



Pré-tratamento biológico para sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais e produção de açúcares fermentáveis

Tatielle P. Silva¹; Layza S. Santana¹; Hugo J. V. Pereira²

1 Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

2 Universidade Federal de Alagoas

tatielle.pereira@yahoo.com.br

Palavras-Chave: Celulase. *Botrytis ricini*. Biomassa lignocelulósica.

Introdução

As discussões acerca da relevância da sustentabilidade nos processos produtivos, associadas à crescente preocupação com a geração de resíduos agroindustriais, têm ganhado destaque nos últimos anos. Nesse contexto, torna-se cada vez mais importante buscar alternativas capazes de reduzir a dependência de combustíveis fósseis, considerados recursos finitos e associados a diferentes desafios ambientais e econômicos, como a emissão de gases de efeito estufa e os elevados custos (Ferreira et al., 2016). Entre as alternativas disponíveis, os materiais lignocelulósicos destacam-se por constituírem o recurso biorrenovável mais abundante da natureza, apresentarem baixo custo e serem formados principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Esses materiais possuem grande potencial para a obtenção de açúcares fermentáveis destinados à produção de biocombustíveis e de diferentes compostos bioquímicos, que também podem ser empregados como matérias-primas na elaboração de novos materiais (Singh et al., 2017; Kassaye et al., 2017; Guo et al., 2018).

Entretanto, o aproveitamento eficiente dos resíduos lignocelulósicos é dificultado pela complexa estrutura da biomassa, especialmente pela presença da lignina, que constitui uma barreira física e dificulta o acesso à celulose (Volynets et al., 2017). Para superar essa limitação, diferentes métodos de pré-tratamento podem ser empregados com a finalidade de reduzir o conteúdo de lignina e aumentar a acessibilidade da celulose, favorecendo, posteriormente, a hidrólise enzimática realizada por celulasas (Volynets et al., 2017). Esses tratamentos podem envolver a utilização de ácidos, bases e vapor, bem como a associação de diferentes métodos, de acordo com as características da biomassa e os objetivos do processo (Singh et al., 2015).



Dentre as estratégias disponíveis, o pré-tratamento biológico destaca-se pela utilização de microrganismos, principalmente fungos, capazes de promover modificações na estrutura da biomassa lignocelulósica, tornando seus componentes mais acessíveis aos agentes responsáveis pela hidrólise. Diferentemente dos métodos físicos e químicos, essa abordagem não depende de condições severas de temperatura e pressão, tampouco exige necessariamente a utilização de ácidos, bases ou outros agentes químicos reativos. Além disso, apresenta como vantagem a menor formação de compostos indesejáveis que podem atuar como inibidores durante as etapas subsequentes do processo (Madhavan et al., 2017). A ação desses microrganismos está relacionada, principalmente, à produção e secreção de enzimas extracelulares capazes de degradar e remover parte significativa da lignina presente na biomassa, contribuindo para a exposição dos polissacarídeos estruturais (Madhavan et al., 2017; Rastogi e Shrivastava, 2017).

Após o pré-tratamento, a obtenção de açúcares fermentáveis a partir da biomassa lignocelulósica ocorre por meio da hidrólise, também denominada sacarificação, dos polissacarídeos que se tornam mais acessíveis. Durante essa etapa, a celulose é degradada e convertida principalmente em glicose pela ação de enzimas específicas, dentre as quais se destacam as celulasas (Silva et al., 2018).

Diante desse contexto, o presente estudo empregou o pré-tratamento biológico da biomassa lignocelulósica utilizando o fungo endofítico *Botrytis ricini* URM 5627, visando favorecer a sacarificação enzimática e, conseqüentemente, a obtenção de açúcares fermentáveis.

Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados diferentes resíduos industriais, tais como: bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e casca de arroz, para ambos os pré-tratamentos e sacarificação enzimática. Os resíduos foram fornecidos por agroindústrias localizadas na cidade de Maceió (Brasil), os mesmos foram lavados para remover as impurezas e em seguida secas em estufa com circulação de ar (TECNAL) a 50° C por 24 h e trituradas em moinho de lâminas do tipo Wiley (ACB LABOR®) até um tamanho de partícula de 2 mm sendo armazenado em recipiente de plástico até que estivesse pronto para uso.



Para a realização do pré-tratamento biológico, cada frasco erlenmeyer de 150 mL contendo 5g de resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e casca de arroz) foi submetido à esterilização em autoclave vertical a 121°C por 20 min. Foram adicionados ao meio a quantidade de 107 conídios de *Botrytis ricini* URM 5627 por grama de substrato e água destilada estéril até atingir umidade desejada (50%) e incubados em câmara de germinação (SL 222, Solab) com temperatura controlada de 27°C por 24, 48, 96 e 150 horas. Após a fermentação, 50 mL de tampão acetato de sódio (100 mM / pH 5) foram adicionados ao substrato fermentado. A fase líquida foi separada por filtração, seguida de centrifugação (15000g) por 5 minutos para remoção de partículas. A fração líquida foi utilizada para realizar as análises posteriores de AR (açúcar redutor) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) Miller (1959) e dosagem de atividade enzimática de celulase e seus inibidores por HPLC. As frações sólidas foram novamente submetidas à esterilização em autoclave vertical, acondicionadas em estufa a 50°C para secagem e posteriormente utilizadas. As frações sólidas retidas no papel filtro foram lavadas em abundância e acondicionadas em estufa a 50°C para secagem e posteriormente utilizados nas caracterizações e sacarificação.

