

EFEITO DA REDUÇÃO DA LIGNINA NO PRÉ-TRATAMENTO DE MANIPUEIRA COM O FUNGO *PHANEROCHAETA CHRYSOSPORIUM*

Eduarda Pinheiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM)¹, Andressa Pilonetto (PIBIC/CNPq/FA/UEM)¹, Gabriela Bataglini Araujo (PEQ/UEM)², Daniel Tait Vareschini (Orientador DEQ/UEM)². E-mail: dtvareschini@uem.br

¹Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Maringá, PR.

²Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Maringá, PR.

Engenharia Química / Processos Biotecnológicos

Palavras-chave: Lignina, Mandioca, Biotecnologia.

RESUMO

Para o aproveitamento de resíduos de biomassa vegetal como matéria prima para diversos bioprodutos, é preciso romper as rígidas barreiras lignocelulósicas das células vegetais, que impedem a ação de microrganismos que poderiam convertê-lo em subprodutos desejados. Os pré-tratamentos biológicos por fungos podem degradar as estruturas lignocelulósicas para permitir que outros microrganismos atuem. Sendo assim, o estudo foi realizado para investigar o potencial de degradabilidade da manipueira, resíduo de processo de indústrias de fecularias locais, pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, como forma de pré-tratamento da amostra para utilização como substrato na produção de biocombustíveis. O material residual final foi submetido à análise do teor de lignina, pelo método de lignina solúvel em brometo de acetila. Os resultados indicam uma redução parcial do teor de lignina.

INTRODUÇÃO

Biocombustível é todo combustível que utiliza como fonte matéria orgânica, por processo de combustão ou fermentação, podendo ser encontrado na forma de gás, líquido e sólido. A biomassa, além de ser uma fonte renovável, possui um alto poder energético, é menos poluente e pode substituir de forma gradual a utilização de combustíveis fósseis (AHMAD et al., 2018). Em geral a biomassa pode ser degradada por microrganismos decompositores. No entanto, para maior eficiência da digestão microbiana é preciso facilitar o acesso aos substratos que em geral estão envoltos por uma barreira lignocelulósica (AHMAD et al., 2020). Em média os resíduos lignocelulósicos são compostos majoritariamente por quantidades significativas de celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%), e lignina (5-30%), que juntos formam uma barreira recalcitrante de difícil acesso (KASSAYE et al., 2016). A manipueira, obtida do processamento industrial da raiz da mandioca, comumente

utilizado por pequenos produtores como fonte de matéria orgânica natural para adubação, possui grande potencial tóxico (LOKMAN, et al. 2021), o que a torna um problema, caso esse resíduo seja disposto no ambiente de forma incorreta e venha atingir corpos hídricos. Devido a quantidades elevadas de matéria orgânica o resíduo de manipueira pode ser utilizado para produção de biocombustíveis por digestão anaeróbia, no entanto, existe a necessidade de uma pré-digestão da camada lignocelulósica. Uma alternativa viável, tem sido a utilização de microrganismos que degradam a estrutura da parede celular da manipueira, graças às enzimas liberadas no meio extracelular, um desses microrganismos são os fungos *Phanerochaete chrysosporium*. Portanto, este trabalho teve como objetivo a análise do potencial de redução de lignina do resíduo de manipueira através da aplicação de pré-tratamento biológico utilizando fungos *Phanerochaete chrysosporium*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esporos do fungo *Phanerochaete chrysosporium* foram cultivados em meio de ágar batata, a (28°C) e repicados por 2 semanas. Após o crescimento foi preparada uma solução salina na concentração de 10^6 esporos/mL (contagem em câmara de Neubauer).

As amostras de manipueira foram coletadas por amostragem estatística aleatorizada em uma fecularia industrial situada na cidade de Amaporã, Paraná - Brasil. O material foi triturado, gerando partículas grossas (< 5 mm), que foram secas em estufa e esterilizadas em autoclave. Da matéria seca foram pesados 3g de material e adicionados a 61 erlenmeyers esterilizados, destes, 31 receberam 7 mL de solução salina de esporos previamente preparada, os outros 30, receberam 7 mL de água esterilizada. Os erlenmeyers foram identificados como T para os de tratamento e M para os da manipueira pura. Controle identificado como T- 0. Na sequência foram cultivados em estufa (28°C) por 10 dias. Sendo T-0 e M-0 armazenados diretamente em freezer para manter as características originais do material. Diariamente triplicatas dos dois grupos T e M foram retirados do cultivo e armazenados em freezer para preservação das características e estagnação do crescimento fúngico.

Para análise de lignina realizou-se a secagem em estufa das amostras e moagem em um moinho de bolas (30 segundos) para particulação do material entre 0,149 e 0,053 milímetros. Os resíduos secos foram armazenados em estufa a 60°C. Depois da secagem completa, foram pesadas 0,06g de cada amostra e adicionadas em eppendorfs de 2 mL, e foram adicionados os reagentes, homogeneizados e centrifugados entre cada adição (3600 x g) durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As lavagens realizadas seguiram a seguinte ordem de procedimento:

- 5 lavagens com 1,5 mL de tampão fosfato para a extração de proteínas solúveis;
- 5 lavagens com 1,5 mL de triton X-100 para quebra de interações hidrofóbicas;
- 10 lavagens com 1,5 mL de cloreto de sódio para extração de proteínas ligadas;
- 10 lavagens com 1,5 mL de água destilada para eliminação dos íons $\square\square^+$ e $\square\square^-$;

- 2 lavagens com 1 mL de acetona para lipossolubilização e desidratação.

