

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 27/07/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Josiani de Cassia Pereira

Estudo da produção de ligninases e celulases pelo fungo
Pycnoporus sanguineus MCA 16 e uso dos extratos enzimáticos na
sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de
bioetanol

São José do Rio Preto

2018

Josiani de Cassia Pereira

Estudo da produção de ligninases e celulases pelo fungo
Pycnoporus sanguineus MCA 16 e uso dos extratos enzimáticos
na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de
bioetanol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela
Alonso Bocchini

São José do Rio Preto
2018

Pereira, Josiani de Cassia.

Estudo da produção de ligninases e celulases pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 e uso dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol / Josiani de Cassia Pereira . -- São José do Rio Preto, 2018

167 f. : il., tabs.

Orientador: Daniela Alonso Bocchini

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Celulase. 3. Xilanases. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Bioetanol. 6. Enzimas microbianas. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Josiani de Cassia Pereira

Estudo da produção de ligninases e celulases pelo fungo
Pycnoporus sanguineus MCA 16 e uso dos extratos enzimáticos
na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de
bioetanol

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini
UNESP – Câmpus Arararaquara
Orientadora

Dra. Márcia Maria de Souza Moretti
UNESP – Câmpus São José do Rio Preto

Profa. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prato
UNESP – Câmpus Ilha Solteira

Prof. Dr. Luis Henrique de Souza Guimarães
USP – Câmpus Ribeirão Preto

Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula
UNESP – Câmpus Araraquara

São José do Rio Preto
27 de julho de 2018

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido à sorte de ter estudado e passado por todas as adversidades de forma honesta e digna. Aos meus pais José Roberto Pereira e Neide Aparecida Fação Pereira pelo exemplo de vida, de força, perseverança e decência. Ao meu irmão José Roberto Pereira Junior, primeiro amigo, pelo incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis. Aos meus avós maternos Nelson Fação (*in memoriam*) e Maria José de Jesus Fação por todo amor sem medida e aos paternos Almerinda Cardoso Pereira e Leonácio Pereira (*in memoriam*) que não pude ter mais tempo com eles.

Ao meu marido Victor Scarpa Neto pelo amor, apoio, companheirismo e compreensão.

A todos os meus animais de estimação (Scooby, Babi, Farofa, Tônico, Tinoco, Titico, Aurora, Porpeta, Porpetinha e Tigrinho) que pelo amor incondicional tornaram os meus dias cada vez melhores.

A CAPES pelo fomento científico durante o doutorado.

À Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini por toda a orientação e disponibilidade em me ajudar e à Profa. Dra. Eleni Gomes pela co-orientação e ajuda.

Aos professores Dr. Maurício Boscolo e Dr. Roberto da Silva pelos auxílios na pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica e Laboratório de Enzimas Microbianas: Isabel, Carol Gomes, Gisele, Pedro, Diego, Cissa, Erik, Erick, Janaina, Ana Lúcia, Thiago, Carlos Eduardo, Lorena, Eduardo Simioni, Jaqueline, Roni, Cíntia, Márcio, Raísa, Pâmela, Gabriel Barão, Gabriel, Vanessa, Marília, Lacan, Anelise, Sidnei, Corina, Olavo, Gabriela Salvador, Gabriela Okamura, Josi, Maitê, Yuri, Eduardo Duffeck, Marcos Palka, Marcos Rechi, Julieth, George, Daniela, Naiani, Natália e Luana pelo ambiente agradável.

Aos irmãos sem ser de sangue que conheci nesta caminhada: Natália Paganini Marques, Erick José Galindo Gomes, Isabel Zaparoli Rosa, Ana Carolina dos Santos Gomes, Janaina Pires Borges, Gisele Marta Martins, Pedro Lucas Bueno da Silva e Diego Alves Monteiro.

A todos os funcionários da UNESP.

A todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

EPÍGRAFE

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito menos sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Resumo

No presente trabalho, o fungo *Pycnoporus sanguineus* MCA16 foi cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos, por fermentação em estado sólido, para obtenção de celulases, xilanases e ligninases. Estas enzimas foram empregadas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino realizado na presença ou ausência de agentes oxidantes auxiliares na remoção da lignina, como KMnO_4 , H_2O_2 , ZnO e TiO_2 com o intuito de auxiliar na remoção da lignina e desestruturação da lignocelulose. Além disso, as ligninases produzidas pelo bioprocessamento foram estudadas quanto a degradação de compostos fenólicos totais liberados durante a etapa de sacarificação enzimática a fim de que promova um tratamento enzimático. Dentre todos os substratos lignocelulósicos utilizados, a mistura de farelo de trigo e farelo de soja levou à uma maior produção da maioria das enzimas testadas em 96h à 40°C. Após isso as soluções enzimáticas foram aplicadas na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, tanto hidrotérmico alcalino quanto empregando agentes oxidantes, utilizando ferramenta de planejamento estatístico para avaliar a influência de diferentes variáveis. Diante de todos os agentes oxidantes avaliados, H_2O_2 destacou-se obtendo as maiores liberações de glicose durante a sacarificação enzimática, com 250 unidades de endoglucanase/g de celulose com 11% de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com 2,5% de H_2O_2 durante 106 horas à 50°C. A fermentação alcoólica do hidrolisado nas condições de 288,3 unidades de endoglucanase/g de celulose com 13,5% de bagaço de cana-de-açúcar sob pré-tratamento hidrotérmico alcalino durante 130 horas à 57°C gerou uma conversão de glicose à etanol de 73,5%. Após a sacarificação enzimática, a concentração de compostos fenólicos sofreu uma redução de aproximadamente 90% enquanto que lacase e lignina peroxidase apresentaram uma ativação enzimática de 145% e 226%, respectivamente. Além disso, ácidos orgânicos gerados pela degradação da lignina exerceram influência sobre estas enzimas, ativando-as.

Palavras-chave: celulases, xilanases, ligninases, fermentação em estado sólido, sacarificação enzimática, etanol de segunda geração

Abstract

In the present work, the fungus *Pycnoporus sanguineus* MCA16 was grown on different lignocellulosic substrates by solid-state fermentation to obtain cellulases, xylanases and ligninases. These enzymes were used in saccharification of sugarcane bagasse submitted to alkaline hydrothermal pretreatment carried out in the presence or absence of oxidizing agents such as KMnO_4 , H_2O_2 , ZnO and TiO_2 in order to assist in the lignin removal and lignocellulose disruption. In addition, the ligninases produced by the bioprocess were studied for the degradation of total phenolic compounds released during the enzymatic saccharification step in order to promote an enzymatic treatment. Among all the lignocellulosic substrates used, the mixture of wheat bran and soybean meal led to a higher production of most of the enzymes tested in 96h at 40 °C. After that, the enzymatic solutions were applied in the enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse, both alkaline hydrothermal and using oxidizing agents, using a statistical planning tool to evaluate the influence of different variables. In view of all the oxidizing agents evaluated, H_2O_2 was selected by obtaining the highest glucose releases during the enzymatic saccharification with 250 units of endoglucanase/g cellulose with 11% sugarcane bagasse pre-treated with 2.5 % H_2O_2 for 106 hours at 50 °C. The alcoholic fermentation of the hydrolyzate under the conditions of 288.3 units of endoglucanase/g cellulose with 13.5% sugarcane bagasse under hydrothermal alkaline pre-treatment for 130 hours at 57 °C generated a conversion of glucose to 73.5% ethanol. After enzymatic saccharification, the concentration of phenolic compounds decreased by approximately 90% while laccase and lignin peroxidase showed an enzymatic activation of 145% and 226%, respectively. In addition, organic acids generated by the degradation of lignin exerted influence on these enzymes, activated them.

Keywords: cellulases, xylanases, ligninases, solid state fermentation, enzymatic saccharification, second generation ethanol

