

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Pré-tratamento biológico de bagaço de cana-de-açúcar por diferentes espécies de basidiomicetos visando aumento da eficiência na hidrólise enzimática

Caroline Hartmann<sup>1</sup>, Roselei C. Fontana, Simone Mendonça<sup>2</sup>; Félix Gonçalves de Siqueira<sup>2</sup> e Marli Camassola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia – Laboratório de Enzimas e Biomassa  
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS - E-mail: mcamasso@ucs.br

<sup>2</sup>Embrapa Agroenergia, Laboratório de Processos Bioquímicos, Asa Norte, Brasília, DF.

#### RESUMO

*Bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um resíduo produzido em grande quantidade no Brasil, do qual pode ser obtido etanol. Nesse processo há a necessidade de aumentar o rendimento na etapa de hidrólise enzimática (HE), dificultada pela barreira física causada pela associação dos componentes da biomassa. Pré-tratamentos visam eliminar essa barreira estrutural; entre esses, destaca-se o pré-tratamento biológico (PTB) no qual se utilizam microrganismos para desconstruir parcialmente as estruturas lignocelulósicas. Avaliou-se o efeito do PTB, por diferentes espécies de basidiomicetos, sobre o processo de HE. PTB realizados com Pleurotus pulmonarius PS 2001, Trametes sp. 8216 e Pleurotus albidus 88F-13 promoveram aumento na obtenção de glicose a partir do BCA. Destacou-se PTB realizado com Trametes sp. 8216, visto que em 24h de hidrólise de amostra com 21 dias de PTB, obteve-se quantidade de glicose estatisticamente superior ao controle (respectivamente, 70,9±8,3 e 48,5±2,38mg/g). Demonstrou-se que essas espécies têm potencial de utilização em PTB.*

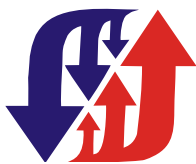
**Palavras-chave:** biomassa lignocelulósica, bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratamento biológico, basidiomicetos, hidrólise enzimática, etanol.

#### INTRODUÇÃO

O Brasil produz uma grande quantidade de bagaço de cana-de-açúcar (BCA), resíduo da extração do caldo de cana-de-açúcar nas indústrias sucroenergéticas. Este resíduo lignocelulósico pode ser utilizado na produção de etanol celulósico ou de segunda geração, sendo esta uma alternativa sustentável (Lynd *et al.*, 2008; Bussamra *et al.*, 2015).

Contudo, ainda há desafios a serem superados em todas as etapas do processo para que a produção seja economicamente viável. A etapa de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas tem como maior desafio a elaboração de mecanismos capazes de desconstruir a barreira estrutural causada pela lignina e pela recalcitrância da celulose. Assim, antes da HE há a necessidade de realizar-se o pré-tratamento da biomassa vegetal, a fim de expor os polissacarídeos estruturais presentes na matriz vegetal à ação das enzimas hidrolíticas (Larran *et al.*, 2015).

Uma vez que os métodos físicos, químicos e físico-químicos de pré-tratamentos requerem maior demanda energética, altos custos de reagentes e tratamento dos efluentes residuais - além de formarem compostos inibidores das etapas de hidrólise e fermentação - tornam-se ambientalmente desvantajosos. Uma alternativa a esses processos é o pré-tratamento biológico, sendo esse um processo sustentável (Gupta & Verma, 2015). O PTB consiste na deslignificação da biomassa lignocelulósica por enzimas produzidas por



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

microrganismos, especialmente fungos filamentosos, desconstruindo parcialmente as estruturas da lignina, celulose e hemicelulose da parede celular vegetal, facilitando assim a ação das enzimas utilizadas na etapa de HE, não havendo a necessidade do uso de químicos ou altos gastos energéticos (Singh *et al.*, 2008). Os fungos da classe Basidiomycetes são conhecidos como agentes lignocelulolíticos capazes de decompor uma série de compostos orgânicos persistentes, tais como a lignina (Tuomela *et al.*, 2000). Deste modo, conhecer a fisiologia, genoma, proteoma, transcriptoma e metaboloma dos macrofungos descritos como basidiomicetos gera-se um nicho de estudo muito vasto, visto que estes microrganismos são deslignificadores por sua própria natureza biológica (Alvira *et al.*, 2010). Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do PTB de BCA, utilizando basidiomicetos, sobre a etapa de HE.

