

# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## Pré-Tratamento Enzimático de Resíduos Lignocelulósicos para Sacarificação

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

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Depto. Acadêmico de Química e Biologia  
81280-340 Curitiba – PR - E-mail: jessie\_matei@hotmail.com

<sup>2</sup>Empresa 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 celulases. 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.*

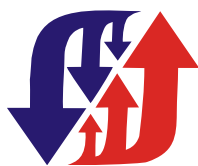
Palavras-chave: Etanol de Segunda Geração. Hidrólise Enzimática. Pré-Tratamento Biológico. Resíduos Lignocelulósicos.

### 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

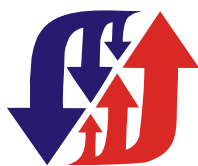
A primeira etapa do trabalho envolveu a produção de extratos enzimáticos brutos ricos em lacase, a qual foi realizada em cultivo líquido estático utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*. O meio utilizado para produção da enzima foi composto por glicose (10 g L<sup>-1</sup>), fosfato de potássio monobásico (3 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio heptahidratado (1,5 g L<sup>-1</sup>), peptona (0,5 g L<sup>-1</sup>), 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

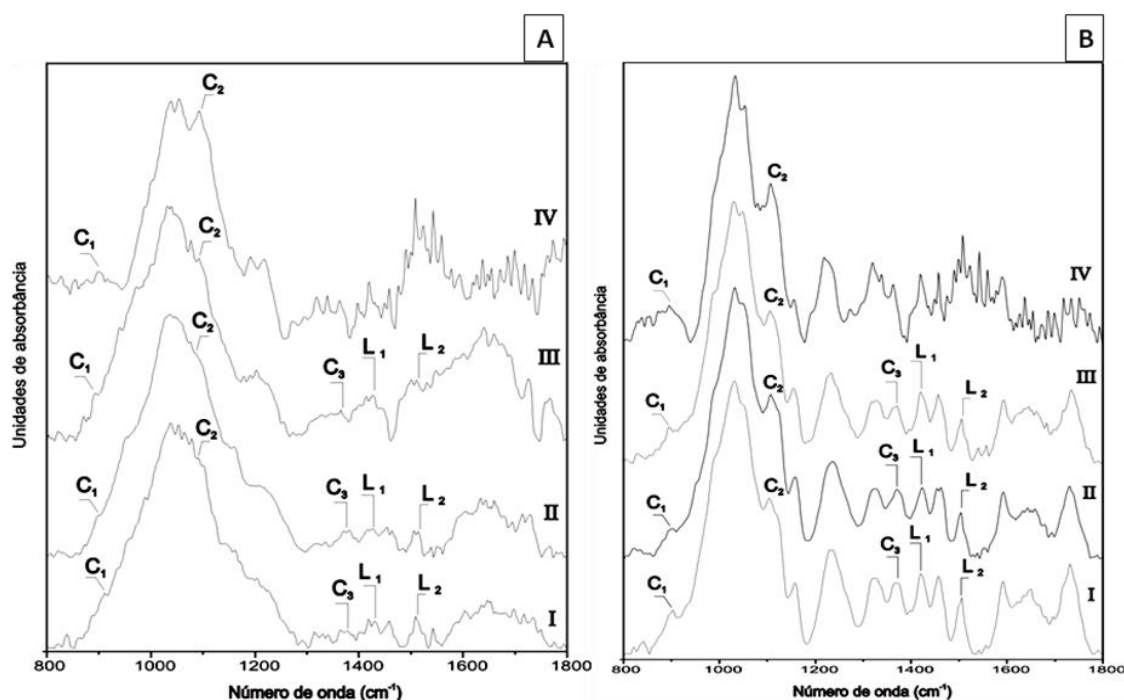


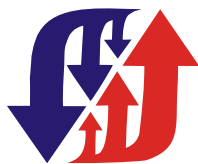
Figura 1. (A) Espectros de infravermelho para casca de arroz e (B) Espectros de infravermelho para eucalipto urofila; onde: I – in natura; II – tratamento com lacase desnaturada e ácido ferúlico; III – tratamento com lacase e siringaldazina; IV – tratamento com lacase e ácido 4-hidroxibenzóico; C1, C2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