Lista de Figuras

Figura 1. Composição da lignocelulose.....	20
Figura 2. Composição da lignocelulose.....	21
Figura 3. Estrutura química da celulose.....	21
Figura 4. Estrutura da hemicelulose, constituída principalmente por xilana. AGLuc: ácido glucurônico; AF: ácido ferúlico.....	23
Figura 5. Representação de um fragmento da lignina, destacando as ligações entre os monômeros de fenilpropanóides. (A) β -O-4, (B) β - β , (C) 4-O-5, (D) β -1, (E) 5-5, (F) α -O-4 e (G) β -5.	25
Figura 6. Aplicações da lignina como recurso renovável a partir da biomassa.	26
Figura 7. Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose.	28
Figura 8. Representação esquemática da ação das enzimas hemicelulolíticas.	29
Figura 9. Representação esquemática do mecanismo catalítico da LiP sobre substrato aromático não-fenólico.	32
Figura 10. Álcool veratrílico (VA) como um mediador redox na degradação da lignina.....	32
Figura 11. Mecanismo de ação da lacase em substratos fenólicos.	34
Figura 12. Representação esquemática da estrutura do sítio ativo e do ciclo catalítico da lacase. (a) Modelo catalítico de lacase constituído por quatro átomos de cobre. (b) Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase produzindo duas moléculas de água a partir da redução de uma molécula de oxigênio molecular e concomitante oxidação (cobre T1) de quatro moléculas de substrato em seus radicais correspondentes. Sub: molécula de substrato; Sub ^o : radical do substrato oxidado.....	35
Figura 13. Mecanismo de ação da lacase em substratos não-fenólicos através de mediador.	36
Figura 14. Mediadores redox de lacase. Mediadores redox de lacase. (a) ácido 3-Hidroxi-antranílico (HAA); (b) ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS); (c) N-hidroxi- benzotriazola (HBT); (d) N-hidroxi-ftaimida (HPI); (e) ácido violúrico (VLA); (f) N- hidroxiacetanilida (NHA); (g) metil-éster	

de ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi- benzóico (ácido siríngico); (h) 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-iloxi (TEMPO).	37
Figura 15. Esquema do mecanismo de ação da lacase na ausência (a) e presença (b, c) de mediadores redox da lacase.....	38
Figura 16. Representação esquemática de alguns processos de micro-escala que ocorrem durante o crescimento fúngico em processos de FES. Gás (g); líquido (l); substrato (s); calor (Q); temperatura (T).	40
Figura 17. <i>Pycnoporus sanguineus</i> em meio ágar com extrato de malte.....	45
Figura 18. Pré-tratamento do material lignocelulósico para uso com fins energéticos.....	49
Figura 19. Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica. Tratamentos físicos e químicos.....	50
Figura 20. Fragmentos de lignina originados do pré-tratamento hidrotérmico alcalino.	52
Figura 21. Fragmentos de lignina e ácidos da hemicelulose (cumárico e ferúlico) originados do pré-tratamento hidrotérmico alcalino.....	52
Figura 22. Porção da hemicelulose (arabinosilana e ácido ferúlico) que mantém ligação com a lignina.....	53
Figura 23. Porção da hemicelulose (ácido cumárico) que mantém ligação com a lignina.....	53
Figure 1. Time course of cellulases, xylanases (a) and ligninases (b) production by <i>P. sanguineus</i> MCA 16 cultivated by SSF on mixture (1:1 w/w) of wheat bran and soybean meal, at 40 °C.....	86
Figure 2. Pareto chart of effects of the variables solid and enzyme loads.....	89
Figure 3 Response surface using pretreated bagasse and enzyme loads as variables in the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by the extract produced by <i>P. sanguineus fungus</i> MCA 16.	90
Figure 4. Pareto chart of effects of the variables time and temperature.	92
Figure 5. Fourier Transformed Infra Red (FT-IR) spectroscopies of sugarcane bagasse under different pretreatments. Hyd: hydrothermal; AHyd: alkaline hydrothermal; PP: potassium permanganate; APP: alkaline potassium permanganate; ZO: zinc oxide; AZO: alkaline zinc oxide; TO: titanium dioxide;	

