

AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE BASIDIOMICETOS NA HIDRÓLISE DE BIOMASSA FLORESTAL PRÉ-TRATADA

Kleber Hoffmann*, Leonardo de Castro Brandani*, Edson Alves de Lima**, Cristiane Vieira Helm**, Washington Luiz Esteves Magalhães**

*Graduando de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná, estagiário da Embrapa Florestas, Colombo – Paraná E-mail: kleber_h@hotmail.com

**Pesquisador Embrapa Florestas, Caixa Postal 319, 83411-000, Colombo, PR

Resumo

Estudou-se a atuação de basidiomicetos na síntese de enzimas para hidrólise de materiais lignocelulósicos. Cinco espécies foram estudadas: *Fomitopsis nivosa*, *Lentinula boryana*, *Polyporus udus*, *Perenniporia sp.*, *Flaviporus venustus*, todas provenientes da coleção de macrofungos da *Embrapa Florestas*. Os isolados foram submetidos a uma fermentação submersa por sete dias visando a produção de enzimas. Em seguida o extrato foi filtrado e adicionado aos substratos para a etapa de hidrólise enzimática por 24 horas. O substrato foi a madeira de *Eucalyptus benthamii*, submetido a três pré-tratamentos diferentes: NaOH + etanol; Licor Verde; Licor Verde + etanol, e também um controle (sem pré-tratamento). O objetivo dos pré-tratamentos foi facilitar o acesso das enzimas na celulose do material, removendo a lignina e a hemicelulose. A análise dos monossacarídeos após a hidrólise enzimática da celulose foi feita através da quantificação de açúcares redutores gerados pelo método DNS. Foi possível também observar a porcentagem de conversão de celulose em açúcares redutores em cada substrato. Porém, as taxas de conversão não ultrapassaram 3% para experimentos realizados.

Abstract

EVALUATION OF ISOLATED BASIDIOMYCETES IN THE HYDROLYSIS OF FOREST PRE-TREATED BIOMASS

It was studied the performance of basidiomycetes in the enzymes productions for the hydrolysis of lignocellulosic materials. Five different species were studied: *Fomitopsis nivosa*, *Lentinula boryana*, *Polyporus udus*, *Perenniporia sp.*, *Flaviporus venustus*, all belonging to the *Embrapa Florestas* fungi collection. The isolates were subjected to submerged fermentation for seven days in order to produce enzyme. Then, the extract was filtered and added to the substrates for the enzymatic hydrolysis step during 24h. Wood of *Eucalyptus benthamii* was used as substrate and subjected to three different pre-treatments - NaOH and ethanol; green liquor; green liquor and ethanol; and also a control (without pre-treatment). The purpose of pre-treatments was to facilitate the access of cellulose to enzymes through removing the lignin and the hemicellulose. The quantification of monosaccharides after cellulose enzymatic hydrolysis was performed calculating the reducing sugars using the DNS method. It was also possible to evaluate the percentage of cellulose conversion into reducing sugars in each substrate. Unfortunately, the conversion coefficient did not exceed 3%.

INTRODUÇÃO

A produção de etanol atualmente é baseada principalmente na fermentação de produtos agrícolas como a cana de açúcar, milho, trigo, mandioca entre outros (GOLDEMBERG, 2008). A maior parte deste combustível é produzida no Brasil a partir da cana de açúcar, e nos Estados Unidos a partir do milho, que juntos correspondem a 72 % da produção mundial (UNICA, 2008; EIA, 2008).

Entretanto, no Brasil, o aumento da demanda de etanol do mercado interno e também para exportação gera uma preocupação quanto à sustentabilidade do método atual de produção. Os impactos negativos das mudanças no uso da terra em áreas de grande biodiversidade incluindo o desmatamento o mau uso do solo e a competição entre produção de alimentos e biocombustíveis (GOLDEMBERG, 2008), levam a busca de outras tecnologias de produção de etanol.

Uma alternativa é a produção de etanol a partir da hidrólise de material lignocelulósico. Este método a partir de biomassa lignocelulósica tem um grande potencial ambiental, econômico e social. Em particular,

material-lignocelulósico de biomassa lenhosa é visto como uma fonte de energia promissora porque é renovável e possui carboidratos em abundância (SUN e CHENG, 2002).

Entretanto, biomassa lignocelulósica possui uma estrutura complexa contendo principalmente celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. Esta estrutura dificulta a ação de enzimas, sendo necessário um pré-tratamento da biomassa. A remoção de lignina e hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade nos processos de pré-tratamento podem melhorar significativamente a hidrólise (MCMILLAN, 1994).

O aproveitamento da biomassa lignocelulósica na produção de etanol via hidrólise enzimática ainda depende de tecnologias que reduzam o custo de produção e/ou aumentem a atividade das enzimas hidrolíticas, assim como a obtenção de pré-tratamento eficiente e de baixo custo.

