



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pré-tratamento hidrotérmico do resíduo da palha de carnaúba para produção de enzimas lignocelulolíticas

Francinaldo Leite da Silva^{1,2}, Sergio Dantas de Oliveira Júnior¹, Alan Oliveira Campos¹
Davi Alves dos Santos e Everaldo Silvino dos Santos¹

1. Departamento de Engenharia Química –UFRN-Natal;RN - email:everaldo@eq.ufrn.br

2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba- IFPB Campus Picuí- Picuí/PB

RESUMO

A carnaúba (*Copernicia prunifera*) é uma palmeira nativa do Brasil, utilizada no extrativismo da cera de suas folhas, bastante apreciada pela indústria. O resíduo da palha é bastante rico em celulose podendo ser uma fonte de carbono alternativa na produção de enzimas celulolíticas por fungos filamentosos. Este estudo avaliou o efeito de pré-tratamento hidrotérmico sobre o resíduo da palha de carnaúba na produção de enzimas lignocelulolíticas. Para tanto, um tratamento hidrotérmico foi realizado nas fibras do resíduo da palha de carnaúba. O resíduo foi caracterizado quimicamente e fisicamente e, em seguida, utilizado na fermentação semissólida pelo fungo *Trichoderma reesei* QM 9414. Os resultados sugerem que o pré-tratamento hidrotérmico modifica a fibra da palha da carnaúba, aumentando a eficiência da produção de enzimas lignocelulolíticas.

Palavras-chave: carnaúba, enzimas celulolíticas, lignocelulose

INTRODUÇÃO

Os resíduos agrícolas são em geral ricos em celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose formada por anéis de β -D-glicopiranosos unidas por ligações do tipo β -D(1-4)-glicosídicas. As hemiceluloses formam uma ponte entre a celulose e a lignina. Elas são referidas como xilana, manana, ou galactanos, dependendo do tipo principal de açúcar. A xilana é o polissacarídeo mais comum em hemicelulose de paredes celulares de plantas, composto por unidades β -D-xilopiranosos, ligadas por β - (1-4) – glicosídicas (Grigorevski-Lima *et al.*, 2012).

A produção de enzimas celulolíticas é um ponto chave no processo de conversão de resíduos lignocelulósicos agrícolas em etanol celulósico, o bioetanol. Para alcançar a bioconversão tem sido estudada a utilização de sistemas enzimáticos que atuam em sinergia para hidrolisar a biomassa em glicose. Porém, o custo dessas enzimas tem sido um fator limitante. Neste sentido, o uso de fontes de carbono menos onerosas, como a palha da carnaúba (*Copernicia prunifera*), pode apresentar diminuição de custos favorecendo a produção das enzimas.

Os três maiores grupos de enzimas que atuam na hidrólise da celulose são: as endoglucanases (EC) ou endo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), que hidrolisam internamente a celulose e, de forma aleatória, em regiões amorfas; as exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.9.1), que promovem a hidrólise sequencial da segunda ligação glicosídica a partir da extremidade não redutora da molécula produzindo celobiose; e as β -glucosidases (EC 3.2.1.37) que hidrolisam a celobiose em glicose (Fugii *et al.*, 2009).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Neste estudo, avaliou-se o feito do pré-tratamento hidrotérmico na palha de carnaúba, bem como a utilização do resíduo pré-tratado como fonte de carbono na produção de enzimas lignocelulolíticas através da fermentação semissólida por *Trichoderma reesei* QM 9414.

MATERIAL E MÉTODOS

A biomassa da palha da carnaúba foi obtida no município de Assu-RN. O material foi lavado com água quente e secado em estufa a 50 °C por 24 horas. Decorrido o tempo de secagem a biomassa foi moída e peneirada em peneira de 20 Mesh. O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado na proporção de 4 % (p/v) de resíduo imerso em água destilada e submetido à temperatura de 120 °C por 30 minutos e, posteriormente, lavado até atingir o pH da água de lavagem. Em seguida, foi seco em estufa por 24 horas a 50 °C.

O resíduo pré-tratado e não tratado foram submetidos à caracterização química e física, dentre estas destaca-se a Difração por Raios X (DRX). Porções de 5,0 g dos resíduos foram submetidos à fermentação semissólida com 1×10^7 de esporos de *Trichoderma reesei* QM 9414, umidade de 60%, temperatura de 30 °C por 7 dias. Após cada fermentação as enzimas foram extraídas com tampão acetado de sódio (200mM, pH 5,0) sob agitação de 160 rpm por 30 minutos a 28°C.

