

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pré-Tratamento Enzimático de Resíduos Lignocelulósicos para Sacarificação

Osmar Antonio Baldo Pires ¹, Cristiane Vieira Helm ², Gustavo Henrique Couto ¹,
Jéssica Crecencio Matei ¹ e Giselle Maria Maciel ¹

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Depto. Acadêmico de Química e Biologia
81280-340 Curitiba – PR - E-mail: jessie_matei@hotmail.com

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Florestas
Caixa Postal 319 – 83411-000 Colombo – PR

RESUMO

*No Brasil são gerados anualmente toneladas de resíduos agroindustriais de composição lignocelulósica, os quais podem ser utilizados como biomassa para produção de etanol de segunda geração (2G). Nesse trabalho avaliou-se a aplicação de uma rota biológica para a remoção da lignina de materiais lignocelulósicos e posterior sacarificação por celulasas. Extratos brutos enzimáticos ricos em lacase foram produzidos em cultivo líquido estático pelo fungo *Pleurotus ostreatus* e utilizados na presença e ausência de mediadores químicos para o pré-tratamento de casca de arroz e serragem de eucalipto urofila. O pré-tratamento da casca de arroz com lacases possibilitou um aumento de 2,6 vezes na concentração de açúcares após a sacarificação em comparação com a biomassa não pré-tratada. Não foram obtidos resultados significativos na sacarificação com o pré-tratamento da serragem de eucalipto pelas lacases, no entanto, modificações em picos correspondentes a lignina e a celulose foram observadas em análises realizadas por FTIR.*

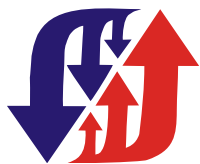
Palavras-chave: Etanol de Segunda Geração. Hidrólise Enzimática. Pré-Tratamento Biológico. Resíduos Lignocelulósicos.

INTRODUÇÃO

O uso de combustíveis fósseis leva a problemas ambientais e econômicos, como as emissões de gases de efeito estufa. Por causa disto, existe a necessidade de se utilizar fontes renováveis de energia. O etanol de segunda geração (2G) é uma alternativa interessante considerando que para sua produção pode-se empregar materiais descartados de outros processos ou que têm baixo valor agregado (NUNES *et al.*, 2013).

Resíduos agroindustriais que têm em sua composição celulose (e hemicelulose) podem servir como fonte de açúcares fermentescíveis para produção de etanol. Entretanto, o ponto fundamental é permitir que esses componentes da parede celular vegetal estejam acessíveis à hidrólise.

A metodologia ideal é aquela que permite a remoção da barreira de lignina e hemicelulose, levando a altos rendimentos na liberação de açúcares, porém sem gerar inibidores para a etapa de fermentação (OLIVA *et al.*, 2003). Outra questão importante a ser considerada atualmente em um processo está relacionada à redução da geração de grande quantidade de resíduos ou mesmo de resíduos tóxicos. Considerando estes fatores, as rotas



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

enzimáticas tendem a ser as mais interessantes, pois exibem alta seletividade, evitando e/ou reduzindo a geração de inibidores e também de resíduos.

Neste trabalho foi avaliado o potencial da aplicação de uma rota enzimática para a modificação e remoção da lignina da casca de arroz e da serragem de eucalipto urofila, e assim aumentar o acesso de enzimas celulolíticas à celulose.

MATERIAL E MÉTODOS

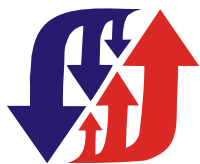
A primeira etapa do trabalho envolveu a produção de extratos enzimáticos brutos ricos em lacase, a qual foi realizada em cultivo líquido estático utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*. O meio utilizado para produção da enzima foi composto por glicose (10 g L^{-1}), fosfato de potássio monobásico (3 g L^{-1}), sulfato de magnésio heptahidratado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$), peptona ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), sulfato de cobre (1 mM) e serragem de eucalipto (2%) (HOU *et al.*, 2004; GALHAUP *et al.*, 2002). O processo foi realizado em frascos Erlenmeyer contendo o meio de produção, inoculados com discos de agar-micélio, os quais foram obtidos após 7 dias de cultivo do fungo *P. ostreatus* em meio agar batata dextrose. Os frascos foram incubados em estufa a 28°C por 7 dias. A biomassa foi separada do extrato enzimático bruto por filtração em papel de filtro e a atividade de lacase foi detectada espectrofotometricamente a 420 nm utilizando o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) como substrato (HOU *et al.*, 2004).