ATO: alkaline titanium dioxide; HP: hydrogen peroxide; AHP: alkaline hydrogen peroxide.....	117
Figure 6. Phenolic compounds present in the liquor obtained after alkaline and non-alkaline hydrothermal pretreatment, in the presence of oxidizing agents. Hyd: hydrothermal; AHyd: alkaline hydrothermal; PP: potassium permanganate; APP: alkaline potassium permanganate; ZO: zinc oxide; AZO: alkaline zinc oxide; TO: titanium dioxide; ATO: alkaline titanium dioxide; HP: hydrogen peroxide; AHP: alkaline hydrogen peroxide.	118
Figure 7. Pareto diagram of the estimated effects of the hydrogen peroxide concentration and enzyme loading variables on saccharification of pre-treated sugarcane bagasse.	123
Figure 8. Response surfaces generated to the glucose concentration in function of hydrogen peroxide concentration and endoglucanase load (a); hydrogen peroxide concentration and sugarcane bagasse load (b); endoglucanase load and sugarcane bagasse load (c).	124
Figure 9. Organic acids present in the liquid fractions obtained from alkaline hydrothermal pretreatments in the presence of different hydrogen peroxide concentrations. (a) Vanilin and ferulic acids concentrations and (b) syringic and p-coumaric acids concentrations.	127
Figure 10. Pareto diagram of time and temperature influence on the enzymatic saccharification.....	129
Figure 11. Response surface generated to the glucose concentration obtained after enzymatic saccharification using time and temperature as variable in the statistical planning.	130
Figure 12. Scanning electron microscopy of sugarcane bagasse. (a) <i>In natura</i> 500x, (b) <i>in natura</i> 1500x, (c and d) submitted to hydrothermal alkaline pretreatment 500x and 1500x, respectively, (e and f) submitted to hydrothermal alkaline pretreatment with hydrogen peroxide (2.5%) 500x and 1500x, respectively.	133
Figure 13. Scanning electron microscopy of sugarcane bagasse submitted to alkaline hydrothermal pretreatment 1500x (a) and alkaline hydrothermal pretreatment with hydrogen peroxide at 2.5% 1500x (b).	134
Figure 14. Estimated effects by Pareto Diagram of the variables in the laccase (a), MnP (b) and LiP (c) activities.	153

Figure 15. Response surface obtained for pH and temperature effects on ligninases activities.....	154
Figure 16. Effects of pH (a) and temperature (b) on ligninases stability.	155
Figure 17. Total phenolic compounds concentration and ligninases activities profiles during the incubation of enzymes solution at 50 °C (a) and 70 °C (b). Enzyme solution was obtained from <i>P. sanguineus</i> MCA 16 cultivation in the mixture of soybean meal and wheat bran (1:1 w/v) for 96 hours at 40 °C. All the enzymatic activities were determined under optimum conditions of pH and temperature.....	157
Figure 18. Profiles of TPC concentration and ligninases activities during enzymatic saccharification of sugarcane bagasse submitted to alkaline hydrothermal pretreatment. Saccharification was conducted at 50 °C and the enzymes activities were determined under optimum conditions.....	159
Figure 19. Scanning electronic micrography (SEM) of pretreated sugarcane bagasse before enzymatic saccharification with 500x (a), after enzymatic saccharification with 500x (b), before enzymatic saccharification with 500x (c), before enzymatic saccharification with 1500x (d), after enzymatic saccharification with 500x (e) and after enzymatic saccharification with 1500x (f).....	162

Lista de tabelas

Tabela 1. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos utilizando-se resíduos lignocelulósicos.	43
Tabela 2. Enzimas de degradação de lignocelulose produzidas por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	46
Table 1. Rotational central composite design (RCCD) (2^2) used in saccharification of pretreated sugarcane bagasse.	82
Table 2. Face centered central composite design (CCD) (2^2) used in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse.	82
Table 3. Cellulases and xylanases activities in the crude enzyme solutions obtained by cultivation of <i>P. sanguineus</i> MCA 16 on different mixtures (1:1 w/w) of lignocellulosic substrates by SSF, for 96 hours, at 40 °C. SB: sugarcane bagasse; WB: wheat bran; RH: rice husk; SM: soybean meal.	84
Table 4. Ligninases activities in the crude enzyme solutions obtained by cultivation of <i>P. sanguineus</i> MCA 16 different mixtures (1:1 w/w) of lignocellulosic substrates by SSF, for 96 hours, at 40 °C. SB: sugarcane bagasse; WB: wheat bran; RH: rice husk; SM: soybean meal; MnP: manganese peroxidase; LiP: lignin peroxidase; nd: not detected.	85
Table 5. Rotational Central Composite Design (RCCD) model used in the enzymatic saccharification experiments of pre-treated sugarcane bagasse. ...	88
Table 6. Coded and real values of the face-centered design design (2^3) used in saccharification of sugarcane bagasse submitted to alkaline hydrothermal pretreatment in the presence of hydrogen peroxide. SB: sugarcane bagasse.	112
Table 7. Coded and real values of the rotational central composite design (RCCD) (2^2) used in the enzymatic saccharification of the sugarcane bagasse.	112
Table 8. Effect of pretreatments on chemical composition of sugarcane bagasse.	114