Na natureza, a degradação dos resíduos lignocelulósicos é realizada basicamente por microrganismos como bactérias e fungos, que produzem uma série de enzimas hidrolíticas e oxidativas capazes de degradar as estruturas poliméricas em seus componentes monoméricos (ERIKSSON et al., 1990). Neste contexto os fungos filamentosos têm especial interesse, e os basidiomicetos, são os de melhor desempenho, devido às suas propriedades fisiológicas, enzimáticas e bioquímicas. Esta classe fúngica apresenta característica de produzir enzimas extracelulares com destaque para celulasas e ligninases.

O objetivo deste trabalho foi observar a produção e ação de enzimas hidrolíticas de alguns isolados de basidiomicetos em diferentes substratos lignocelulósicos submetidos a pré-tratamentos. Ele está inserido no projeto de "Florestas Energéticas na Matriz de Agroenergia Brasileira" e foi iniciado em abril de 2010. É um projeto que está apenas no seu início, porém existem grandes expectativas tanto no aspecto biotecnológico quanto no ambiental e econômico.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado a partir de cinco isolados (Tabela 1) da coleção de macrofungos da *Embrapa Florestas*, mantidos em método castellani. Foram transferidos para placas de Petri com meio PDA a 25 ± 1 °C onde se desenvolveram durante 7 dias. Após o crescimento, foram transferidos para placas de Petri contendo o meio básico-Socarean, onde permaneceram por mais sete dias a 25 ± 1 °C. O meio básico-Socarean foi composto por: NaNO_3 : 3,0 g L⁻¹; K_2HPO_4 : 1,0 g L⁻¹; MgSO_4 : 0,5 g L⁻¹; KCl : 0,5 g L⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g L⁻¹; ágar: 30,0 g L⁻¹.

Tabela 1 - Isolados de basidiomicetos avaliados para produção de enzimas hidrolíticas. Basidiomycetes isolates evaluated for hydrolytic enzymes production.

Isolado	Espécie
0011	<i>Fomitopsis nivosa</i>
024-3	<i>Lentinula boryana</i>
0035	<i>Polyporus udus</i>
0043b	<i>Perenniporia sp.</i>
0053	<i>Flaviporus venustus</i>

Para obtenção dos inóculos foram retirados 10 discos (plugs) do centro de cada placa de Petri, provenientes do meio básico-Socarean. Primeiramente foi realizada uma fermentação submersa com a finalidade de se obter micélios desenvolvidos. Posteriormente uma etapa que consiste na filtração do meio contendo micélios, para separação dos extratos enzimáticos (pool de enzimas) livres da biomassa para posteriormente serem adicionados a biomassa florestal pré-tratada.

Na fermentação submersa a composição do meio líquido de cultura foi a mesma das placas contendo meio básico-Socarean, com exceção do componente ágar. Este meio líquido também conteve como fonte de carbono e atuante na indução da produção de celulasas, sabugo de milho moído (granulometria $\leq 0,5$ mm), na concentração de 10 g L⁻¹. Foram adicionados aos frascos de Erlenmeyer de 250 mL, 200 mL deste meio, que depois de autoclavados foram inoculados com 5 discos dos respectivos isolados, totalizando 10 Erlenmeyers. Os frascos foram incubados em um agitador (shaker), a 25 °C, por sete dias, em duplicata.

Após a fermentação, foi realizada uma etapa de filtração para separação dos micélios desenvolvidos e obtenção do extrato enzimático puro. Para tal etapa foram utilizados funis com papel filtro e para auxiliar na filtração, o sistema foi submetido à atuação de uma bomba de vácuo, aumentando assim a eficiência do processo. Os micélios retidos no papel filtro foram posteriormente congelados e armazenados. Uma parcela do extrato enzimático foi reservada para quantificação do teor de proteínas totais.

Para determinação de proteínas totais foi utilizado o método micro KJELDAHL (BRASIL, 2005).

Para aplicação dos extratos enzimáticos na biomassa florestal foram realizados três pré-tratamentos (Tabela 2), além da testemunha (sem pré-tratamento), utilizando serragem de *Eucalyptus benthamii* com granulometria entre 40 e 60 mesh. Os pré-tratamentos foram: PT 1 – hexano:etanol (1:1), seguido de maceração com NaOH 10% em água a 120 °C; PT 2 - licor verde a 120 °C; PT 3 - licor verde e etanol na proporção 1:1 a 120 °C. A razão de volume de solução para massa de madeira foi de 8:1.

Tabela 2. Porcentagens de celulose nas biomassas após os pré-tratamentos. Percentage of cellulose in biomass subjected to pretreatments.