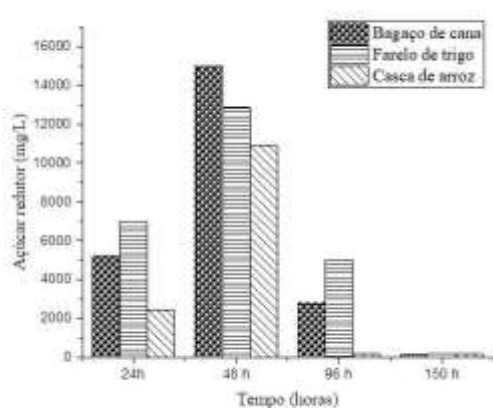
Pra o estudo de sacarificação dos resíduos após as melhores condições de tratamento ácido e biológico, foi utilizado a endoglucanase isolada de *Botrytis ricini* URM 5627 (736,59 U/mL) (Silva et al., 2018). O meio de reação foi constituído por 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM / pH 5), contendo 1% de resíduo. A sacarificação foi realizada em banho 50°C por 6, 12 e 24 h. O controle de cada mistura reacional foi realizado sem a utilização da endoglucanase. Após a sacarificação, os tubos foram centrifugados (HITACHI Rx II series) a 5.000g a 24°C por 3 min, a parte sobrenadante foi utilizada para dosagem dos açúcares redutores pelo método DNS Miller (1959) e identificação dos açúcares fermentáveis produzidos ao final do processo com maior produção de açúcares redutores por HPLC, com detecção por índice de refração (RI). O cromatógrafo em questão estava equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian), injetor manual modelo 80765 (HAMILTON) com loop de 20 µl, detector de índice de refração modelo 356 LC. A coluna cromatográfica empregada para determinação dos produtos foi a 87H (300 mm x 7,8 mm d.i.; MetaCarb), operando nas seguintes condições: temperatura da coluna: 55 °C; a fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico (0,005 mol.L-1) com fluxo de 0,70 mL.min-1.

Resultados e Discussão



O pré-tratamento biológico, utilizando o fungo *Botrytis ricini* URM 5627 foi realizado em diferentes tempos de cultivo sólido (24, 48, 96 e 150 horas) e foram verificados quais eram os maiores teores de açúcar redutor produzido (Figura 1) em cada uma delas. Desta forma, esse foi o critério considerado para seguir as etapas de caracterização do resíduo e sacarificação enzimática. Diante dos resultados, pode-se concluir que a maior obtenção de açúcar redutor para bagaço de cana, farelo de trigo e casca de arroz foi em 48 horas de cultivo sólido (15.000 mg/L, 12.860 mg/L e 10.900 mg/L respectivamente). O pré-tratamento biológico destina-se a melhorar a formação de açúcares fermentáveis, além de prevenir a degradação ou perda de carboidratos e a formação de inibidores, bem como reduzir custo-efetivos (Martín-Sampedro et al., 2015; Alvira et al., 2010).

Figura 1: Perfil do pré-tratamento bilógico em diferentes tempos e a relação com a quantidade de açúcar redutor liberado.



Fonte: elaborado pela autora.



O tratamento biológico é influenciado pelas enzimas produzidas pelo microrganismo empregado no processo, e foi possível observar que no extrato bruto (fração líquida do tratamento) apresenta atividade das enzimas (U/mL) que compõem o complexo celulolítico (fpase, endoglucanase, celobiase, β -glicosidase), demonstrando que a presença dessas é importante para a desconstrução estrutural dos resíduos (tabela 1).

Tabela 1: Atividade enzimática verificada na fração líquida do pré-tratamento biológico de Fpase, endoglucanase, celobiase, β -glicosidase, para observar suas funções na eficiência do tratamento biológico.