Table 9. Enzymatic saccharification of sugarcane bagasse submitted to different pre-treatments. Assays conducted at 50 °C for 24 hours with bagasse and endoglucanase loads at 3.0% and 100 total units/g cellulose, respectively. ..	120
Table 10. Factorial design of the face-centered type used for the evaluation of the influence, in the saccharification, of the bagasse and hydrogen peroxide loads used in the pretreatment, as well as the endoglucanase loading used in saccharification. An enzymatic extract produced by <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA 16 was used for cultivation on wheat bran and soybean meal (2:3 w/w) at 40 °C for 96 hours. The tests were kept at 50 °C for 24 hours under 300 rpm.	122
Table 11. Analysis of the lignocellulosic fractions of sugarcane bagasse subjected to alkaline pre-treatment in the presence of different percentages of hydrogen peroxide.....	126
Table 12. Rotational Central Composite Design (RCCD) used in the enzymatic saccharification experiments of pre-treated sugarcane bagasse.....	129
Table 13. Analyzes of variance (ANOVA) to enzymatic saccharification of sugarcane bagasse.	130
Table 14. Coded and real values used in the the 2 ² type face-centered performed to study the effect of pH and temperature (°C) on enzymes activities.	147
Table 15. Coded and real values of the face centered design (2 ²) used to evaluate de effect of pH and temperature on laccase and lignin peroxidase activities.....	151
Table 16. Coded and real values of the central composite design (RCCD) used to evaluate the effect of pH and temperature on manganese peroxidase actyity.	152
Table 17. Analysis of variance ANOVA of the experimental design for ligninases activities.....	153
Table 18. Influence of metal ions, organic and inorganic compounds on ligninases activities.....	156
Table 19. Effect of organic acids on ligninases activities. All the enzymes activities were determined under optimum conditions of pH and temperature.	160

Sumário

Introdução.....	18
Revisão Bibliográfica	20
1.Composição dos resíduos agroindustriais.....	20
1.1.Celulose	21
1.2.Hemicelulose.....	23
1.3.Lignina	24
2.Degradação enzimática de materiais lignocelulósicos	26
2.1.Celulases	27
2.2.Hemicelulases	29
2.3.Ligninases	30
3.Resíduos lignocelulósicos como substratos para produção de enzimas lignocelulolíticas e como fontes de açúcares fermentescíveis.....	39
3.1. Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)	39
3.2. Bagaço de cana-de-açúcar: substrato para cultivo fúngico e fonte de energia renovável	47
4. Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica	49
4.1. Pré-tratamento hidrotérmico	50
4.1.1. Pré-tratamento hidrotérmico em meio alcalino.....	51
4.1.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico na presença de agentes oxidantes	53
4.2. Uso de hidrolisados enzimáticos para produção de etanol 2G.....	55
Referências Bibliográficas	57
Capítulo 1	76
Ligninases, cellulases and xylanases production by <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA 16 and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production	76
1.Introduction.....	77
2.Material and methods	-
2.1.Microrganism.....	78
2.2.Influence of solid state fermentation (SSF) conditions on the enzymes productions	78

2.3. Determination of enzymes activities	79
2.4. Sugarcane bagasse hydrothermal alkaline pretreatment	80
2.5. Enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse.....	80
2.5.1. Influence of enzyme and bagasse loads.....	81
2.5.2. Influence of time and temperature	82
2.6. Analytical methods	82
2.7. Alcoholic fermentation	83
3.Results and discussion	84
3.1. Enzymes production by solid-state fermentation.....	84
3.1.1 Influence of lignocellulosic substrates.....	84
3.1.2. Influence of cultivation time on the enzymes production	86
3.2.1. Influence of solid and enzyme loads.....	87
3.2.2. Influence of time and temperature	91
3.3. Comparative enzymatic saccharifications using filter paper or xylan as substrates	94
3.3. Analysis of total phenolic compounds (TPC)	94
3.4. Analysis of fermentation inhibitors	95
3.5. Alcoholic fermentation	95
4.Conclusions	96
5.Aknowledgements	96
6.References	97
Capítulo 2	106
Use of oxidizing agents in the hydrothermal alkaline pretreatment of sugarcane bagasse, enzymatic saccharification and cellulosic ethanol production.....	106
1.Introduction.....	107
2. Material and methods	108
2.1. Sugarcane bagasse	108
2.2. Hydrothermal Pretreatment	109
2.2.1. Use of oxidizing agents	109
2.3. Microorganism.....	109