Pré-tratamento*	Celulose (%)
Sem PT	46,70
PT - 1	59,40
PT - 2	57,60
PT - 3	59,50

*PT 1 – hexano:etanol (1:1), com NaOH 10%; PT 2 - licor verde; PT 3 - licor verde e etanol (1:1). PT 1 – hexane:ethanol (1:1), with NaOH 10%; PT 2 – green liquor; PT 3 – green liquor and ethanol (1:1).

Para a hidrólise enzimática foi utilizado 0,167 g de biomassa pré-tratada e adicionados 5 mL do extrato enzimático de cada isolado em tubos de ensaio em duplicata, totalizando 40 tubos. A hidrólise enzimática foi realizada em shaker a 140 rpm, temperatura de 40 °C durante 24 horas.

Após as hidrólises enzimáticas, os tubos foram retirados do shaker, e as amostras em duplicata foram filtradas com o auxílio de pequenos funis de vidro e papel filtro e armazenadas em tubos de ensaio com tampa. O volume do filtrado variou de acordo com o pré-tratamento. O resíduo úmido da biomassa pré-tratada retido no papel filtro foi descartado e o filtrado armazenado em tubos para avaliação do teor de açúcares redutores.

Para quantificação de açúcares redutores foi utilizado o método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Este método é baseado na formação de enedióis, derivados de hexoses em meio fortemente alcalino a quente, que cedem elétrons que reduzem o reagente 3,5- dinitrosalicilato (amarelo forte) a 3-amino-5-salicilato (laranja-marrom forte).

Faz-se necessária a construção de uma curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores. Para isto, foi construída uma solução padrão de glicose 10 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Esta solução consistiu da adição de 45 mg de glicose em 25 mL de água destilada.

A solução de DNS foi composta por: 10 g de DNS dissolvidos em 200 mL de NaOH 2N. Solução composta de 300 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio) dissolvidos em 500 mL de água destilada. Misturou-se as soluções e promove-se aquecimento (40 °C) para completa dissolução do DNS. Após a dissolução, a solução foi avolumada em balão volumétrico para 1000 mL com água destilada.

A curva padrão foi feita com um gradiente de concentração da solução de glicose para a construção dos padrões da curva de calibração (Tabela 3).

Tabela 3- Curva de Calibração pelo método DNS. Calibration Curve for the DNS method

Tubos	Solução de Glicose 10 $\mu\text{mol/mL}$ (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (g L^{-1})	DNS (mL)
0	0,0	1,0	0,0	1
1	0,1	0,9	0,18	1
2	0,2	0,8	0,32	1
3	0,3	0,7	0,54	1
4	0,4	0,6	0,72	1
5	0,5	0,5	0,9	1
6	0,6	0,4	1,08	1
7	0,7	0,3	1,26	1
8	0,8	0,2	1,44	1
9	0,9	0,1	1,62	1
10	1,0	0,0	1,8	1

Para a reação de redução, os tubos foram levados à fervura durante 5 minutos, resfriados a temperatura ambiente e então completados com 13 mL de água destilada formando um volume total no tubo de 15 mL. Em seguida fez-se a leitura e a calibração do espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Para as amostras o seguinte procedimento foi realizado: 1 mL de DNS adicionado a 1 mL de amostra. Então os tubos foram levados a fervura por 5 minutos e completados com 13 mL de água destilada. Prontos todos os tubos com as amostras, eles foram levados para leitura no espectrofotômetro previamente calibrado. A calibração foi realizada antes da leitura das amostras e os dados gerados foram em (g L^{-1}) de açúcares redutores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, obtidos pelo método DNS podem ser visualizados na Tabela 4, são as médias das duplicatas para cada isolado e cada pré-tratamento.

Tabela 4: Efeitos de pré-tratamentos e isolados de basidiomicetos na hidrólise de carboidratos de biomassa florestal, determinados em açúcares redutores (g L^{-1}) pelo método DNS. PT 1 – hexano:etanol (1:1), com NaOH 10 %; PT 2 - licor verde; PT 3 - licor verde e etanol (1:1). Effects of pretreatments and isolates of basidiomycetes in the hydrolysis of carbohydrates in forest biomass, determined as reducing sugars (g L^{-1}) by DNS method. PT 1 – hexane:ethanol (1:1), with NaOH 10 %; PT 2 – green liquor; PT 3 – green liquor and ethanol (1:1).

Pré-tratamento	Isolados				
	<i>Fomitopsis nivosa</i>	<i>Flaviporos venustus</i>	<i>Lentinula boryana</i>	<i>Perenniporia sp.</i>	<i>Polyporus udus</i>
SPT	0,384	0,274	0,349	0,141	0,291
PT-1	0,233	0,07	0,075	0,035	0,049
PT-2	0,282	0,071	0,06	0,033	0,069
PT-3	0,425	0,141	0,072	0,031	0,047

Com as concentrações de açúcares redutores e tendo também o conhecimento da porcentagem de celulose em cada pré-tratamento se obtêm a eficiência para cada isolado nos diferentes substratos (Tabela 5).

