Congresso
Internacional da
Agroindústria
10 e 11 de junho

Inovação,
Gestão e
Sustentabilidade
na Agroindústria

A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR AUMENTA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM DIFERENTES LACASES

LA SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR AUMENTA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO PREVIO CON DIFERENTES LACASAS

ENZYMATIC SACARIFICATION OF SUGARCANE BAGASSE INCREASES AFTER PRE-TREATMENT WITH DIFFERENT LACASES

Kamila C. Spacki¹; Thaís Marques Uber²; Daniela L. Pasquarelli³; Emanueli Backes⁴; Rosane M. Peralta⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0157>

RESUMO

A agroindústria é fornecedora de biomassa lignocelulósica até agora não satisfatoriamente aproveitada, sendo responsável por grande parcela dos chamados rejeitos industriais. A elevada disponibilidade de fibras lignocelulósicas abre uma oportunidade para avanços tecnológicos que agreguem valor aos produtos. Por exemplo, a produção de álcool a partir dos resíduos lignocelulósicos tem sido considerada, em escala mundial, como uma forma viável de produção de um combustível que substituiria os combustíveis derivados de petróleo. Dentre as enzimas ligninolíticas (lacases, lignina peroxidase, peroxidase dependente de manganês e peroxidase versátil), as lacases parecem ser as enzimas mais aptas a serem utilizadas em larga escala na transformação das fibras lignocelulósicas graças à existência de um número considerável de microrganismos produtores, à facilidade de produção destas enzimas através de cultivos submersos e em estado sólido, à ampla especificidade de substrato das lacases e à sua capacidade de utilizar o oxigênio atmosférico como doador de elétrons. As lacases são enzimas capazes de oxidar diferentes aromáticos, fenólicos e não-fenólicos, e possuem diversas aplicações industriais e biotecnológicas. Neste trabalho, as lacases de *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* foram produzidas em cultivos em estado sólido utilizando uma mistura de farelo de trigo e bagaço de cana. Os extratos ricos em lacases foram utilizados no pré-tratamento do bagaço de cana na presença e ausência dos mediadores acetil-acetona, ácido violúrico e hidrobenzotriazol visando sua deslignificação e posterior sacarificação para a produção de açúcares fermentescíveis. A sacarificação foi realizada com as enzimas celulolíticas e xilanolíticas comerciais Cellic Ctec2 e Htec2 da Novozymes. As quantidades de açúcares redutores totais liberados na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com as lacases dos três fungos foram até 6 vezes superiores aos obtidos na sacarificação do bagaço de cana não submetido ao pré-tratamento. Dos 3 mediadores utilizados, o sistema lacase-ácido violúrico resultou na maior liberação de açúcares redutores na etapa de sacarificação. O sistema lacase de *P. ostreatus*-ácido violúrico 0,25 mM possibilitou a obtenção de 172 ± 5 μ moles/mL de açúcares redutores

¹Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, kamilaspacki@outlook.com.

²Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, thaisuber@gmail.com

³Bacharelado em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, dani.pasquarelli@hotmail.com

⁴Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, emanuelibackes@outlook.com

⁵Doutora em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, rmperalta@uem.br

A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

a partir do bagaço de cana. Este valor corresponde a um acréscimo de 10 vezes a quantidade de açúcares redutores obtidos a partir do bagaço de cana sem pré-tratamento. Em conclusão, os dados obtidos sugerem que após o pré-tratamento com as lacases, as frações hemicelulose e celulose das fibras de bagaço de cana ficaram mais expostas ao ataque das enzimas hidrolíticas resultando em aumento na liberação de açúcares fermentescíveis quando comparados com o bagaço de cana sem pré-tratamento. Os melhores resultados foram obtidos com a lacase de *P. ostreatus* em associação com o mediador ácido violúrico.

Palavras-chaves: Bagaço de cana, biomassa, fungos da podridão branca, pré-tratamento, sacarificação.

