

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Efeito de Ligninases sobre a Hidrólise Enzimática de Cana-de-açúcar e Eucalipto pré-tratados hidrotermicamente

Miriam Dantzger¹, Lucas S. Parreiras¹, Jorge Lepikson-Neto², Michelle A. Assis³,
Desireé S. Silva³, Marcela M. Salazar³, Carolina Maria M. C. Andrade³,
Gonçalo A. G. Pereira^{1,2}

¹ BioCelere Agroindustrial Ltda.

Av. Pierre Simon de Laplace, 13069-320 Campinas SP – miriam.dantzger@bolsistagranbio.com.br

² Laboratório de Genômica e Expressão – Unicamp, Campinas, SP

³ Instituto SENAI de Inovação e Biomassa

SENAI DR-MS, 79640-250, Três lagoas, MS

RESUMO

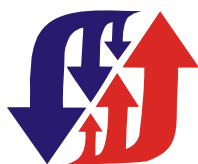
*A lignina é a fração de maior recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, sendo capaz de inativar ou se ligar inespecificamente às enzimas da hidrólise, reduzindo consideravelmente o seu rendimento. As ligninases são enzimas capazes de degradar ou modificar a estrutura da lignina, podendo apresentar potencial biotecnológico quando suplementadas aos coquetéis enzimáticos. No presente trabalho apresentamos os efeitos das ligninases de *Trametes versicolor* e *Pleurotus sp.* sobre a hidrólise enzimática de palha de cana e cavaco de eucalipto. Observou-se que a laccase de *T. versicolor* não apresentou efeito benéfico à hidrólise enzimática de ambos os materiais lignocelulósicos. Em contraste, as enzimas de *Pleurotus sp.* aumentaram o rendimento da hidrólise de palha de cana e cavaco, apresentando potencial para aplicação biotecnológica.*

Palavras-chave: ligninases, laccase, lignocelulose.

INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica pré-tratada é limitada devido a presença de lignina que une as hemiceluloses e celuloses e age como uma barreira para as enzimas lignocelulolíticas, reduzindo a acessibilidade destas para o interior da biomassa (Moilanen, Kellock et al. 2011). Além disso, a lignina possui um efeito de adsorção inespecífica das enzimas hidrolíticas, reduzindo dessa forma a mobilidade, ação e reciclabilidade destas, o que resulta em menor rendimento da hidrólise (Palonen, Tjerneld et al. 2004).

As ligninases são enzimas que podem alterar as propriedades da lignina e removê-la parcialmente da biomassa, podendo facilitar o processo de hidrólise da biomassa. Podem ser classificadas como fenol-oxidases (laccase), lignina e manganês-peroxidases e peroxidases versáteis. Dentre essas, as laccases são enzimas multi-cobre capazes de oxidar uma ampla



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

variedade de compostos fenólicos, utilizando o oxigênio como aceptor de elétrons (Dashtban, Schraft et al. 2010).

O gênero *Pleurotus* compreendem os fungos da podridão branca da madeira e são conhecidos por causarem uma delignificação a partir da secreção de manganês-peroxidases e laccases, juntamente com enzimas envolvidas na produção de H₂O₂ extracelular (Camarero, Bockle et al. 1996).

O objetivo do trabalho consistiu em avaliar o efeito de ligninases de *Trametes versicolor* ou *Pleurotus sp.* sobre a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar e eucalipto.

MATERIAL E MÉTODOS

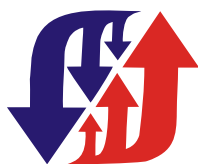
A palha de cana-de-açúcar ou o cavaco de eucalipto foram inicialmente tratados a 184°C em reator hidrotérmico de 20 litros durante 30 minutos com razão de água/biomassa de 3,5/1. Após este período, as amostras foram despressurizadas para o rompimento das estruturas da parede celular vegetal. Os cavacos de eucalipto foram gentilmente cedidos pela *International Paper*.