2.4. Enzymes production by solid-state fermentation (SSF)	109
2.5. Endoglucanase activity	110
2.6. Enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse.....	110
2.6.1 Optimization of enzymatic saccharification conditions	111
2.7. Analytical methods	112
2.8. Scanning electron microscopy	113
3. Results and discussion	114
3.1. Analysis of sugarcane bagasse lignocellulosic fractions	114
3.2. Enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse.....	119
3.2.1. Influence of the oxidizing agents used in the hydrothermal pretreatment.....	119
3.2.2. Influence of hydrogen peroxide concentration, sugarcane bagasse and enzyme loading	120
3.2.3. Influence of hydrogen peroxide concentration on pretreatment on the composition of sugarcane bagasse	125
3.2.4. Influence of time and temperature	128
3.3. Alcoholic fermentation inhibitors	131
3.2.5. Scanning electron microscopy of sugarcane bagasse	132
6. Conclusions	134
7. Acknowledgements	135
8. References	135
Capítulo 3	
Degradation of phenolic compounds by ligninases from <i>Pycnoporus sanguineus</i> MCA 16 during enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse.....	142
1. Introduction.....	143
2. Material and methods	145
2.1. Lignocellulosic substrates.....	145
2.2. Ligninases activities	145
2.3. Ligninases physico-chemical characterization	146
2.3.1 Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability	146
2.3.2. Effect of glucose, ions, organic and inorganic compounds.....	147

2.4. Sugarcane bagasse hydrothermal alkaline pretreatment	148
2.5. Enzymes production.....	148
2.6. Degradation of phenolic compounds by ligninases in the enzymatic extract ...	148
2.7. Enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse.....	149
2.8. Action of ligninases on phenolic compounds during enzymatic saccharification	149
2.9. Analytical Methods	149
2.10. Scanning electron microscopy.....	150
3. Results and discussion	150
3.1. Ligninases physico-chemical characterization	150
3.2. Effect of chemical compounds on ligninases activities.....	156
3.3. Degradation of phenolic compounds by the ligninases in the enzyme solution	156
3.4. Degradation of phenolic compounds by the ligninases during pretreated sugarcane bagasse enzymatic saccharification.....	158
3.5. Morphological analysis of sugarcane bagasse after enzymatic saccharification	161
4. Conclusions	-
5. Acknowledgements	163
6. References	163

Introdução

A produção de celulases, xilanases e ligninases microbianas visando a utilização em processos de obtenção de etanol de segunda geração tem despertado o interesse da comunidade científica nos últimos anos. Tais enzimas podem ser produzidas por microrganismos, especialmente fungos filamentosos, quando cultivados em resíduos lignocelulósicos (agroindustriais, florestais e urbanos) como substratos (MORETTI et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2016a; PEREIRA et al., 2016b; MARQUES et al., 2018; OLIVEIRA et al. 2018). Entre os diversos resíduos empregados com esta finalidade estão o bagaço de cana-de-açúcar, o farelo de trigo, o sabugo e a palha de milho, a palha e a casca de arroz, o farelo de soja, a cevada e a casca de café e a casca de frutas como maracujá entre outros (FERRAREZI et al., 2014; MORETTI et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). Estes resíduos são abundantes no Brasil, especialmente o bagaço de cana-de-açúcar, constantemente gerado em grande volume pela indústria sucroalcooleira.

Os basidiomicetos destacam-se entre os fungos filamentosos produtores de enzimas de degradação da biomassa vegetal, especialmente por serem capazes de produzir, além das celulases e hemicelulases, as ligninases (SIGOILLOT et al., 2012), Tais enzimas são importantes no contexto de obtenção de etanol de segunda geração, uma vez que removem a lignina residual presente no material lignocelulósico pré-tratado, favorecendo o acesso das enzimas sacarificantes aos seus substratos. Além disso, podem remover os compostos fenólicos presentes nos hidrolisados, gerados durante o processo.