RESUMEN

La agroindustria es un importante proveedor de biomasa lignocelulósica que hasta ahora no se utiliza satisfactoriamente, siendo responsable de una gran parte de los denominados residuos industriales. La alta disponibilidad de fibras lignocelulósicas abre una gran oportunidad para los avances tecnológicos que agregan valor a los productos agroindustriales. Por ejemplo, la producción de alcohol a partir de residuos lignocelulósicos se ha considerado, en todo el mundo, como una forma viable de producir un combustible que reemplazaría a los combustibles derivados del petróleo. Entre las enzimas ligninolíticas (lacasas, lignina peroxidasa, peroxidasa dependiente de manganeso y peroxidasa versátil), las lacasas parecen ser las enzimas más adecuadas para ser utilizadas a gran escala en la transformación de fibras lignocelulósicas gracias a la existencia de un número considerable de microorganismos productores, a la facilidad de producción de estas enzimas a través de cultivos sumergidos y en estado sólido, la amplia especificidad del sustrato de lacasa y su capacidad para utilizar oxígeno atmosférico como donante de electrones. Las lacasas son enzimas capaces de oxidar diferentes aromáticos fenólicos y no fenólicos y tienen varias aplicaciones industriales y biotecnológicas. En este trabajo, las lacasas de *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* fueron producidas en cultivos en estado sólido utilizando una mezcla de salvado de trigo y bagazo de caña de azúcar. Los extractos ricos en lacasa se utilizaron en el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar en presencia y ausencia de los mediadores acetil-acetona, ácido violúrico e hidrobenzotriazol para su deslignificación y posterior sacarificación para la producción de azúcares fermentables. La sacarificación se realizó con las enzimas comerciales celulolíticas y xilanolíticas de Novozymes Cellic Ctec 2 y Htec 2. Las cantidades de azúcares reductores totales liberados en la sacarificación del bagazo de caña de azúcar pretratado con las lacasas de los tres hongos fueron hasta 6 veces superiores a las obtenidas en la sacarificación del bagazo de caña de azúcar no sometido a pretratamiento. De los 3 mediadores utilizados, el sistema lacasa-ácido violúrico resultó en la mayor liberación de azúcares reductores en la etapa de sacarificación. El sistema de lacasa de *P. ostreatus*-ácido violúrico 0,25 mM permitió obtener 172 ± 5 $\mu\text{moles} / \text{mL}$ de azúcares reductores a partir del bagazo de caña de azúcar. Este valor corresponde a un aumento de 10 veces la cantidad de azúcares reductores obtenidos del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento. En conclusión, los datos obtenidos sugieren que después del pretratamiento con lacasas, las fracciones de hemicelulosa y celulosa de las fibras de bagazo de caña de azúcar estuvieron más expuestas al ataque de enzimas hidrolíticas resultando en un aumento en la liberación de azúcares fermentables en comparación con el bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento. Los mejores resultados se obtuvieron con la lacasa de *P. ostreatus* en asociación con el mediador ácido violúrico.

Palabras Clave: Bagazo de caña de azúcar, biomasa, hongos de pudrición blanca, pretratamiento, sacarificación.

ABSTRACT

Agroindustry is a major supplier of biomass so far not satisfactorily used, being responsible for a large portion of the so-called industrial waste. The high availability of lignocellulosic fibers opens up a great opportunity for technological advances that add value to the products of the agribusiness. For example, the production of alcohol from lignocellulosic residues has been considered, worldwide, as a viable way of producing a fuel that would replace petroleum-derived fuels. Among the ligninolytic enzymes (laccases, lignin peroxidase, manganese peroxidase and versatile peroxidase), laccases seem to be the most suitable enzymes to be used on large scale in the transformation of lignocellulosic fibers thanks to the existence of a considerable number of producing microorganisms, to the ease of production of these enzymes through submerged cultures and in solid state, the broad substrate specificities of the laccases and their ability to use atmospheric oxygen as an electron donor. Laccases are enzymes capable of