As biomassas pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática em escala de 20 mL com 10% de sólidos totais, na temperatura de 50°C e pH ótimo de 5. Utilizou-se o coquetel enzimático da Novozymes Cellic CTec3 a 1,5% para palha e 3% para cavaco (g/100g biomassa). Concomitantemente a adição do coquetel enzimático, utilizou-se variadas concentrações de laccase de *Trametes versicolor* (10, 20 e 40 U/g massa seca) ou ainda o extrato enzimático de *Pleurotus sp.* (0,25g proteína/g massa seca). Para eliminar o efeito de adsorção de enzimas pela lignina de cada material, soro albumina bovina foi utilizada como controle a uma concentração de proteína final que corresponde a concentração proteica presente em cada grupo de laccase. Após 72 horas, a biomassa residual foi centrifugada e os açúcares presentes no hidrolisado foram quantificados por analisador YSI.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observou-se na Figura 1 (A) que para a hidrólise com palha pré-tratada, a suplementação com laccase de *T. versicolor* não apresentou efeito quando comparado ao controle e BSA, independente da concentração testada (10 a 40 U/g massa seca). Em contraste, a hidrólise de cavaco pré-tratado suplementada com a laccase de *T. versicolor* apresentou valores de 58 a 65% menores em relação ao controle (Figura 1B).

A ação direta das laccases sobre a lignina é restrita a unidades fenólicas, as quais representam somente um pequeno percentual do polímero total, fato que limita sua aplicação biotecnológica (Rico, Rencoret et al. 2014). Além disso, o resultado da suplementação das laccases à hidrólise enzimática é dependente do tipo de substrato lignocelulósico. Oliva-Taravilla e colaboradores (2016) verificaram que oligômeros formados pela oxidação da laccase em materiais lignocelulósicos podem inibir endoglucanases, celobiohidrolases e xilanases. Constataram que essa inibição das celulases é influenciada pela composição e proporção de lignina.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Em contraste com os nossos resultados obtidos, algumas publicações mostraram que o pré-tratamento com laccase aumentou o rendimento da hidrólise de *hardwood* (Rico, Rencoret et al. 2014; Rico, Rencoret et al. 2014). Todavia, são escassos os trabalhos referentes a suplementação de laccase à hidrólise de palha de cana.

A suplementação com BSA (6 mg) aumentou o rendimento da hidrólise com cavaco em 12% em comparação com o controle, mostrando que ocorreu um maior efeito de adsorção nesse tipo de pré-tratado que na palha (Figura 1B).

Na Figura 2A, verificou-se que a hidrólise de palha pré-tratada suplementada com extrato de *Pleurotus sp.* mostrou um discreto aumento de 2,5% comparado ao controle. Esse efeito pode ser maior se utilizarmos uma concentração maior do extrato de *Pleurotus sp.*, pois a laccase de *T. versicolor* a 10 U possuía 10 vezes mais proteína que o último e apresentou resultado similar (Figura 1A).

Surpreendentemente, a suplementação do extrato de *Pleurotus sp.* na hidrólise de cavaco de eucalipto dobrou o rendimento da hidrólise comparado ao controle (Figura 1B). Esses resultados indicam que *Pleurotus sp.* possui outras enzimas lignolíticas além da laccase que estão agindo sobre a lignina e resultando em um maior rendimento da hidrólise de palha e cavaco.

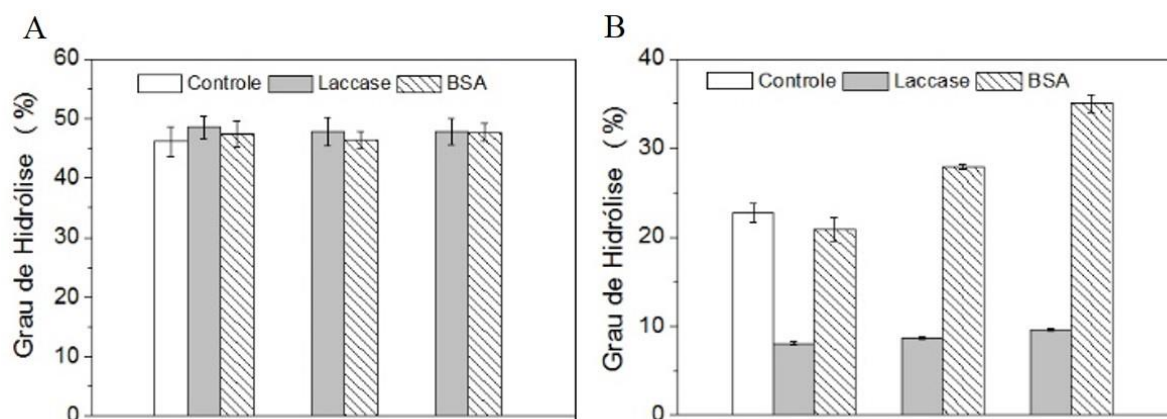
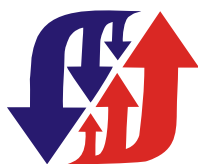