### MATERIAL E MÉTODOS

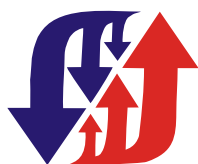
**Microrganismos:** as linhagens de basidiomicetos utilizados foram *Pleurotus pulmonarius* PS2001, *Trametes* sp. 82I6, e *Pleurotus albidus* 88F-13, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa da Universidade de Caxias do Sul. As linhagens foram mantidas em meio de serragem, descrito por Rosa (2013).

**PTB:** o cultivo dos basidiomicetos, aqui denominado de pré-tratamento biológico (PTB), foi realizado utilizando BCA previamente seco e moído, acrescido de farelo de trigo 2,5% (m/v), carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub> 1% (m/v)) e umidade foi ajustada em torno de 70%, conforme descrito por Tan & Wahab (1997), com modificações. A biomassa vegetal (meio de cultivo) foi acondicionada em sacolas de polietileno com dimensões de 13×18 cm com um cilindro (1,5 cm de diâmetro e 4 cm de comprimento) vedado com gaze e algodão acoplado na parte superior (aeração). Cada sacola de polietileno continha 20 g do meio de cultivo, que foram esterilizados em autoclave por uma hora. Os tratamentos de BCA (cada sacola) esterilizados receberam um disco de massa micelial (1,5 cm de diâmetro) como inóculo. Cada basidiomiceto foi considerado como um pré-tratamento, realizados com 3 repetições biológicas para cada tempo de amostragem, que foram: 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias.

**HE:** a hidrólise enzimática (HE) foi realizada por meio da utilização do complexo enzimático de *Penicillium echinulatum* - composto majoritariamente por endoglicanases, celobiohidrolases e β-glicosidases - produzido no Laboratório de Enzimas e Biomassa (IB-UCS). A HE foi conduzida em frascos Duran<sup>®</sup> de 50 mL, contendo 5% (m/v) de biomassa pré-tratada biologicamente pelos basidiomicetos. A carga enzimática foi de 20 FPU/g de biomassa seca (FTB), suspensos em tampão citrato 50 mmol/L com pH ajustado em 4,8, que foi adicionado até atingir o volume final de 50 mL. Os frascos foram mantidos a 50°C, sob agitação recíproca de 150 rpm, por 24 h. A HE do FTB ocorreu de acordo o tempo de amostragem do cultivo dos basidiomicetos. Como controle, foi realizada HE de BCA *in natura*, sob as mesmas condições. As amostras do hidrolisado para determinação de glicose foram coletadas nos intervalos de tempo: 0, 6, 12 e 24h. O volume de 1 mL foi retirado em cada tempo de amostragem, centrifugado e congelado para posteriores análises. As HE das biomassas de bagaço PTB foram realizadas em triplicata

**Metodologia analítica:** a glicose presente no hidrolisado foi quantificada por kit de glicose PAP Liquiform, Labtest<sup>®</sup>, utilizando 2 µL de amostra e 200 µL de reagente.

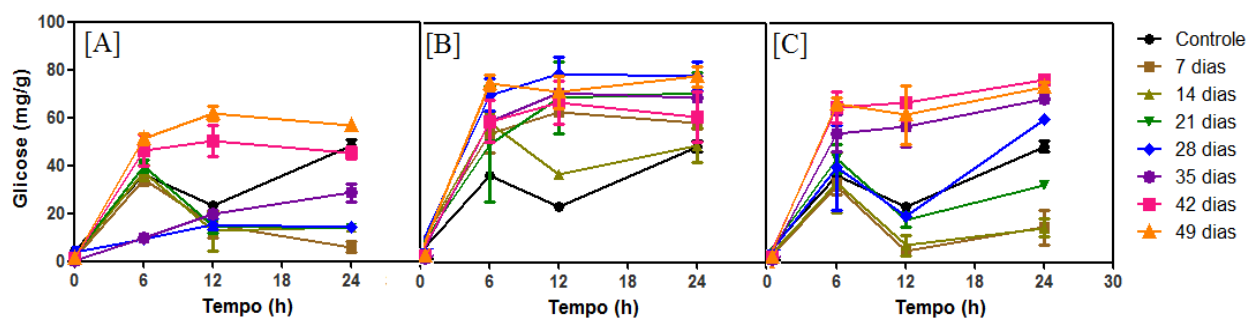
**Análise estatística:** os dados obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e comparados com teste de médias de Tukey, com intervalo de confiança p≤0,05, usando o programa GraphPadPrism<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, USA).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os PTB de BCA favoreceram a etapa posterior de HE. Na Figura 1 verifica-se os resultados da HE, onde observou-se a despolimerização da celulose presente nos BCA - após PTB por *P. albidus*, *Trametes sp* e *P. pulmonarius* - em glicose, em função do tempo de HE.