Os ensaios enzimáticos para determinação da atividade FPase e CMCase foram realizados conforme descritos por Ghose (1987). A atividade xilanásica foi realizada da mesma forma da atividade CMCase sendo que o substrato consistiu de solução de xilana 1,0% (SIGMA-ALDRICH) e um tempo de incubação de 5 min. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do DNS, enquanto que as concentrações das proteínas totais presente nos extratos foram determinadas através do método de Bradford.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A composição química do resíduo não tratado e pré-tratado (tratamento hidrotérmico) está apresentado na Tabela 1. Os percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram calculados com base no peso seco.

Os valores de celulose incluem glicose, celobiose e hidroximetilfurfural quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a Hemicelulose foi considerada a composição da xilose, arabinose, furfural, ácidos glucorônico e acético, enquanto que a quantidade total de lignina foi calculada somando a lignina solúvel e insolúvel. As cinzas foram determinadas com base no remanescente da amostra carbonizada em mufla.

Tabela 1. Composição química dos resíduos da palha carnaúba não tratado e pré-tratado.

Resíduo	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina total (%)	Extraíveis (%)	Cinzas totais (%)
Não tratado	23,96 ± 0,75	11,84 ± 0,82	32,79 ± 0,91	11,62 ± 0,45	7,69 ± 0,05
Pré-tratado	34,46 ± 1,21	4,36 ± 0,45	38,3 ± 1,38	3,22 ± 0,44	6,32 ± 0,17

A quantidade de celulose no resíduo pré-tratado aumentou para 34,46 % quando comparado ao resíduo não tratado que possui 23,96 % de celulose. Foi observado que o pré-tratamento hidrotérmico é capaz de reduzir a hemicelulose para 4,36 %. Com relação à quantidade de lignina esta aumentou para 38,3% no resíduo pré-tratado, indicado que não ocorre remoção de lignina com este pré-tratamento.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A cristalinidade das amostras foi determinada antes e após o pré-tratamento. O índice de cristalinidade (IC) foi calculado considerando a intensidade relativa do pico 002 para celulose I e a menor intensidade do vale entre os picos 002 e 101 atribuídos à região amorfa da celulose. A Figura 1 apresenta o perfil do difratograma obtido.

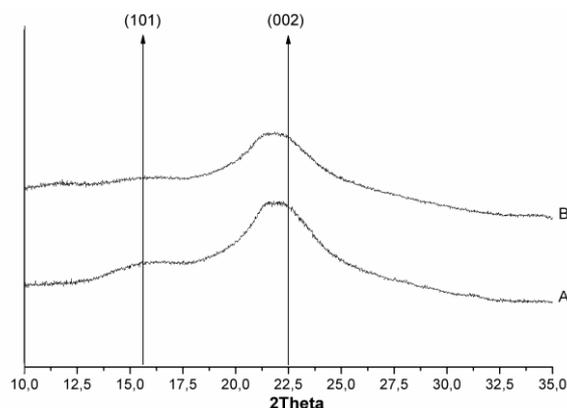


Figura 1. Difratoograma do resíduo não tratado e pré-tratado. A) Resíduo da palha de carnaúba não tratado; B) Resíduo da palha de carnaúba pré-tratado.

O resíduo não tratado apresentou um índice de cristalinidade de 34,69 %. Entretanto, o resíduo pré-tratado apresentou índice de cristalinidade de 26,77 %. A diminuição da cristalinidade no resíduo pré-tratado pode ser atribuída às modificações das ligações no interior da fibra pela entrada da água e remoção de hemicelulose. Dessa forma, após o pré-tratamento a lignina não removida se rearranja na fibra modificando a estrutura cristalina da celulose (Garrote *et al.*, 1999).