Tabela 5: Efeitos dos pré-tratamentos e isolados de basidiomicetos na porcentagem de hidrólise de carboidratos de biomassa florestal. PT 1 – hexano:etanol (1:1), com NaOH 10%; PT 2 - licor verde; PT 3 - licor verde e etanol (1:1). Effects of pretreatments and basidiomycetes isolates in the percentage of carbohydrates hydrolysis in forest biomass. PT 1 – hexane:ethanol (1:1), with NaOH 10%; PT 2 – green liquor; PT 3 – green liquor and ethanol (1:1).

Substrato	Isolados				
	<i>Fomitopsis nivosa</i>	<i>Flaviporos venustus</i>	<i>Lentinula boryana</i>	<i>Perenniporia sp.</i>	<i>Polyporus udus</i>
	% de Hidrólise				
SPT	2,46	1,76	2,24	0,90	1,87
PT - 1	1,17	0,35	0,38	0,18	0,25
PT - 2	1,47	0,37	0,31	0,17	0,36
PT - 3	2,14	0,71	0,36	0,16	0,24

Na análise de proteínas totais, pelo método de KJELDAHL, não foi possível realizar a quantificação. Possivelmente, a concentração de proteínas, e conseqüentemente de enzimas, nos extratos foram inferiores a detecção do método.

O extrato enzimático que apresentou o melhor rendimento foi o do basidiomiceto *Fomitopsis nivosa*, este extrato apresentou-se bastante viscoso e com uma forte cor amarelada, diferente dos demais. Durante a filtração após a fermentação observou-se também que o micélio do fungo estava danificado, levantando a hipótese de que tenha ocorrido a liberação de enzimas intracelulares. Contudo a taxa de conversão deste isolado comparada às outras encontradas destaca este fungo na hidrólise de celulose.

Lee *et al.* (2008) realizaram um trabalho com enzimas isoladas de fungos da podridão marrom em biomassa lignocelulósica de *Pinus densiflora* pré-tratada biologicamente. Eles utilizaram Avicel como fonte de

carbono, durante a fermentação. Os períodos de fermentação e de hidrólise foram de 21 dias e 48 horas, respectivamente. O melhor resultado obtido por eles utilizando um pool de enzimas hidrolíticas destes isolados foi de aproximadamente 11,23% de conversão de celulose cristalina em açúcares redutores, sendo que o açúcar mais abundante foi a glicose, em torno de 70%.

Tendo em vista os estudos de Lee et al. (2008) pode-se apontar algumas hipóteses quanto aos baixos rendimentos encontrados neste trabalho. A grande diferença entre os tempos de fermentação dos dois trabalhos pode ser um parâmetro significativo nos baixos resultados encontrados. Visto que o principal problema encontrado foi a baixa produção enzimática, o que indica ou uma deficiência do sabugo de milho como indutor de produção de celulasas nestes fungos ou um tempo de fermentação inadequado.

CONCLUSÕES

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é um desafio em termos de viabilidade econômica. Neste trabalho não foi possível nem confirmar nem descartar a eficiência dos isolados estudados. Os baixos rendimentos encontrados direcionam para a otimização dos parâmetros para testar novas tecnologias.

REFERENCIAS

BRASIL, Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

ERIKSSON, K.E.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P (eds). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin, 1990.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, 36, p. 2086 – 2097, 2008

LEE, J.W.; KIM, H.Y.; KOO, B.W.; CHOI, D.H.; KWON, M.; CHOI, I.G. Enzymatic Saccharification of Biologically Pretreated *Pinus densiflora* Using Enzymes from Brown Rot Fungi. **J. Bioscience and Bioengineering**, 102, n. 2, p. 162-167, 2008.

MCMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass..In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292–324, 1994.

UNICA, 2008. Statistics of sugarcane sector—season 2006/ 2007. Accessed on January 2008. Available at [/http://www.portalunica.com.br/portalunica/files/referencia_estatisticas_producaoabrasil-9-Tabela.xlsS](http://www.portalunica.com.br/portalunica/files/referencia_estatisticas_producaoabrasil-9-Tabela.xlsS)

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION (EIA - Official Energy Statistics from the US Government), 2008. Oxygenate production. Accessed on January 2008. Available at [/http://tonto.eia.doe.gov/dnav/pet/hist/m_epooxe_yop_nus_1m.htmS](http://tonto.eia.doe.gov/dnav/pet/hist/m_epooxe_yop_nus_1m.htmS).

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83, p. 1–11, 2002.

SCHLITTLER, L.A.F.S.; PEREIRA FILHO, N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicas: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Diálogos & Ciência**, Ed. FTC, 6, p. 23, 2008.