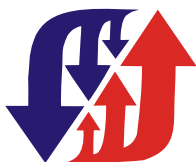


**Figura 1** – Concentração de glicose liberada durante HE de amostras de BCA após PTB por *Pleurotus albidus* 88-F13 [A]; *Trametes sp.* 82I6 [B] e *Pleurotus pulmonarius* PS2001 [C].

Para os microrganismos *Pleurotus albidus* 88-F13 e *Pleurotus pulmonarius* PS2001, respectivamente, nos primeiros 35 e 28 dias de PTB, observou-se diminuição da liberação de glicose em relação ao controle. Somente em tempos superiores de PTB houve incremento na digestibilidade da biomassa (Figura 1 A e C). Provavelmente, nos primeiros dias de PTB estes microrganismos consumiram os polissacarídeos acessíveis da biomassa. Após o possível esgotamento destes açúcares, observou-se o pico de atividade de lacases e peroxidases totais em 35 dias de processo (dados não mostrados), o que sugere degradação da lignina, justificando o melhoramento no processo de hidrólise em tempos superiores. De acordo com Leisola *et al.* (2012) a lignina é degradada somente após o esgotamento de nutrientes, o que desencadeia o metabolismo secundário do microrganismo. Já em PTB realizado com *Trametes sp.* 82I6, observou-se aumento na liberação de glicose em relação ao controle, desde os primeiros dias de PTB (Figura 1 B). Para esta espécie, atividades de lacases e peroxidases totais foram mensuradas a partir de 7 dias de PTB (dados não mostrados).

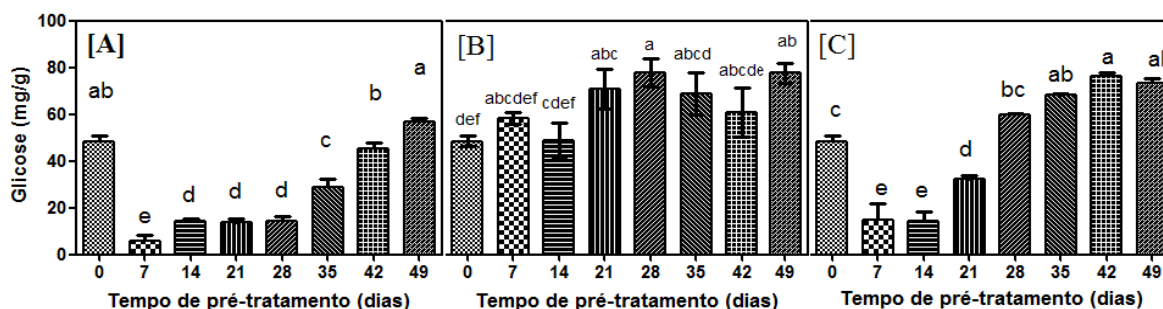
Estas espécies apresentaram altas atividades de lacases e peroxidases totais (dados não mostrados). Estes dados corroboram os obtidos por Salvachúa *et al.* (2011), que realizaram *screening* de fungos basidiomicetos a fim de selecionar espécies com potencial de aplicação em pré-tratamento biológico de palha de trigo e observaram que as espécies que apresentaram atividades de lacases mais elevadas, promoviam maiores rendimentos em açúcares fermentescíveis na etapa de hidrólise.