oxidizing different phenolic and non-phenolic aromatics and have several industrial and biotechnological applications. In this work, the laccases of *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* were produced in solid state crops using a mixture of wheat bran and sugarcane bagasse. Laccase-rich extracts were used in the pre-treatment of sugarcane bagasse in the presence and absence of acetyl-acetone, violuric acid and hydrobenzotriazole mediators in order to delignify it, thus opening the way for saccharification. Saccharification was performed with commercial cellulolytic and xylanolytic commercial enzymes Cellic Ctec2 and Htec2 from Novozymes. The amounts of total reducing sugars released in saccharification of sugarcane bagasse pretreated with the laccases of the three fungi were up to 6 times higher than those obtained in saccharification of sugarcane bagasse not subjected to pretreatment. Among the 3 mediators used, the laccase-violuric acid system resulted in the highest release of reducing sugars in the saccharification stage. The laccase system of *P. ostreatus*-0.25 mM violuric acid made it possible to obtain 172 ± 5 $\mu\text{moles} / \text{mL}$ of reducing sugars from sugarcane bagasse. This value corresponds to an increase of 10 times the amount of reducing sugars obtained from sugarcane bagasse without pre-treatment. In conclusion, the data obtained suggest that after pretreatment with laccases, the hemicellulose and cellulose fractions of the sugarcane bagasse fibers were more exposed to attack by hydrolytic enzymes resulting in an increase in the release of fermentable sugars when compared to the sugarcane bagasse without pre-treatment. The best results were obtained with the laccase of *P. ostreatus* in association with the mediator violuric acid.

Keywords: Sugarcane bagasse, biomass, white rot fungi, pre-treatment, saccharification.

INTRODUÇÃO

Lacases (EC.1.10.3.2) são cobre oxidases que catalisam a oxidação de fenólicos, aminas aromáticas com concomitante redução do O_2 a água. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em fungos, bactérias, plantas e insetos. As lacases tem várias funções biológicas, incluindo degradação de polímeros complexos como a lignina e ácido húmico, lignificação (principalmente as de plantas), detoxificação, patogenicidade, morfogênese, esporulação, polimerização de melanina, entre outras (COUTO & HERRERA, 2006).

As lacases mais estudadas são as dos fungos basidiomicetos envolvidos na podridão branca da madeira. Nestes fungos, as lacases, em associação com as peroxidases dependentes de manganês (Mn peroxidases) e as peroxidases capazes de oxidar o modelo de lignina veratril álcool (lignina peroxidase), estão envolvidas na degradação da lignina, um polímero fenólico altamente recalcitrante (PERALTA et al., 2017). Lacases fúngicas são glicoproteínas extracelulares, com massas moleculares entre 60 e 80 kDa e pI entre 3–6. Geralmente ocorrem como isoenzimas, com estruturas monoméricas, diméricas ou poliméricas todas mostrando uma arquitetura tipo beta-barril (KUNAMNENI et al., 2008, PERALTA et al., 2017).

As lacases são enzimas com especificidade ampla em relação ao substrato, podendo oxidar diversos compostos fenólicos e não fenólicos. Apesar dos substratos fenólicos serem mais facilmente oxidados, a ação oxidativa da enzima pode ser estendida a substratos não fenólicos pela inclusão de mediadores. Mediadores são compostos orgânicos de baixa massa molecular que primeiro são oxidados pela lacase e depois oxidam os compostos não fenólicos

que a lacase sozinha não é capaz de oxidar (PERALTA et al., 2017). Mediadores naturais, como diferentes fenólicos encontrados em plantas e mediadores sintéticos como acetilacetona, ácido violúrico e hidroxibenzotriazol tem sido descritos como potencializadores da ação oxidativa da lacase sobre diversas moléculas (RENCORET et al., 2016).

Por conta da capacidade das lacases oxidar diversos compostos fenólicos e não fenólicos, estas enzimas são de grande interesse na área da bioenergia. Elas podem ser utilizadas para degradar o componente lignina, um polímero fenólico recalcitrante, das fibras lignocelulósicas de diversos resíduos agro-industriais como bagaço de cana, sabugo e casca de milho e casca de arroz, por exemplo. Dessa forma, as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) ficam mais acessíveis à hidrólise enzimática por celulasas e hemicelulasas (sacarificação) aumentando a formação de monossacarídeos fermentescíveis (CASTOLDI et al., 2014, 2017). Tais monossacarídeos podem ser posteriormente fermentados por leveduras e outros microrganismos gerando combustíveis renováveis como etanol, butanol, entre outros (ISIKGOR & BECER, 2015). A redução do teor em lignina necessária para uma posterior sacarificação eficiente recebe o nome de pré-tratamento (Fig. 1). O pré-tratamento pode ser realizado por métodos físicos, químicos e biológicos (HEAP et al., 2014, RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016). Métodos biológicos são amigáveis ao ambiente, pois não geram poluição mas, até o momento, ainda não são competitivos quando comparados aos métodos físicos e químicos (SINDHU et al., 2016). Os métodos biológicos, entretanto, tem um grande diferencial sobre os métodos físicos e químicos: eles não geram produtos tóxicos ou inibidores à etapa posterior de fermentação (ABO et al., 2019, JÖNSSON & MARTIN, 2016, KARIMI & TAHERZADEH, 2016, MAURYA et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pré-tratamento com lacases provenientes de três basidiomicetos ligninolíticos *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* na presença ou não dos mediadores sintéticos acetil-acetona, ácido violúrico e hidroxibenzotriazol na posterior sacarificação enzimática utilizando celulasas e hemicelulasas comerciais.