Dentre os vários tipos de pré-tratamentos empregados com a finalidade de desorganizar/remover a lignina do material lignocelulósicos citados na literatura está o hidrotérmico alcalino. Neste pré-tratamento, o uso de hidróxido de sódio leva à remoção da lignina, solubilizando-a, além de promover o enturgescimento da celulose nativa resultando em uma celulose menos cristalina, com baixo grau de polimerização e com maior área de superfície, o que facilita a sua exposição e acessibilidade às celulases (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2009; LEE; HAMID; ZAIN, 2014; SANTOS et al., 2012; TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

Para facilitar a degradação da lignina, o uso de agentes oxidantes como o permanganato de potássio, óxido de zinco, dióxido de titânio e peróxido de hidrogênio, pode complementar o processo de pré-tratamento hidrotérmico alcalino. Tais agentes têm sido empregados em processos de tratamento de águas residuárias e de detoxicação de ambientes, sendo citados como vantajosos pela eficácia de conversão de compostos orgânicos em inorgânicos (DASH; PATEL; MISHRA, 2009; KADLA; CHANG, 2001; KHAN; NAJEEB; TUIYEBAYEVA, 2014; MA et al., 2015; XU et al., 2005; YU et al., 2015; ZHANG, 2013).

Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou utilizar soluções enzimáticas produzidas pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* MCA 16, a partir de cultivos em diferentes substratos lignocelulósicos, na sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado. Os pré-tratamentos utilizados foram hidrotérmicos alcalinos com e sem o uso de agentes oxidantes. As sacarificações enzimáticas foram realizadas empregando-se ferramentas de planejamento experimental, tendo como resposta a liberação de glicose nos hidrolisados.

As ligninases produzidas pelo fungo foram avaliadas quanto à eficácia no processo de remoção de compostos fenólicos presentes nos hidrolisados, visando diminuir a influência dos mesmos sobre as celulasas, bem como visando a obtenção de hidrolisados menos tóxicos aos microrganismos fermentadores. Os resultados de todas as análises foram separados em capítulos, sendo o primeiro sobre a produção das enzimas, sacarificação e fermentação alcoólica, o segundo sobre uso de agentes oxidantes sob o pré-tratamento hidrotérmico alcalino e sacarificação e, por fim, o terceiro avaliando a ação das ligninases sobre os compostos fenólicos totais.

4. Conclusions

Ligninases of enzyme solution from *P. sanguineus* MCA 16 cultivation were able to degrade total phenolic compounds after enzymatic saccharification step. Lacase and LiP showed activation during the enzymatic saccharification, demonstrating that the degradation of total phenolic compounds is probably exerted by these enzymes. Another important aspect was the morphological structure of sugarcane bagasse after the bioprocess. As enzymatic pretreatment, the enzymes present in the enzymes solution promoted a greater disorganization of the lignocellulosic fiber and pores were generated and facilitating the access of the enzymes on the sugarcane bagasse.

5. Acknowledgements

The authors thank to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support, to the State University of São Paulo, to the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology and to the Laboratory of Sucochemistry and Analytical Chemistry of Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, São José do Rio Preto and to the Laboratory of Microbial Enzymes of the Institute of Chemistry, Araraquara, São Paulo, Brazil.

6. References

- ABDEL-HAMID, A.M., SOLBIATI, J.O., CANN, I.K.O. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. **Adv. in App. Microbiol.** 82, 1-28, 2013.
- ARANTES, V., SADDLER, J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Biofuels** 4, 1-17, 2011.
- BALA, A., SAPNA, JAIN, J., KUMARI, A., SINGH, B. Production of an extracellular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid state fermentation and its application in dephytinization. **Biocatal. Agric. Biotechnol.** 3, 259–264, 2014.

- BRIJWANI, K., RIGDON, A., VADLANI, P. V. Fungal Laccases : Production , Function , and Applications in Food Processing. **Enzyme Research** 2010, 1-11, 2010.
- BUSWELL, J. A, CAI, Y., CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiol. Lett.** 128, 81–87, 1995.
- DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., SYED, T.A., QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.** 1, 36–50, 2010.
- DULF, F.V., VODNAR, D.C., SOCACIU, C. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. **Food Chem.** 209, 27–36, 2016.
- ERIKSSON, K.-E.L., BERMEK, H. Lignin, Lignocellulose, Ligninase. **Encycl. Microbiol.** 373–384, 2009.
- FALADE, A.O., NWODO, U.U., IWERIEBOR, B.C., GREEN, E., MABINYA, L. V., OKOH, A.I. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **Microbiologyopen** 6, 1–14, 2017.
- FENG, Y., COLOSI, L.M., GAO, S., HUANG, Q., MAO, L. Transformation and removal of tetrabromobisphenol from water in the presence of natural organic matter via laccase-catalyzed reactions: Reaction rates, products, and pathways. **Environ. Sci. Technol.** 47, 1001–1008, 2013a.
- FENG, Y., MAO, L., CHEN, Y., GAO, S. Ligninase-mediated transformation of 4,4-dibromodiphenyl ether (BDE 15). **Environ. Sci. Pollut. Res.** 20, 6667–6675, 2013b.
- FERHAN, M., LEAO, A.L., MELO, I.S., YAN, N., SAIN, M. Ligninases Production and Partial Purification of Mnp from Brazilian Fungal Isolate in Submerged Fermentation. **Ferment. Technol.** 01, 1–7, 2012.
- FUJIAN, X., HONGZHANG, C., ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (lip) and manganese peroxidase (mnp) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. **Bioresour. Technol.** 80, 149–151, 2001.