O precipitado final foi transferido para a estufa (60°C) por 3-5 horas e a massa seca obtida foi definida como a fração de parede celular isenta de proteínas (PCIP). Foi realizada a preparação da solução 25% de brometo de acetila para a execução do procedimento e resfriado, sendo adicionados 0,5 mL em cada amostra. Os frascos foram mantidos em banho termostático (70 °C) com intervalo de tempo entre eles de 49 segundos para garantir o tempo de manuseio e o intervalo constante entre os tempos de reação de cada tubo. Após a retirada, os frascos foram resfriados em banho de gelo. Para o interrompimento da reação, foram adicionados 0,9 mL de NaOH e 0,1 mL de hidroxilamina- HCl (7,5 M). Para a diluição da lignina adicionou-se 6 mL de ácido acético. Os tubos foram centrifugados (1400xg por 5 min) e o sobrenadante diluído foi analisado no espectrofotômetro na frequência de 280 nm. A concentração da lignina foi determinada de acordo com curva padrão obtida e expressa em mg de lignina g-1 de PCIP

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase inicial o desenvolvimento dos microrganismos no substrato de manipueira foi avaliado a partir da formação de hifas visíveis a olho a partir do 4 dia de tratamento.

Os resultados obtidos do processo de quantificação da lignina residual após o tratamento biológico com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, são apresentados no Gráfico 1.

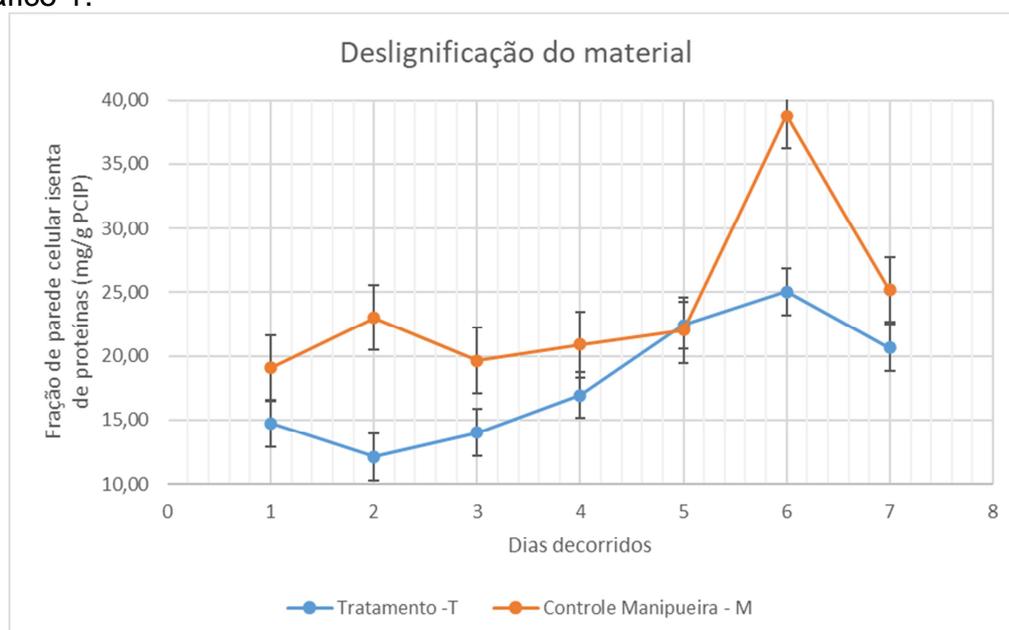


Gráfico 1 - Fração de parede celular isenta de proteínas em relação ao tempo de tratamento utilizando esporos fungicos de *Phanerochaete chrysosporium*

Os resultados indicam que a fração de parede celular isenta de proteínas (mg/g PCIP) do grupo tratado apresentou redução em relação ao grupo de controle da manipueira. Um resultado adverso mostrou um aumento da lignificação das amostras dos dois grupos com o tempo, isso pode indicar alguma interação entre o fungo e o material que interferiu nos resultados.

CONCLUSÕES

Já foi demonstrada a eficiência do pré-tratamento biológico como alternativa e/ou associação em outros processos biotecnológicos como produção de biogás e tratamento de água contaminada. Após a análise dos resultados obtidos, foi possível visualizar que apesar dos resultados positivos entre a diferença de lignificação dos grupos de tratamento e de controle, sendo que o grupo tratamento obteve redução de fração de parede celular isenta de proteínas (mg/g PCIP) em relação ao grupo de controle de manipueira, ainda houveram interferências de origem desconhecida no resultado obtido, levando os dois grupos a apresentarem aumento progressivo de PCIP ao longo dos dias, tal interferência poderia ter sido ocasionada por regentes contaminados, moagem incorreta ou número de lavagem de paredes menor do que o necessário.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Wanderley Dantas dos Santos e a Prof^a. Andressa Domingos Polli, por disponibilizar os respectivos laboratórios: Bioquímica de Plantas (Departamento de Bioquímica) e Biotecnologia Microbiana (Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular). Ao CNPQ e a Fundação Araucária pelo incentivo à pesquisa.

REFERÊNCIAS

AHMAD, E. *et al.* Integrated thermo-catalytic reforming of residual sugarcane bagasse in a laboratory scale reactor. **Fuel Processing Technology**, v. 171, p. 277–286, mar.2018.

AHMAD, E. *et al.* Understanding reaction kinetics, deprotonation and solvation of brønsted acidic protons in heteropolyacid catalyzed synthesis of biorenewable alkyl levulinates. **Chemical Engineering Journal**, v. 400, 125916, nov.2020.

KASSAYE, S., PANT, K.K., JAIN, S. Synergistic effect of ionic liquid and dilute sulphuric acid in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Fuel Processing Technology**, v. 148, p. 289–294, jul.2016.

LOKMAN, N. A. *et al.* A brief review on biochemical oxygen demand (BOD) treatment methods for palm oil mill effluents (POME). **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, 101258, fev.2021.