Figura 1. O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é necessário para a desconstrução da fibra lignocelulósica e facilitação da etapa posterior de sacarificação

Fonte: CASTOLDI et al., 2017 com modificações

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A biomassa vegetal num contexto biotecnológico pode ser definida como sendo toda a matéria orgânica produzida pela fotossíntese. A biomassa pode ser utilizada como fonte de alimento, combustível, fibras, materiais de construção, entre várias outras aplicações. Quimicamente, a biomassa consiste de diferentes carboidratos especialmente celulose, hemicelulose (termo que engloba diversos polissacarídeos incluindo xilanas, mananas, glicanas, etc), outros polissacarídeos (principalmente amido e pectina), e a lignina, uma complexa estrutura polifenólica recalcitrante. A agroindústria é grande fornecedora de biomassa até agora não satisfatoriamente aproveitada, sendo responsável por grande parcela dos chamados rejeitos industriais. A elevada disponibilidade de fibras lignocelulósicas abre uma grande oportunidade para avanços tecnológicos que agreguem valor aos produtos da agroindústria. Por exemplo, a produção de álcool a partir dos resíduos lignocelulósicos tem sido considerada, em escala mundial, como uma forma viável de produção de um combustível que substituiria os combustíveis derivados de petróleo (ABO et al., 2019). A biomassa lignocelulósica é uma fonte potencial de carboidratos poliméricos para fermentação, mas a conversão destes polímeros em açúcares simples fermentáveis é altamente problemática devido à recalcitrância da lignina.

A lignina é o segundo polímero orgânico mais abundante na terra. Ela compreende 20-35% do peso seco de parede celular de plantas, dependendo da fonte de biomassa. É uma

macromolécula que contém grupos funcionais, tais como metoxilo, hidroxila fenólica, hidroxila alcoólica e grupos carbonila que possuem um impacto profundo em sua reatividade. A lignina é composta por unidades fenilpropanóides, conhecidas como monolignols ou precursores da lignina, que estão ligados entre si através de ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio com um grau variável de metoxilação. A lignina é de difícil degradação porque é um polímero tri-dimensional interconectado através de diversas ligações carbono-carbono e outras ligações que não são hidrolisáveis em condições biológicas (Fig. 1). Além disto, a presença da lignina associada aos carboidratos nas fibras lignocelulósicas dificulta a degradação enzimática ou química da celulose (ABO et al., 2019; BEIG et al., 2021).