- HERNÁNDEZ-ORTEGA, A., FERREIRA, P., MARTÍNEZ, A.T. Fungal aryl-alcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 93, 1395–1410, 2012.
- KOLB, M., SIEBER, V., AMANN, M., FAULSTICH, M., SCHIEDER, D. Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. **Bioresour. Technol.** 104, 298–304, 2012.
- MARTÍN-SAMPEDRO, R., EUGENIO, M.E., CARBAJO, J.M., VILLAR, J.C. Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping. **Bioresour. Technol.** 102, 7183–9, 2011.
- MARTINS, S., MUSSATTO, S.I., MARTÍNEZ-AVILA, G., MONTAÑEZ-SAENZ, J., AGUILAR, C.N., TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnol. Adv.** 29, 365–373, 2011.
- MCCUE, P., HORII, A., SHETTY, K. Mobilization of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Lentinus edodes* during solid-state bioprocessing¹ is associated with enhanced production of laccase. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.** 5, 385–392, 2004.
- QIN, L., LI, W.-C., LIU, L., ZHU, J.-Q., LI, X., LI, B.-Z., YUAN, Y.-J. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–10, 2016.
- RASHAD, M.M., MAHMOUD, A.E., ABDOU, H.M., NOOMAN, M.U. Improvement of nutritional quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue. **African J. Biotechnol.** 10, 5504–5513, 2011.
- RIVA, S., MOLECOLARE, R., BIANCO, V.M. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends Biotechnol.** 24, 219–226, 2006.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 3ª. Ed. Campinas: Ed. Cárita, 2014.

- RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A., MALOVANÁ, S., PÉREZ, J.P., BORGES, T., GARCÍA MONTELONGO, F.J. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **J. Chromatogr. A** 912, 249–257, 2001.
- SALAR, R.K., CERTIK, M., BREZOVA, V. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *thamnidium elegans* CCF 1456. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 17, 109–116, 2012.
- SINGH, A., PANT, D., KORRES, N.E., NIZAMI, A.-S., PRASAD, S., Murphy, J.D. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives. **Bioresour. Technol.** 101, 5003–5012, 2010.
- SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteau reagent. **Methods Enzymol.** 299, 152–178, 1999.
- TAPIA-TUSSELL, R., PÉREZ-BRITO, D., TORRES-CALZADA, C., CORTÉS-VELÁZQUEZ, A., ALZATE-GAVIRIA, L., CHABLÉ-VILLACÍS, R., SOLÍS-PEREIRA, S. Laccase gene expression and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* strain Bm-2. **Molecules** 20, 15147–15157, 2015.
- TIEN, M., KIRK, T.K. METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 161 Copyright © 1988 by Academic Press, Inc. All rights of reproduction in any form reserved. **Methods** 161, 6080–6080, 1988.
- TOYAMA, N., OGAWA, K., 1978. Cellulase production of *Trichoderma viride* in solid and submerged culture methods, in: Ghose, T. (Ed.), *Bioconversions of Cellulosic Substrates for Energy, Chemicals and Microbial Protein*. New Delhi.
- TROVASLET, M., ENAUD, E., GUIAVARC'H, Y., CORBISIER, A.-M., VANHULLE, S., 2007. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme Microb. Technol.** 41, 368–376. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.03.007
- VERMA, P., MADAMWAR, D. Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 102–103, 109–118, 2002.

WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Adv.** 22, 161–187, 2003.

XIMENES, E., KIM, Y., MOSIER, N., DIEN, B., LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme Microb. Technol.** 48, 54–602011.

ZHENG, Z., SHETTY, K. Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. **J. Agric. Food Chem.** 48, 895–900, 2000.