficiência hidrolítica nos referidos períodos.

Biomassa	Extrato enzimático	AR 24h		Teste Tukey	AR 48h		Teste Tukey	Glicose 24h		Teste Tukey	Glicose 48h		Teste Tukey	Ef 24h (%)	Ef 48h (%)
		g/100g torta			g/100g torta			g/100g torta			g/100g torta				
Algodão	Celluclast 1	3,99	± 0,56	e	10,39	± 0,23	e	5,05	± 0,41	c	5,25	± 0,52	c	9,49	19,28
	Celluclast 2	6,90	± 0,99	d	11,23	± 0,43	e	5,48	± 0,43	bc	5,87	± 0,49	c	15,76	26,30
	Celluclast 3	7,95	± 1,36	cd	12,56	± 0,50	d	5,98	± 0,25	b	6,27	± 0,63	bc	18,80	29,38
	Celluclast 4	9,01	± 0,96	c	14,78	± 0,75	c	7,11	± 0,10	a	7,42	± 0,34	b	21,25	34,40
	Celluclast 5	15,23	± 1,07	b	16,39	± 1,19	b	7,59	± 0,08	a	8,94	± 1,09	a	37,27	43,84
	EC AN1257	18,57	± 0,30	a	20,16	± 0,40	a	5,05	± 0,28	c	5,69	± 0,08	c	44,22	48,01
Girassol	Celluclast 1	11,03	± 0,77	c	13,16	± 0,12	c	8,56	± 0,43	c	8,78	± 0,39	d	23,08	27,42
	Celluclast 2	15,35	± 0,69	b	17,75	± 0,38	b	12,98	± 0,51	b	13,53	± 0,67	c	31,81	36,78
	Celluclast 3	20,82	± 1,40	a	21,47	± 0,85	a	16,67	± 0,71	a	17,67	± 1,65	b	43,21	44,36
	Celluclast 4	21,70	± 1,87	a	22,61	± 0,90	a	17,94	± 1,33	a	21,37	± 0,06	a	45,03	46,53
	Celluclast 5	21,99	± 2,58	a	22,76	± 1,07	a	18,20	± 1,73	a	21,50	± 0,07	a	45,65	46,59
	EC AN1257	7,38	± 0,75	d	8,17	± 0,16	d	6,49	± 0,41	c	7,65	± 0,22	d	16,86	18,66
pré-tratada	Celluclast 1	11,45	± 1,75	c	16,20	± 2,64	b	9,35	± 1,94	a	7,57	± 0,67	c	25,16	40,32
	Celluclast 2	16,51	± 1,97	b	16,96	± 0,86	b	10,43	± 1,22	a	8,83	± 0,46	b	37,71	39,68
	Celluclast 3	15,39	± 2,00	b	17,81	± 0,56	b	10,22	± 0,54	a	9,20	± 0,10	ab	35,15	41,00
	Celluclast 4	15,98	± 2,03	b	17,67	± 0,61	b	10,40	± 0,35	a	9,45	± 0,40	ab	36,51	39,60
	Celluclast 5	15,73	± 3,34	b	17,48	± 0,96	b	10,32	± 0,69	a	9,99	± 0,53	a	35,94	38,66
	EC AN1257	23,25	± 1,18	a	25,41	± 0,46	a	5,94	± 0,21	b	6,53	± 0,12	d	55,36	60,49
pré-tratada	Celluclast 1	16,21	± 1,59	b	24,04	± 2,01	a	12,33	± 0,38	c	11,91	± 1,09	c	32,05	45,34
	Celluclast 2	20,22	± 1,64	a	25,08	± 1,53	a	16,83	± 0,77	b	15,54	± 0,57	ab	45,57	48,40
	Celluclast 3	21,57	± 1,85	a	25,05	± 1,69	a	17,75	± 0,41	ab	16,68	± 2,09	a	46,00	49,21
	Celluclast 4	20,50	± 2,12	a	24,99	± 1,60	a	18,05	± 0,19	a	17,48	± 0,67	a	45,02	48,78
	Celluclast 5	20,61	± 2,81	a	25,01	± 1,64	a	18,65	± 0,45	a	17,14	± 0,65	a	45,23	48,72
	EC AN1257	14,02	± 1,09	b	14,62	± 1,15	b	12,51	± 0,50	c	14,11	± 0,13	bc	28,91	27,72

Celluclast 1: Extrato diluído 32x; Celluclast 2: Extrato diluído 16x; Celluclast 3: Extrato diluído 8x; Celluclast 4: Extrato diluído 4x; Celluclast 5: Extrato diluído 2x; EC-AN1247: extrato enzimático produzido por *A. tubingensis* AN1257 AR: Açúcares redutores; Ef24h: Eficiência hidrolítica com base na liberação de açúcares redutores no período de 24 horas de sacarificação de polissacarídeos (amido; celulose e hemicelulose); Ef48h: Eficiência hidrolítica com base na liberação de açúcares redutores no período de 48 horas de sacarificação de polissacarídeos (amido; celulose e hemicelulose). Teste Tukey: As médias expostas em uma mesma coluna, com uso da mesma biomassa, seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.