A remoção da lignina tem sido considerada um pré-requisito para uma utilização eficiente dos carboidratos dos materiais lignocelulósicos. São considerados como pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica os métodos físicos e químicos (JEŃDRZEJCZYK et al., 2019) e biológicos (SING, 2021) que priorizam a remoção da lignina (deslignificação) sem, entretanto, causar quebras nos carboidratos estruturais. Pré-tratamentos físico-químicos tais como tratamentos ácidos, tratamentos alcalinos e a explosão a vapor são bastante conhecidos por melhorar a conversão da biomassa celulósica em açúcares monoméricos. Entretanto, estes tratamentos requerem grande quantidade de energia e frequentemente geram produtos tóxicos, o que os tornam ambientalmente indesejáveis. A explosão a vapor degrada parcialmente e solubiliza lignina e hemicelulose, devido às condições elevadas de pressão e temperatura utilizadas no processo. O líquido efluente ou pré-hidrolisado, com hemiceluloses parcialmente degradadas, é separado da biomassa pré-tratada, e, em seguida, a celulose é enzimaticamente hidrolisada em glucose a ser fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* em etanol. A fim de ter um custo competitivo com etanol derivado de grãos, a presença de açúcares glicose e não glicose na matéria-prima deve ser considerada para se obter um processo de fermentação mais eficiente, bem como o uso integrado da lignina para fornecer calor e eletricidade para o processo ou para obter valiosos co-produtos. Em geral, a adição de um catalisador ácido, tal como H_2SO_4 ou SO_2 , é um pré-requisito para aumentar a recuperação de açúcares hemicelulose na fase líquida (pré-hidrolisado), e a hidrólise enzimática das frações sólidas, onde a celulose é o principal polissacarídeo. No entanto, este processo também afeta a fração não-açúcar formando compostos que contaminam o pré-hidrolisado e pode também ser incorporado na biomassa, produzindo efeitos adversos sobre os processos a jusante. Os compostos inibidores derivados do pré-tratamento de vapor de explosão são classificados de acordo com sua composição química estrutura e incluem ácidos fracos, derivados de furano, e fenólica compostos inorgânicos. Vários procedimentos para a remoção destes compostos têm sido avaliados,

incluindo as lacases, que tem sido aplicadas na remoção dos compostos fenólicos quando se utilizou a explosão a vapor como pré-tratamento da madeira e do bagaço de cana (QIU & CHEN, 2012).

Dentre as enzimas ligninolíticas (lacases, lignina peroxidase, peroxidase dependente de manganês e peroxidase versátil), as lacases parecem ser as enzimas mais aptas a serem utilizadas em larga escala para a deslignificação das biomassas lignocelulósicas. As principais razões para esta escolha são: 1). a existência de um número considerável de microrganismos produtores; 2). a facilidade de produção destas enzimas através de cultivos submersos e em estado sólido; 3). a ampla especificidade ao substrato das lacases e 4). as lacases utilizam o oxigênio atmosférico como doador de elétrons.

A capacidade aumentada das lacases na degradação da lignina em associação com moléculas mediadoras é atualmente visto como grande potencializador da ação das lacases. A ação direta de lacases na lignina é, em princípio, limitada às unidades fenólicas que representam apenas uma pequena porcentagem do total do polímero, o que limita a sua aplicação biotecnológica. No entanto, a descoberta de que alguns compostos sintéticos, chamados mediadores, podem atuar como transportadores de elétrons entre a enzima e o substrato final (CHRISTOPHER et al., 2014). Estudos já confirmaram o potencial dos sistemas lacase-mediador e suas várias aplicações na síntese orgânica (KUNAMNENI et al., 2008), na modificação de polímeros (PRASETYO et al., 2010), na indústria florestal (WIDSTEN & KANDELBAUER, 2008) e na produção de bioetanol a partir de resíduos pré-tratados (RENCORET et al., 2016). Um mediador é um composto químico continuamente oxidado pela enzima de lacase e, subsequentemente, reduzida pelo substrato.

Figura 2. Representação esquemática da oxidação do substrato via lacase-mediador

Fonte: Peralta et al., 2017 com modificações

A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Devido ao seu tamanho, o mediador não age como substrato pois não pode entrar no sítio ativo da enzima. O mediador apenas atua como um transportador de elétrons entre a enzima e o substrato ultrapassando assim as barreiras que existem entre eles. A reatividade da lacase diminui com o aumento do tamanho do substrato e essa limitação de acessibilidade ao substrato é superada através do uso de mediadores adequados de lacase. No passo inicial da reação, o mediador é oxidado para intermediários estáveis com elevado potencial redox. Depois, na sequência da cinética da reação de difusão controlada, o mediador oxidado difunde para longe da enzima, e devido ao seu pequeno tamanho é capaz de penetrar nos poros da planta paredes das células para atingir o substrato alvo. Como resultado, o substrato (lignina, compostos aromáticos, etc.) é oxidado pelos intermediários que não podem ser oxidados diretamente pela lacase, enquanto o mediador oxidado é reduzido à sua forma inicial.