Em uma segunda etapa, os extratos brutos contendo lacase como principal enzima ligninolítica foram aplicados no pré-tratamento de casca de arroz e serragem de eucalipto urofila, objetivando a remoção da lignina e exposição da camada de celulose. Os experimentos de pré-tratamento enzimático foram baseados em metodologias descritas na literatura por Moilanen *et al.*, (2011), Chen *et al.*, (2012) e Gutiérrez *et al.*, (2012). Em cada ensaio foram utilizadas 50 U de lacase por grama de material lignocelulósico, na presença ou ausência de mediadores químicos. O tratamento enzimático foi realizado em shaker a 130 rpm e 28°C por 48 h. Extratos brutos foram fervidos para desnaturação enzimática e utilizados em experimentos controle. Ao término do período de tratamento enzimático, o material sólido residual foi separado por filtração e seco em estufa a 40°C para posterior análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Mudanças na intensidade de bandas correspondentes à lignina e à celulose foram avaliadas (PANDEY; PITMAN, 2003; ZHANG *et al.*, 2007). A concentração de mono e dissacarídeos no filtrado foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (SAQIB; WHITNEY, 2011).

Na etapa final deste trabalho realizou-se a aplicação do coquetel enzimático Cellic® Ctec2 (Novozymes) nas biomassas pré-tratadas e não pré-tratadas enzimaticamente para sacarificação segundo as condições estabelecidas previamente por Wang *et al.*, 2013 e Dias *et al.*, 2010. Após esta etapa de sacarificação, amostras foram submetidos à análise de mono e dissacarídeos por DNS (SAQIB; WHITNEY, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A aplicação dos extratos enzimáticos brutos de lacase na casca de arroz resultou em alterações na intensidade de picos relacionados à lignina e à celulose observadas nas análises realizadas por FTIR (Figura 1).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