A busca por materiais celulósicos e de fungos filamentosos capaz de reduzir o custo de produção de celulases tem sido foco de muitos estudos. O resíduo da palha da carnaúba foi avaliado como indutor na produção de enzimas lignocelulolíticas, no presente estudo, através da fermentação semissólida com *T. reesei* QM 9414. Na Figura 2 são apresentados os resultados da produção de enzimas lignocelulolíticas usando resíduos de palha de carnaúba, não tratado e com pré-tratamento hidrotérmico. O material lignocelulósico não tratado e pré-tratado utilizado na fermentação foi capaz de induzir a produção de celulases por 168 horas. Foi possível observar ainda que a atividade celulolítica total (atividade de FPase), apresentou-se maior a partir de 120 horas de fermentação, apresentando valor maior que 0,45 U/g ao término do cultivo. A atividade FPase é um importante parâmetro para ser estudado na otimização da produção, pois avalia atuação das celulases, exoglucanases e endoglucanases, sob papel filtro, ou seja, diretamente na celulose comum. O resíduo pré-tratado mostrou-se visivelmente melhor como fonte de carbono, quando comparado ao não tratado (Fig A). Este resultado foi semelhante ao obtido na produção de xilanase (Fig.C), indicando que o pré-tratamento favoreceu à ação das enzimas. Com relação à atividade CMCase, que avalia a atuação das endoglucanases sob a carboximetilcelulose, foi observado valor de atividade de aproximadamente 8,0 U/g ao término do cultivo, sendo o melhor indutor o resíduo pré-tratado (Fig.B).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

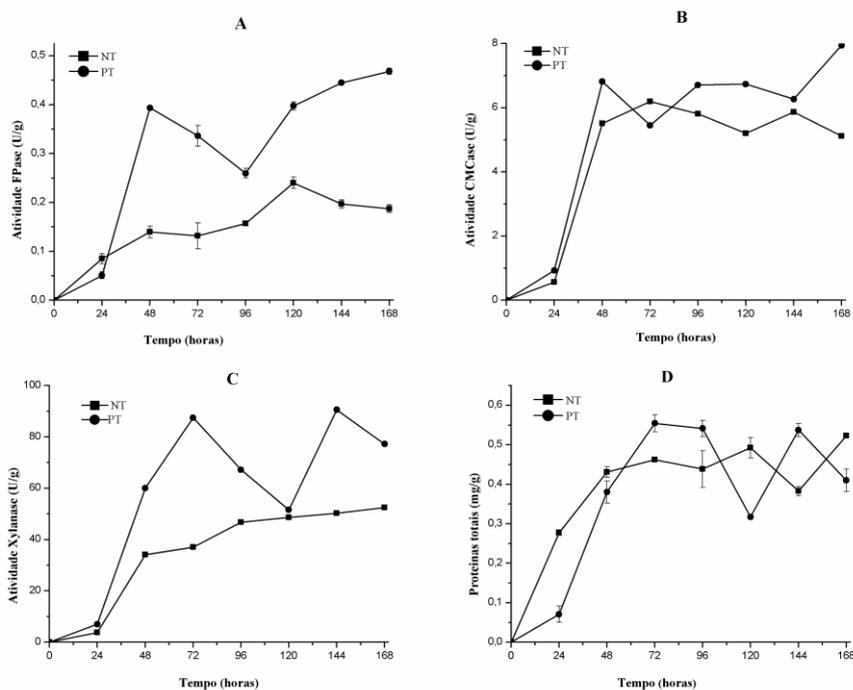


Figura 2. Produção de enzimas lignocelulolíticas induzidas com a palha de carnaúba não tratado e pré-tratado. NT = resíduo não tratado, PT = resíduo pré-tratado; A = Atividade FPAse; B = Atividade CMCCase; C=Atividade xilanase; D= proteínas totais. Os valores correspondem à média de experimentos realizados em triplicata.

O conteúdo protéico dos extratos apresentou um aumento gradual da concentração com tempo, atingindo valores máximos de aproximadamente 0,55 mg de proteína/g de resíduo com 72 horas. Assim como para as enzimas estudadas, a maior concentração de proteínas foi obtida através da fermentação induzida pelo resíduo pré-tratado.

CONCLUSÕES

O resíduo da palha de carnaúba mostrou-se capaz de induzir a produção de enzimas lignocelulolíticas. Além disso, foi possível observar que o pré-tratamento hidrotérmico alterou estrutura do material removendo a hemicelulose e que o resíduo pré-tratado favoreceu a indução das enzimas lignocelulolíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Journal

Fujii T, Fang X, Inoue H, Murakami K, Sawayama S.2009. Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. *Biotechnol Biofuels* 2(1): 24-32.

Garrote G, Dominguez H, Parajó JC. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *European Journal of Wood and Wood products*, 57:191-202.

Ghose T K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, Oxford, 59: 257-268.

Grigorevski-Lima AL, Oliveira, MMQ, Nascimento RP, Bon E OS, Coelho RRR. 2013. Production and Partial Characterization of Cellulases and Xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 Using Lignocellulosic Residual Biomass. *Appl Biochem Biotechnol* 169:1373-1385.