Ao analisar os resultados referentes à concentração de glicose após 24 e 48 horas de sacarificação de todas as biomassas avaliadas, observam-se maiores concentrações deste açúcar ao se utilizar o extrato Celluclast®. Tais observações devem-se ao fato de cada um dos extratos avaliados apresentarem diferentes proporções das diversas enzimas envolvidas nos processos de hidrólise da celulose e hemicelulose. A hidrólise da hemicelulose é mais complexa do que a da celulose e requer a atuação de várias enzimas diferentes. Assim, pode-se afirmar que, mesmo diante de títulos semelhantes de xilanase entre os extratos EC-AN1257 e Celluclast®, a melhor eficiência do primeiro na sacarificação das biomassas *in natura* foi devido a sua composição de enzimas xilanolíticas que atuaram de forma mais específica na hidrólise das tortas de algodão e girassol. Como os carboidratos presentes nos resíduos pré-tratadas são em sua maioria celulose, os títulos mais elevados de enzimas celulolíticas no extrato Celluclast® corroboram para a sua melhor eficiência na hidrólise dos resíduos supracitados.

Ainda neste sentido, deve-se considerar que os valores maiores de concentração de glicose nos processos com uso de Celluclast® quando comparados aos processos utilizando EC-AN1257 também se devem aos títulos mais elevados de enzimas celulolíticas no extrato Celluclast®. Vale ressaltar que os açúcares assim obtidos, constituídos por pentoses e hexoses, têm alto valor de mercado. A utilização de hidrólise enzimática de co-produtos agroindustriais para obtenção de açúcares fermentecíveis é de grande interesse na biotecnologia moderna, particularmente para a produção de xilo-oligossacarídeos, gluco-oligossacarídeos e bioetanol.

Considerando ainda os resultados expressos na Tabela 2, pode-se perceber que foram obtidos maiores concentrações de glicose na sacarificação dos resíduos de algodão e girassol pré-tratados quando comparados à sacarificação destas biomassas *in natura*, independente de qual extrato enzimático foi utilizado. Como citado anteriormente, durante o pré-tratamento ácido, grande parte da hemicelulose é removida, e por consequência, a quantidade de celulose presente na biomassa pré-tratada torna-se maior. Portanto, tal fato corrobora para as concentrações maiores de glicose nos processos envolvendo a sacarificação dos resíduos pré-tratados. Vale ressaltar que os valores de eficiências obtidos neste estudo relacionados à sacarificação da torta de algodão pré-tratada estão contidas entre a faixa relatada por Fockink e colaboradores (2015), que obtiveram conversões celulósicas de 18 a 40% a partir de resíduos de descaroçadeira de algodão pré-tratados em 24 horas de sacarificação utilizando o extrato enzimático comercial Cellic CTec2®. Valores semelhantes de eficiência também foram obtidos por Plácido et al. (2013), que alcançou eficiências de conversão celulósica de 23,4% em 96 horas de sacarificação para resíduos de descaroçadeiras de algodão pré-tratados sequencialmente por ultra-som, extração de água quente e enzimas ligninolíticas. Já em relação à sacarificação do pré-tratado de torta de girassol, a eficiência hidrolítica ao se utilizar o produto comercial Celluclast® foi semelhante à relatada por Soto e colaboradores (1994), que obtiveram conversões de 50% a partir de resíduos de resíduos de girassol pré-tratados em 72 horas de sacarificação utilizando o mesmo produto comercial Celluclast®. Quanto ao uso do extrato enzimático EC-AN1257 na sacarificação do pré-tratado de girassol, valores semelhantes de eficiência foram obtidos por Sharma e colaboradores (2002), que relataram conversão hidrolítica de 32% em 24 horas de sacarificação de hastes de girassol pré-tratados, utilizando extrato enzimático produzido por *T. reesei* Rut-C 30.

Outro fato importante a ser observado é que na maioria dos processos de sacarificação avaliados com uso de Celluclast® a utilização títulos maiores de enzimas não acarretaram em aumentos significativos de açúcares redutores e glicose liberados como produto de hidrólise. Ou seja, independente da quantidade de extrato enzimático Celluclast® utilizada não foi possível obter a hidrólise completa dos polissacarídeos contidos nas tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas, nas condições de ensaio utilizadas. Na hidrólise da torta de



girassol *in natura* e pré-tratada observou-se que a utilização de extratos Celluclast® com diluições de 16 vezes ou inferiores (Extratos Celluclast 2, 3, 4 e 5) não diferiram significativamente na produção de açúcares redutores ou glicose após 24 horas de sacarificação (Tabela 21). Na hidrólise da torta de algodão pré-tratada não houve aumento significativo de açúcares redutores ou glicose com uso de extratos Celluclast® mais concentrados que o extrato diluído 8 vezes (Celluclast® 3) (Tabela 2).

Apenas na hidrólise da torta de algodão *in natura* observou-se que o aumento da carga enzimática acarretou em aumento significativo de açúcares redutores (Tabela 2). Sob a mesma linha de pensamento, deve-se considerar ainda que tanto nos processos de sacarificação com uso do extrato Celluclast® quanto nos processos com uso do extrato AN-1257, não houve aumentos significativos de açúcares redutores e glicose após 24 horas de sacarificação (Tabela 2).