METODOLOGIA

A pesquisa realizada foi de natureza quantitativa experimental. Substratos enzimáticos e mediadores utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* foram gentilmente cedido pelo Instituto de Botânica de São Paulo. *Ganoderma lucidum* foi isolado e identificado pelo Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Alimentos-UEM. Todos os fungos foram mantidos em laboratório através de repiques sucessivos em ágar-batata-dextrose. O bagaço de cana utilizado neste trabalho foi obtido do resíduo final do processo de extração de sacarose e foi gentilmente cedido pela Usina Santa Terezinha, Iguatemi, PR. As enzimas comerciais celulolíticas e xilanolíticas Cellic Ctec2 e Htec2 foram gentilmente cedidas pela Novozymes.

Os fungos foram cultivados em estado sólido utilizando uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo como substratos a uma umidade inicial de 80%. Após 5-6 dias, os cultivos foram interrompidos adicionando-se 20 mL de água destilada a cada frasco. Os frascos foram agitados a 100 rpm por 30 min. As misturas foram filtradas em gaze e posteriormente submetidas à centrifugação (8000 rpm por 10 minutos). Os sobrenadantes foram considerados como sendo os extratos enzimáticos brutos. Os extratos enzimáticos brutos 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 (Mn peroxidase) e lignina peroxidase conforme previamente descrito (MOTA et al., 2015).

Para o pré-tratamento com as lacases, utilizou-se bagaço de cana seco a 40 °C até atingir peso constante, triturado e peneirado (50 mesh). Experimentos para avaliar o efeito dos extratos enzimáticos ricos em lacase sobre o bagaço-de-cana foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g do bagaço-de-cana. Em um volume de 100 mL de tampão citrato 50 mM, pH 5,0, adicionou-se extrato para obtenção de atividade lacase de 2 U/g de bagaço de cana. Quatro ciclos de pré-tratamento foram realizados. Após cada ciclo 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 em água destilada. Ao final do último ciclo de pré-tratamento, as biomassas foram secas em estufa a 40 °C até atingir peso constante. Como controles negativos foram usados extratos brutos previamente fervidos a 100 °C durante 3 minutos. Cada pré tratamento foi realizado em quadruplicata. Para os controles, o pré-tratamento foi conduzido utilizando-se extratos enzimáticos desnaturados por fervura.

Para os pré-tratamentos com os sistemas lacase-mediador, utilizou-se o mesmo protocolo descrito acima, adicionando-se uma de três opções de mediadores acetil-acetona, ácido violúrico e HBT (hidroxibenzotriazol) em concentrações variando de 0,25 a 1 mM (concentração final)

Para a sacarificação, 0, 5 g de bagaço de cana pré-tratado com lacases e bagaço de cana não tratado foram colocados em frasco Erlenmeyer de 125 mL e um volume de 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, gentilmente doadas pela empresa Novozymes, na proporção de 9:1 (v/v). As misturas foram mantidas sob agitação de 120 rpm a 42 °C durante 48 horas. Ao final, avaliou-se os açúcares redutores presentes nas amostras pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (MILLER, 1959) e glicose pelo método da glicose oxidase-peroxidase utilizando kit comercial. Bagaço de cana pré-tratado com extrato enzimático desnaturado foi submetido à sacarificação utilizando a mesma metodologia.

As análises foram realizadas em quadruplicata para cada amostra. Os resultados foram expressos como as médias $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada por análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey utilizando-se o software Graphpad Prism. VERSÃO 8.0. O mesmo programa foi utilizado para a construção das figuras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Completa colonização dos substratos foi obtida nas culturas de *G. lucidum*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* após 5 a 6 dias. Todos os extratos enzimáticos foram avaliados quanto à atividade das enzimas celulase (como carboximetilcelulase, CMCase), xilanase, lacase, lignina peroxidase e peroxidase dependente de manganês (Mn peroxidase). Todos os extratos

A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

enzimáticos apresentaram baixas atividades de CMCase (menores de 0,10 U/mL) e xilanase (menores de 0,40 U/mL). Em relação às enzimas ligninolíticas, nas condições de cultivo utilizadas neste trabalho não foram detectadas as enzimas lignina peroxidase e Mn peroxidase. Atividades de lacase variaram entre 15 U/mL e 20 U/mL. Para os pré-tratamentos do bagaço de cana, utilizou-se quantidades equivalentes de lacase.