Fpase (U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	50,712 $\pm$ 0,9	127,3 $\pm$ 1,1	78,971 $\pm$ 0,8	20,897 $\pm$ 0,91
Farelo de Trigo	41,327 $\pm$ 0,67	116,714 $\pm$ 0,89	63,458 $\pm$ 1,02	25,296 $\pm$ 1,12
Casca de arroz	20,135 $\pm$ 0,35	42,725 $\pm$ 0,93	28,353 $\pm$ 1,17	15,084 $\pm$ 1,13
doglucanase(U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	70,158 $\pm$ 0,38	125,756 $\pm$ 0,27	385,471 $\pm$ 0,93	242,75 $\pm$ 0,97
Farelo de Trigo	50,125 $\pm$ 1,05	80, 935 $\pm$ 0,83	182,75 $\pm$ 0,65	91,376 $\pm$ 0,78
Casca de arroz	30,102 $\pm$ 0,9	50, 605 $\pm$ 0,8	21,605 $\pm$ 0,91	15,014 $\pm$ 0,87
Glicosidase (U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	28,351 $\pm$ 0,28	34,139 $\pm$ 0,87	25,075 $\pm$ 0,67	22,342 $\pm$ 1,02
Farelo de Trigo	20,021 $\pm$ 0,37	31,156 $\pm$ 0,71	27, 635 $\pm$ 0,89	18, 745 $\pm$ 0,97
Casca de arroz	10, 575 $\pm$ 0,43	18,074 $\pm$ 0,78	9,015 $\pm$ 1,05	5,935 $\pm$ 0,75
Celobiase(U/mL)	24 h	48h	96h	150h
Bagaço de cana	40,135 $\pm$ 0,87	90,906 $\pm$ 0,13	49,976 $\pm$ 0,78	35,012 $\pm$ 0,32
Farelo de Trigo	38,108 $\pm$ 0,78	75, 127 $\pm$ 1,01	35, 915 $\pm$ 0,56	29,457 $\pm$ 0,43
Casca de arroz	18,945 $\pm$ 0,63	28,296 $\pm$ 1,25	20, 786 $\pm$ 0,78	17,415 $\pm$ 0,58



Fonte: elaborado pela autora.

Foram analisados a fração líquida do tratamento biológico do bagaço de cana, farelo de trigo e casca de arroz (48h), quanto a formação de inibidores, no entanto não observou a formação de inibidores. Os sistemas de pré-tratamento biológico dependem de agentes biológicos para deslignificar e tornar o processo de hidrólise enzimática mais eficiente. Ao contrário dos métodos de pré-tratamento físico e químico, os pré-tratamentos biológicos não geram produtos indesejáveis, tais como os inibidores (Ravindran et al., 2016) e possuem menores custos operacionais e baixo consumo de reagentes (Alvira et al., 2010; Talebnia et al., 2010).

Os tempos com maior produção de açúcares redutores tiveram os açúcares formados identificados por HPLC. Foi observado a formação de glicose e frutose, e que o tratamento biológico se mostrou promissor no que diz respeito à quantidade de açúcares formados (tabela 3). Os pré-tratamentos fúngicos apresentam várias vantagens, quais sejam, menos onerosos, menores gastos energéticos, dispensa o uso de aditivos químicos, realizado em condições ambientais moderadas e nenhuma emissão de inibidores para a fermentação (Martín-Sampedro et al., 2015).

Conclusões

O pré-tratamento biológico utilizando o *Botrytis ricini* URM 5627 apresentou bons resultados na exposição da celulose como visto nos resultados obtidos. A ruptura das fibras facilitou o acesso da celulase pura no processo de sacarificação dos resíduos pré-tratados com a formação de açúcares redutores (glicose e frutose). Após a sacarificação enzimática dos resíduos pré-tratados observou-se a formação de açúcares fermentáveis. Esses resultados representam um considerável avanço, uma vez que, se trata de processo menos oneroso, que não gera



produtos indesejáveis, tais como os inibidores, e isso por sua vez possibilita a utilização desse método de pré-tratamento antes da sacarificação enzimática, para a obtenção de açúcares fermentáveis, que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis renováveis.

Agradecimentos

UESB, UFAL, CAPES, CNPQ

Referências

- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- FERREIRA, J. A.; MAHBOUBI, A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects. *Bioresource Technology*, v. 215, p. 334–345, 2016.
- GUO, H.; CHANG, Y.; LEE, D. J. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: research focuses. *Bioresource Technology*, v. 252, p. 198–215, 2018.
- KASSAYE, S.; PANT, K. K.; JALIN, S. Hydrolysis of cellulosic bamboo biomass into reducing sugars via a combined alkaline solution and ionic liquid pretreatment steps. *Renewable Energy*, v. 104, p. 177–184, 2017.
- MADHAVAN, A. R.; SINDHU, R.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1304–1313, 2017.
- MARTÍN-SAMPEDRO, R.; FILLAT, Ú.; IBARRA, D.; EUGENIO, M. E. Use of new endophytic fungi as pretreatment to enhance enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*. *Bioresource Technology*, v. 196, p. 383–390, 2015.
- RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 80, p. 330–340, 2017.
- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 92–102, 2016.
- SILVA, T. P.; DE ALBUQUERQUE, F. S.; DOS SANTOS, C. W. V.; FRANCO, M.; CAETANO, L. C.; PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresource Technology*, v. 270, p. 263–269, 2018.
- SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKAC, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 117, p. 624–631, 2015.
- SINGH, Y. D.; MAHANTA, P.; BORA, U. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. *Renewable Energy*, v. 103, p. 490–500, 2017.
- VOLYNETS, B.; EIN-MOZAFFARI, F.; DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis*, v. 6, p. 1–22, 2017.