Na Figura 2 é mostrada análise estatística da liberação de glicose em 24h de HE a partir de amostras PTB por diferentes tempos. Nas HE realizadas com BCA pré-tratado por *P. albidus* 88-F13, observou-se que nas amostras pré-tratadas por 42 e 49 dias, a liberação de glicose foi estatisticamente igual ao controle ( $48,5 \pm 2,38$  mg/g), respectivamente  $45,4 \pm 2,6$  e  $56,7 \pm 1,7$  mg/g. Porém, observou-se tendência de aumento na obtenção de glicose com o aumento do tempo de PTB, o que pode indicar a necessidade de testes com amostras pré-tratadas por maiores períodos de tempo (Figura 2A). A partir de BCA pré-tratado por *P. pulmonarius* PS2001 foram obtidas quantidades de glicose estatisticamente superiores ao controle em amostras com tempos de PTB de 35, 42 e 49 dias (respectivamente,  $68,4 \pm 0,7$ ,  $76,3 \pm 1,6$  e  $76,5 \pm 2,1$  mg/g) (Figura 2C). A partir da biomassa pré-tratada por *Trametes sp.* 82I6, observou-se que amostras com tempos de PTB de 21, 28 e 49 dias, liberaram



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

quantidades de glicose estatisticamente superiores ao controle (respectivamente,  $70,9 \pm 8,3$ ,  $77,8 \pm 5,8$  e  $77,6 \pm 4,2$  mg/g) (Figura 2B).



**Figura 2.** Concentração de glicose liberada após 24h de HE de amostras de BCA após diferentes tempos de PTB por *Pleurotus albidus* 88-F13 [A]; *Trametes sp.* 82I6 [B] e *Pleurotus pulmonarius* PS2001 [C].

Ressalta-se que diminuir o tempo de processo é um dos fatores que interfere diretamente na produtividade e no custo final de um produto. Diminuir o tempo do PTB é o principal desafio para esta área. Desta forma, entre os microrganismos que se mostraram eficientes no PTB, destaca-se o da espécie *Trametes sp.* 82I6, visto a partir do 21º dia de cultivo promoveu maior liberação de glicose a partir do BCA em relação ao controle.

### CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que as espécies *P. pulmonarius* PS2001, *Trametes sp.* 82I6 e *P. albidus* 88F-13 tem potencial de utilização como agentes biológicos em PTB de biomassas vegetais como o BCA, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis após HE.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.*, 101(13):4851-4861.
- Bussamra, B. C., Freitas, S., da Costa, A. C. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. 2015. *Bioresource Technology*, 187:173-181.
- Gupta, A.; Verma, J. P. 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 41(0):550-567.
- Lynd, L.R.; Laser, M.S., Bransby, D., Dale, B.E., Davison, B., Hamilton, R., Himmel, M.; Keller, M.; McMillan, J.D.; Sheehan, J.; Wyman, C.E. How biotech can transform biofuels. 2008. *Nature Biotechnol.*, 26(2):169-172.
- Larran, A., Jozami, E., Vicario, L., Feldman, S. R., Podestá, F. E., Permingeat, H. R. Evaluation of biological pretreatments to increase the efficiency of the saccharification process using *Spartina argentinensis* as a biomass resource. 2015. *Bioresour. Technol*, 194:320-325.
- Leisola, M.; Pastinen, O.; Axe, D.D. 2012. Lignin - Designed Randomness. *Bio-complexity*, 2012.
- Rosa, I. O. Levantamento de macrofungos (filo *Basidiomycotina*, subfilo *Agaricomycotina*) do nordeste do Rio Grande do Sul e avaliação do seu potencial ligninolítico. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á. T., Martínez, M. J. 2011. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.*, 102(16):7500-7506.
- Singh, P; Suman, A.; Tiwari, P.; Arya, N.; Gaur, A.; Shrivastava, A. K., 2008. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(5):667-673.
- Tan, Y.; Wahab, M. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. 1997. *World J. Microb. Biot.*, 13(6): 613-617.
- Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itävaara, M. 2010. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour. Technol.*, 72(2):169-183.