As quantidades de açúcares redutores totais liberados na sacarificação do bagaço de cana pré-tratado com as lacases foram até 6 vezes superiores aos obtidos na sacarificação do bagaço de cana não submetido ao pré-tratamento. Os pré-tratamentos do bagaço de cana com as lacases dos três fungos mostrou significância estatística ($p \leq 0,05$, ANOVA) em relação à liberação de açúcares redutores na etapa de sacarificação quando comparados com os valores obtidos a partir do bagaço de cana não pré-tratado (Fig. 3).

Figura 3. Avaliação da produção de açúcares redutores totais na sacarificação do bagaço de cana com as enzimas Ctec2+Htec2. O bagaço de cana foi pré-tratado com diferentes lacases conforme indicado

Fonte: Própria, 2021

Estudos prévios têm associado o uso de lacases no processo de deslignificação. Exemplos são os experimentos onde a lacase de *Pleurotus ostreatus* foi utilizada com sucesso no pré-tratamento de bagaço de maçã, cascas de batata e casca de café (GIACOBBE et al.,

2018) e a lacase de *Trametes versicolor* utilizada com sucesso no pré-tratamento de palha de trigo (DENG et al., 2019).

Para avaliar se a adição de um mediador ao sistema de pré-tratamento seria mais eficiente que os realizados somente com lacase, três mediadores foram testados em concentrações variando as concentrações de 0,25 mM a 1,0 mM. Na Fig. 4 apresentamos os melhores resultados obtidos. Dos 3 mediadores, o sistema lacase-ácido violúrico resultou na maior liberação de açúcares redutores na etapa de sacarificação. O sistema lacase de *P. ostreatus*-ácido violúrico 0,25 mM possibilitou a obtenção de 172 ± 5 $\mu\text{moles/mL}$ de açúcares redutores a partir do bagaço de cana. Este valor corresponde a um acréscimo de 10 vezes a quantidade de açúcares redutores obtidos a partir do bagaço de cana sem pré-tratamento.

Figura 4. Avaliação da produção de açúcares redutores totais na sacarificação do bagaço de cana com as enzimas Ctec2+Htec2. O bagaço de cana foi pré-tratado com diferentes sistemas lacase-mediador conforme indicado

Fonte: Própria, 2021

Os resultados corroboram os pré-tratamentos com diferentes sistemas lacase-mediador em diferentes resíduos lignocelulósicos (RENCORET et al., 2016; HEAP et al., 2014; MAURYA et al., 2015; BEZERRA et al., 2016) e abrem oportunidades futuras de otimização do processo para ampliar a produção de açúcares fermentáveis a partir do bagaço de cana

CONCLUSÕES

Os dados obtidos sugerem que o pré-tratamento com as lacases dos fungos ligninolíticos *G. lucidum*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* com e sem a presença de mediadores ácido violúrico, acetil-acetona e HBT causou uma deslignificação da fibra lignocelulósica tornando as frações hemicelulose e celulose das fibras de bagaço de cana mais expostas ao ataque das enzimas hidrolíticas CTec2+HTec2, resultando em aumento da produção de açúcares fermentescíveis. Os melhores resultados foram obtidos utilizando o sistema lacase de *P. ostreatus*-ácido violúrico. Os desafios estão associados à obtenção de grandes quantidades de enzima e à obtenção de uma formulação estável da enzima para ampliação de escala do pré-tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABO, B.O.; GAO, M.; WANG, Y.; WU, C.; MA, H.; WANG, Q. 2019. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. **Reviews on Environmental Health**, v. 34, p. 57-68, 2019
- BEIG, B.; RIAZ, M.; RAZA, S.; HASSAN, N.M.; ZHENG, Z.; KARIMI, K.; PUGAZHENDHI, A.; ATAB, A.E.; CHI, N.T.L. Current challenges and innovative developments in pretreatment of lignocellulosic residues for biofuel production: A review. **Fuel**, v. 287, artigo 119670, 2021
- BEZERRA, T.L.; RAGAUSKAS, A.J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuel, Products and Biorefining**, v. 10, p. 634-647, 2016
- CASTOLDI, R.; BRACHT, A.; MORAIS, G.R.; BAESSO, M.L.; CORREA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; MOREIRA, R.F.P.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Biological pretreatment of *Eucalyptus grandis* sawdust with white-rot fungi: Study of degradation patterns and saccharification kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 258, p. 240-246, 2014
- CASTOLDI, R.; CORREA, V.G.; MORAIS, G.R.; SOUZA, C.G.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.A.; PERALTA-MUNIZ-MOREIRA, R.F.; PERALTA, R.M. 2017. Liquid nitrogen pretreatment of eucalyptus sawdust and rice hull for enhanced enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 648-655, 2017
- COUTO, S.R. HERRERA, J.L.T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500-513, 2006
- CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; & JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, artigo 12, 2014.
- DENG, Z., XIA, A., LIAO, Q., ZHU, X., HUANG, Y., FU, Q. Laccase pretreatment of wheat straw: effects of the physicochemical characteristics and the kinetics of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, 12, artigo 159, 2019