Figura 1. Efeito da laccase de *T. versicolor* a 10, 20 e 40 U/g massa seca e de soro albumina bovina sobre o rendimento da hidrólise enzimática de palha de cana (A) e cavaco de eucalipto (B). Laccase e BSA estão representados de forma crescente de concentração no sentido da coluna esquerda para a direita.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

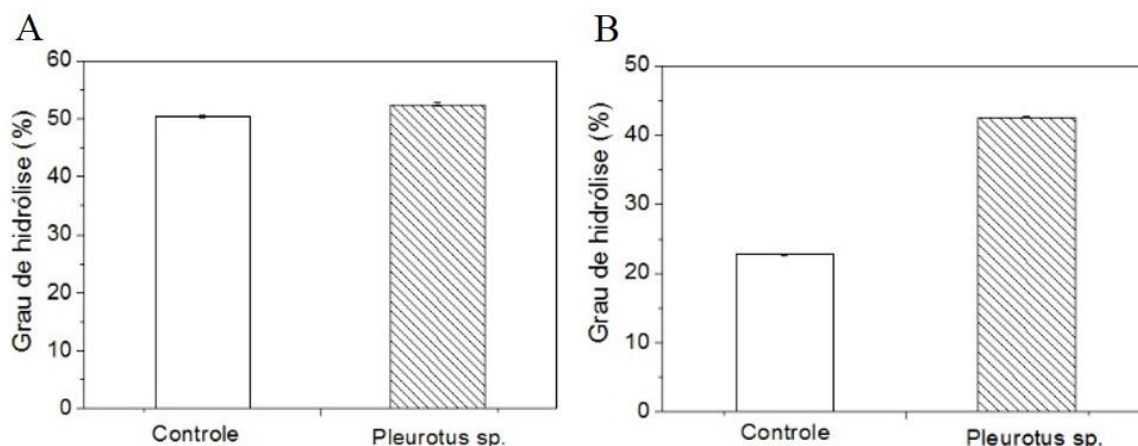


Figura 2. Efeito do extrato de *Pleurotus sp.* (0,25g proteína/g massa seca) sobre a hidrólise enzimática de palha de cana (A) e cavaco de eucalipto (B).

CONCLUSÕES

A laccase de *T. versicolor* não apresentou efeito positivo sobre a hidrólise enzimática de palha de cana e reduziu drasticamente o rendimento da hidrólise de cavaco de eucalipto.

O extrato de *Pleurotus sp.* possui enzimas que auxiliaram na hidrólise da palha de cana e principalmente na de cavaco de eucalipto. Essas enzimas possivelmente apresentam potencial biotecnológico na suplementação de coquetéis enzimáticos para a hidrólise. Todavia, estudos mais detalhados devem ser realizados acerca da ação e caracterização dessas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Camarero, S., B. Bockle, et al. (1996). "Manganese-Mediated Lignin Degradation by *Pleurotus pulmonarius*." *Appl Environ Microbiol.* **62**(3): 1070-1072.
- Dashtban, M., H. Schraft, et al. (2010). "Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin." *Int J Biochem Mol Biol.* **1**(1): 36-50.
- Moilanen, U., M. Kellock, et al. (2011). "The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis." *Enzyme and Microbial Technology* **49**(6-7): 492-498.
- Oliva-Taravilla, A., E. Tomás-Pejó, et al. (2016). "Phenols and lignin: Key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steam-pretreated biomass in presence of laccase." *Journal of Biotechnology* **218**: 94-101.
- Palonen, H., F. Tjerneld, et al. (2004). "Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin." *Journal of Biotechnology* **107**(1): 65-72.
- Rico, A., J. Rencoret, et al. (2014). "Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock." *Biotechnol Biofuels.* **7**(1): 6.
- Rico, A., J. Rencoret, et al. (2014). "In-Depth 2D NMR Study of Lignin Modification During Pretreatment of Eucalyptus Wood with Laccase and Mediators." *BioEnergy Research* **8**(1): 211-230.