

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS LIGNINOLÍTICOS ÚTEIS PARA O PRÉ TRATAMENTO BIOLÓGICO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR: CONTRIBUIÇÕES PARA A OBTENÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

Miguel Leal Neto (PIBIC/CNPq-UEM), Leonardo Corrêa Bertonha, Caio Tetsuo Moriyama, Ana Julia dos Reis Buzzo, Rafael Castoldi e Rosane Marina Peralta (Orientadora), e-mail: rosanemperalta@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

Bioquímica / Bioquímica dos Microrganismos

Palavras-chave

Bagaço-de-cana, Lacase, *Oudemansiella canarii*.

Resumo

Resíduos agroindustriais são fontes de polissacarídeos que podem ser hidrolisados e fermentados para a obtenção de combustíveis, incluindo o etanol de segunda geração. Pré-tratamentos que possibilitem a redução da lignina são fundamentais para uma sacarificação eficiente. O presente trabalho teve por objetivo prospectar fungos produtores de enzimas ligninolíticas (lacases e peroxidases). Extratos brutos de *Oudemansiella canarii* ricos em lacase foram utilizados no pré- tratamento de bagaço de cana. A sacarificação do bagaço de cana tratado com lacase foi realizada utilizando-se o coquetel enzimático comercial Cellic CTec2+HTec2[®] da Novozymes. Após 48 h foram obtidos 0,35 g/g de açúcares redutores e 0,21 g/g de glicose na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com lacase de *O. canarii*. Quando se utilizou no pré-tratamento o extrato enzimático desnaturado, foram obtidos 0,033 g/g de açúcares redutores e 0,017 g/g de glicose. Estes dados sustentam o uso da lacase bruta de *O. canarii* no pré-tratamento do bagaço de cana visando a sua sacarificação.

Introdução

A crise energética vem atingindo setores importantes da economia global, forçando a busca por tecnologias sustentáveis de produção de combustíveis renováveis. Uma alternativa encontrada é a utilização de biomassa lignocelulósica como fonte de açúcares fermentescíveis. Um dos grandes gargalos ainda é o pré tratamento que visa reduzir o teor de lignina das fibras, favorecendo a posterior sacarificação. Diversos métodos físicos, químicos e biológicos visando reduzir a quantidade de lignina para tornar mais acessível os componentes celulose e hemicelulose à hidrólise vem sendo investigados.

O uso de enzimas oxidativas de fungos ligninolíticos (lacases e peroxidases) capazes de degradar a lignina encaixa-se dentro do contexto de pré-tratamentos biológicos e são menos poluentes, requerendo um gasto energético menor que os métodos físicos e químicos (COUTO; SANROMÁN,

2005; FARINAS, 2015). As lacases (EC. 1.10.3.2) são fenol-oxidases que catalisam a redução de oxigênio molecular a água pela retirada de um elétron do substrato aromático. Lacases fúngicas tem sido consideradas como hábeis em modificar e/ou degradar a lignina dos materiais lignocelulósicos. O presente trabalho teve como objetivos bioprospectar fungos produtores de enzimas ligninolíticas e aplicar seus extratos enzimáticos no pré-tratamento do bagaço de cana para aumentar a sacarificação posterior utilizando um coquetel enzimático comercial.

Materiais e métodos

Na primeira etapa do trabalho, avaliamos a capacidade de vários basidiomicetos produzirem as enzimas lacase, Mn peroxidase e lignina peroxidase. Os cultivos em estado sólido foram realizados em frascos de 250 ml aos quais se adicionaram 3,5 g de bagaço-de-cana (obtidos da Usina Santa Terezinha, Iguatemi, PR), 1,0 g de farelo de trigo, 0,020 g de extrato de levedura e 20 mL de solução mineral de Vogel. As misturas foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos. Os isolados mantidos em tubos foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), ou em meio de Farelo de Trigo 2%, durante 5 a 7 dias para crescimento radial e obtenção de culturas jovens. As culturas foram mantidas em estufa a 28 °C e interrompidas periodicamente para extração das enzimas de interesse. Os cultivos foram interrompidos adicionando-se 20 mL de água destilada a cada frasco, que deixados estacionários por 30 min. As misturas foram filtradas em gaze e submetidas à centrifugação (8000 rpm por 10 minutos). Os sobrenadantes foram considerados como sendo os extratos enzimáticos brutos. Os EEB foram avaliados quanto a atividade de celulase e xilanase, utilizando o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (MILLER, 1959) e as enzimas ligninolíticas lacase, peroxidase dependente de manganês e lignina peroxidase conforme previamente descrito (MOTA et al., 2015).

Na segunda etapa do trabalho, utilizou-se bagaço de cana seco a 40 °C até atingir peso constante e triturado a 50 mesh. Experimentos para avaliar o efeito do extrato enzimático de *O. canarii* sobre o bagaço-de-cana foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 500 mg do bagaço-de-cana, 9 mL do extrato bruto rico em lacase de *O. canarii* e tampão acetato pH 5,0 na concentração final de 50 mmol/L. Após cada um dos 4 ciclos de pré-tratamento (24 h de agitação, 120 rpm e 28 °C), as biomassas foram filtradas com auxílio de bomba a vácuo e a parte insolúvel foi lavada até atingir pH 7,0. Em seguida, foram secas em estufa a 40 °C até atingir peso constante.