A explicação para as observações supracitadas deve-se à forma de condução da sacarificação, pois as enzimas celulolíticas são passíveis de inibição pelos próprios produtos de hidrólise (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010). Assim, com o acúmulo de determinados açúcares (glicose e celobiose) ocorre a inibição de enzimas como as β -glucosidases (EC 3.2.1.21) e exoglucanases (celobio-hidrolases EC 3.2.1.74 e glucano-hidrolases EC 3.2.1.91) (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010). Para contornar este problema é necessário que haja um consumo dos produtos inibitórios como ocorre em processos de sacarificação e fermentação simultânea. Nessa forma de condução, as enzimas são menos passíveis de inibição pelos produtos de hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada.

Com base nos resultados expressos na Tabela 2 foi possível realizar projeções teóricas de produção de etanol de 2^a geração, as quais foram expressas na Tabela 3. Para tanto, foi considerado a conversão global de açúcares redutores ou de apenas glicose presentes no hidrolisado. Destarte, para tal projeção de conversão a etanol deve-se levar em consideração a fermentação completa de hexoses e pentoses.

Tabela 1 - Concentrações de glicose e açúcares redutores obtidas ao final de 48 horas de sacarificação e valores de projeções de conversão destes açúcares a etanol.

Biomassa	Extrato enzimático	Glicose 48h g/L	AR 48h g/L	¹ Etanol g/L (glicose)	Teste Tukey	² Etanol g/L (AR)	Teste Tukey
Algodão	<i>in natura</i>	Celluclast 5 22,34 \pm 2,7	40,98 \pm 2,97	11,42	dB	20,94	dA
	EC AN1257	14,22 \pm 0,2	50,41 \pm 1,01	7,27	fB	25,76	bA
	<i>pré-tratada</i>	Celluclast 5 53,76 \pm 0,2	56,12 \pm 2,68	27,47	aA	28,68	aA
	EC AN1257	19,13 \pm 0,6	20,42 \pm 0,40	9,77	eA	10,44	gA
Girassol	<i>in natura</i>	Celluclast 5 17,63 \pm 0,9	30,86 \pm 1,70	9,01	eB	15,77	eA
	EC AN1257	11,53 \pm 0,2	44,85 \pm 0,8	5,89	gB	22,92	cA
	<i>pré-tratada</i>	Celluclast 5 30,26 \pm 1,2	44,14 \pm 2,90	15,46	bB	22,56	cdA
	EC AN1257	24,9 \pm 0,2	25,81 \pm 2,02	12,72	cA	13,19	fA

AR: Açúcares redutores; 1: Projeção da produção de etanol com base na conversão fermentativa de glicose obtida no processo de 48 horas de sacarificação; 2: Projeção da produção de etanol com base na conversão fermentativa de açúcares redutores obtidos no processo de 48 horas de sacarificação; Teste Tukey: As médias expostas em uma mesma coluna seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si. Já as médias expostas em uma mesma linha seguidas pela mesma letra maiúscula minúscula não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao considerar a conversão teórica de açúcares redutores a etanol nos processos com uso de tortas *in natura*, o extrato EC-AN1257 apresenta-se como uma alternativa melhor quando comparado ao produto comercial Celluclast ®. Os maiores valores de etanol projetados foram para o processo de sacarificação da torta de algodão pré-tratada com uso do extrato Celluclast ®.



4 Conclusão

O extrato enzimático produzido neste trabalho, EC-AN1257, produzido por *A. tubingensis* com uso de torta de caroço de algodão como substrato, demonstrou ser eficaz nos processos de sacarificação das tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas. Considerando as projeções de produção de etanol a partir de tortas de girassol e algodão, pode-se inferir que esta seria uma alternativa atraente de reaproveitamento como forma de agregar valor a um coproduto abundante.

Referências

- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.**, v. 23, p. 257–270, 1992.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- FOCKINK, D.H.; MACENO, M.A.C.; RAMOS, L.P. Production of cellulosic ethanol from cotton processing residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 91–96, 2015.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.
- LLOYD, J. B.; WHELAN, W. J. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. **Analytical Biochemistry**, v.30, p.467-470, 1969.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.
- PLÁCIDO, J.; IMAM, T.; CAPAREDA, S. Evaluation of ligninolytic enzymes, ultrasonication and liquid hot water as pretreatments for bioethanol production from cotton gin trash. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 203–208, 2013.
- SHARMA, S. K.; KALRA, K.L.; GREWAL H.S. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 237 – 243, 2002.
- SOTO, M.L.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; LEMA, J.M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource Technology**, v. 49, p.53-59, 1994.
- VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. **J. Anm. Sci.**, v. 26. p 119-128, 1967.
- VIIKARI, L.; VEHMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass and Bioenergy**, p. 1-12, 2012.
- VISSE, E. M.; OLIVEIRA FILHO, D.; MARTINS, M. A.; STEWARD, B. L. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 489-494, 2011.