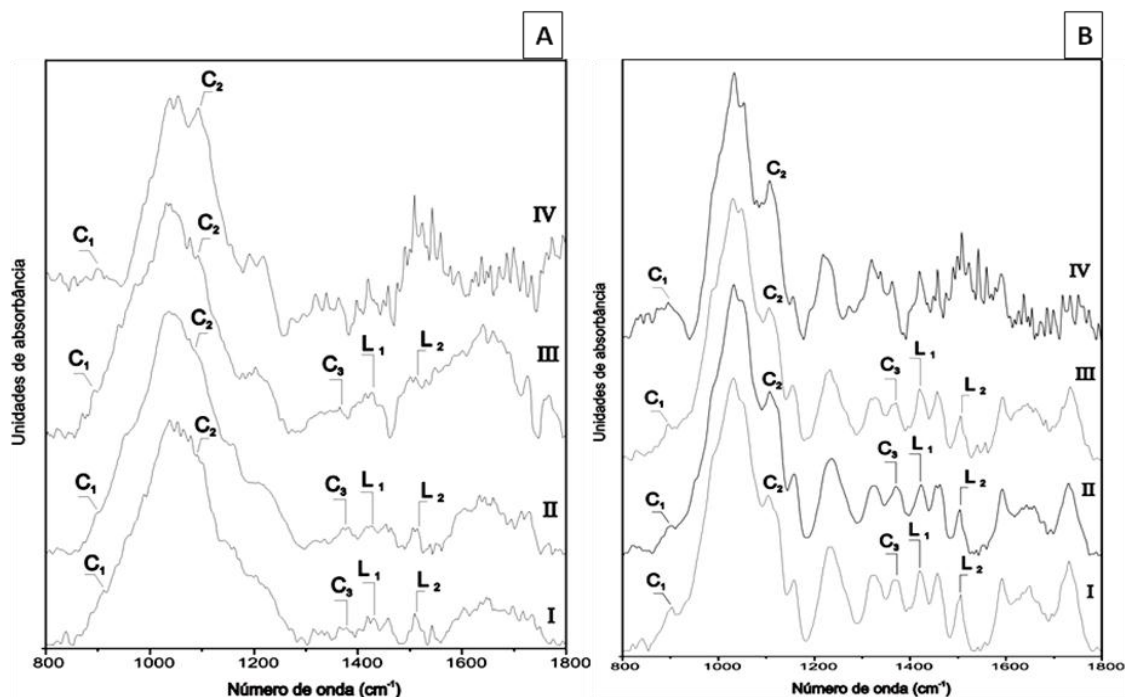


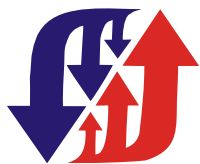
Figura 1. (A) Espectros de infravermelho para casca de arroz e (B) Espectros de infravermelho para eucalipto urofila; onde: I – in natura; II – tratamento com lacase desnaturada e ácido ferúlico; III – tratamento com lacase e siringaldazina; IV – tratamento com lacase e ácido 4-hidroxibenzóico; C1, C2 e C3 (900, 1098 e 1395 cm^{-1}) – bandas correspondentes a carboidratos; L1 e L2 (1427 e 1515 cm^{-1}) – bandas correspondentes à lignina.

O tratamento enzimático mais eficiente na redução da lignina (intensidade dos picos) em comparação com o controle (lacase desnaturada) e com a biomassa não tratada foi aquele realizado com a lacase na presença do mediador AHB. Nesta condição houve o aparecimento de picos mais pronunciados relacionados à celulose nos espectros de FTIR (Figura 1A) e não foram detectadas quantidades significativas de açúcares após a aplicação da lacase (evidenciando a ausência de degradação da celulose antes da sacarificação).

A concentração de glicose detectada após a sacarificação da casca de arroz pré-tratada com o extrato bruto de lacase e o mediador AHB foi de 16,3 $\mu\text{mol/mL}$, a qual é 2,6 vezes maior que a quantidade detectada após a sacarificação da casca de arroz não tratada (6,2 $\mu\text{mol/mL}$).

O pré-tratamento enzimático da serragem de eucalipto não foi tão eficiente em comparação com aquele realizado na casca de arroz. A avaliação dos espectros de FTIR (Figura 1B) demonstrou pequena redução na intensidade de picos correspondentes à lignina nas amostras de eucalipto tratadas com lacase e o mediador siringaldazina e nas amostras tratadas com lacase e o mediador ácido ferúlico, em comparação com os controles.

Quanto às análises de açúcares liberados após a sacarificação, não foram observados resultados significativos dos tratamentos. Portanto, a serragem do eucalipto urofila foi um material mais recalcitrante ao ataque das lacases nas condições estudadas, mas as diferenças de intensidade nos picos de lignina e celulose detectadas por FTIR, mesmo que em pequena escala, são indicativos de que a aplicação do extrato bruto pode ser otimizada.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

CONCLUSÕES

A aplicação do extrato bruto de lacases produzido por *Pleurotus ostreatus* foi eficiente no pré-tratamento de casca de arroz na presença de ácido 4-hidroxibenzóico, resultando em alterações na estrutura química do material lignocelulósico e aumentando a viabilidade da hidrólise da porção celulolítica por celulases, em comparação com a casca de arroz não tratada. O pré-tratamento da serragem de eucalipto com as lacases demonstrou apenas pequenas modificações na intensidade de picos correspondentes a lignina nas análises por FTIR, e não houve resultados positivos quanto a influência do pré-tratamento enzimático na etapa de sacarificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Journal

Chen Q, Marshall MN, Geib SM, Tien M, Richard TL. 2012. Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. *Bioresource Technology* 117:186-192.

Dias AA, Freitas GS, Marques GS, Sampaio A, Fraga IS, Rodrigues MA, Evtuquin DV, Bezerra RM. 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource Technology* 101(15):6045-6050.

Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4):529-536.

Gutiérrez A, Rencoret J, Cadena EM, Rico A, Barth D, del Río JC, Martínez AT. 2012. Demonstration of laccase-based removal of lignin from wood and non-wood plant feedstocks. *Bioresource Technology* 119:114-122.

Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry* 39(11):1415-1419.

Moilanen U, Kellock M, Galkin S, Viikari L. 2011. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* 49(6-7):492-498.

Nunes RM, Guarda EA, Serra JCV, Martins AA. 2013. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. *Revista Liberato* 14(22):113-238.

Oliva JM, Sáes F, Ballesteros I, González A, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros M. 2003. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105(1):141-153.

Pandey KK, Pitman AJ. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52(3):151-160.

Saqib AAN, Whitney PJ. 2011. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy* 35(11):4748-4750.

Wang W, Yuan T, Cui B, Dai Y. 2013. Investigating lignin and hemicellulose in white rot fungus-pretreated wood that affect enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 134:381-385.

Zhang X, Yu H, Huang H, Liu Y. 2007. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60(3):159-164.