Para a sacarificação, bagaço de cana pré-tratado enzimaticamente (500 mg) foi colocada em frasco Erlenmeyer de 125 mL e adicionados 9 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 e 1 mL de extrato das enzimas comerciais Novozymes Cellic Ctec 2 e Htec 2 na proporção de 9:1 (v/v). As misturas foram mantidas sob agitação de 120 rpm a 42 °C durante 48 horas. Amostras de 500 µL de extrato foram periodicamente retiradas para análises de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (MILLER,

1959) e glicose pelo método da glicose oxidase-peroxidase utilizando kit comercial. As análises foram realizadas em quadruplicata para cada amostra. Os resultados foram expressos com as médias \pm desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada no software Graphpad.

Resultados e Discussão

Os fungos avaliados quanto a produção de enzimas ligninolíticas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos.

Fungos	Origem	Ativ Lacase	Ativ Mn Perox	Ativ Lign Perox
1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	CCB	***	*	*
2 <i>Phelinus linteus</i> EF 81	EF	-	-	-
3 <i>Pleurotus djamor</i> EF 86	EF	*	-	-
4 <i>Picnoporus</i> sp	LBM	-	*	-
5 <i>Oudemansiela canarii</i> EF 72	EF	***	***	*
6 <i>Xylaria globosa</i> EF 104	EF	-	*	-
7 <i>Inonotus splitgerber</i> EF 46	EF	-	-	-
8 <i>Pleurotus albidus</i> EF 84	EF	-	-	-
9 <i>Hydnopoliporus fimbriatus</i> EF 41	EF	-	-	-
10 <i>Hydnopoliporus fimbriatus</i> EF 44	EF	-	-	-
11 <i>Dyctiophoro indusiata</i>	LBM	-	-	-
12 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ATCC 24725	-	-	-
13 <i>Periniporia</i> sp EF 79	EF	-	-	-
14 <i>Flaviporus venustus</i> EF 30	EF	-	-	-
Legenda				
EF = Embrapa Floresta, Colombo-PR				
CCB = Instituto Botânico SP				
LBM = Lab Bioquímica de Microorganismos - UEM				

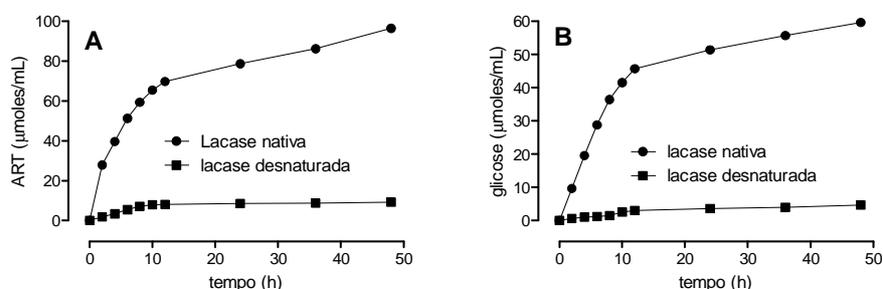
* para pequena atividade enzimática; *** para maior atividade enzimática; - sem atividade

Analisando os extratos obtidos com o cultivo desses fungos nos tempos apresentados, notou-se que o *P.ostreatus* e *O.canarii* demonstraram serem promissores na produção de enzimas ligninolíticas. Pelo fato do primeiro já ser estudado, neste trabalho optou-se por aplicar os extratos de *O. canarii* no pré-tratamento do bagaço de cana. Os extratos apresentaram atividade de CMCase 0,12 U/mL, xilanase 0,37 U/mL e lacase 6,2 U/mL. Nas condições utilizadas neste trabalho, não foram detectadas as enzimas lignina peroxidase e peroxidase dependente de manganês.

Após o pré-tratamento do bagaço de cana com o extrato de *O. canarii*, as frações de hemicelulose e celulose ficaram mais expostas ao ataque das enzimas hidrolíticas CTec2+HTec2 conforme apresentados na Figura. 2. Após 48 h de sacarificação, do bagaço pré-tratado com a lacase de *O. canarii*, foram obtidos 96.44 μ moles/mL de açúcares redutores e 57,86 μ moles/mL de glicose. Por outro lado, quando se utilizou o extrato de *O.*

canarii desnaturado por fervura, foram obtidos 9,19 $\mu\text{moles/mL}$ de açúcares redutores e 4,68 $\mu\text{moles/mL}$ de glicose.

Figura 2 – Sacarificação de bagaço de cana de açúcar.



O bagaço de cana de açúcar foi pré-tratado com lacase bruta de *Oudemansiella canarii* nativa e desnaturada e sacarificados utilizando o coquetel enzimático comercial Cellic CTec2+HTec2[®] da Novozyme. Em A: ART= açúcares redutores totais; Em B: glicose.

Conclusões

Dos catorze fungos Basidiomicetos bioprospectados, *O.canarii* demonstrou grande potencial de produção de enzimas ligninolíticas, com um destaque para a lacase. Os dados obtidos neste trabalho suportam o uso do pré-tratamento enzimático do bagaço de cana com lacase bruta. O extrato do *O. canarii* foi capaz de aumentar a sacarificação e a produção de açúcares fermentescíveis, incluindo glicose.

Agradecimentos

Ao CNPq e a CAPES.

Referências

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production—review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p.211–219, 2005.

Farinas, C.S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

MILLER, G.L. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOTA, T. R. et al. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* laccase: Evaluation of degradation products and toxicity. **Water, Air, Soil and Pollution**, v. 226, p. -351-362, 2015.