GIACOBBE, S.; PEZZELLA, C.; LETTERA, V.; SANNIA, G.; PISCITELLI, A. Laccase pretreatment for agrofood wastes valorization. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 59-65, 2018

HEAP, L.; GREEN, A.; BROWN, D.; VON DONGEN, B.; TURNER, N. Role of laccase as an enzymatic pretreatment method to improve lignocellulosic saccharification. **Catalysis, Science & Technology**, v. 4, p. 2251-2259, 2014

ISIKGOR, F.; BECER, C.R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymers Chemistry**, v. 6, p. 4497-4559, 2015

JEDRZEICZYK, M.; SOSZKA, E.; CZAPNIK, M.; RUPPERT, A.M.; GRAMS, J. Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. Second and Third Generation of Feedstocks. **The Evolution of Biofuels**, v. p. 143-196, 2019

JÖNSSON, L.J.; MARTIN, C. Pre-treatment of lignocellulose: formation of inhibitory by products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103-112, 2016

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1008-1018, 2016

KUNAMNENI, A., PLOU, F.J., BALLESTEROS, A., ALCALDE, M. 2008. Laccases and their applications: a patent review. **Recent Patents in Biotechnology**, v. 2, p. 10-24, 2008

MAURYA, D.P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Biotech**, v. 5, p. 597-609, 2015

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

MOTA, T.R.; KATO, C.G.K.; PERALTA, R.A.; BRACHT, A.; MORAIS, G.R.; BAESSO, M.L.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Decolourization of congo red by *Ganoderma lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 226, p. 351-362, 2015

PERALTA, R.M., SILVA, B.P., CORREA, R.C.G., KATO, C.G., SIEXAS, F.A.V., BRACHT, A. 2017. Enzymes from basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Ed. G. BRAMACHARI, A.L. DEMAÏN & J.L. ADRIANO. Elsevier, pp 119-150.

PRASETYO, E.N.; KUDANGA, T.; OSTERGAARD, L.; RENCORET, J.; GUTIERREZ, A.; DEL RIO, J.C.; SANTOS, J.I.; NIETO, L.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; MARTINEZ, A.T.; LI, J.; GELLERSTEDT, G.; LEPIFRE, S.; SILVA, C.; KIM, S.Y.; CAVACO-PAULO, A.; KLAUSEN, B.S.; LUTNAES, B.F.; NYANHONGO, G.S.; GUEBITZ, G.M. Polymerization of liginosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5054–5062, 2010

QIU, W.; CHEN, H. Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 8-12, 2012

A SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 83–91, 2016

RENCORET, J.; PEREIRA, A.; DEL RÍO, J.C.; MARTINEZ, A.T.; GUTIÉRREZ, A. Laccase-mediator pretreatment of wheat straw degrades lignin and improves saccharification. **Bioenergy Research**, v. 9, 917, 2016

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – an overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76-82, 2016

SING, S. K. Biological treatment of plant biomass and factors affecting bioactivity. **Journal of Cleaner Production**, v. 279, artigo 123546, 2021.

WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest products industry: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 293-307, 2008.