

## EMPREGO DE SURFACTANTES NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CAPIM-ELEFANTE

Angélica Luisi Scholl, Daiane Menegol, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola

Universidade de Caxias do Sul - Instituto de Biotecnologia - Laboratório de Enzimas e Biomassas

### INTRODUÇÃO

Com a atual busca por fontes energéticas renováveis, o uso de resíduos lignocelulósicos, como o capim-elefante, apresenta-se como uma alternativa para a produção de etanol. Um dos processos estudados para o aproveitamento desta biomassa é a hidrólise enzimática, na qual empregam-se enzimas – celulasas e xilanasas – que hidrolisam a celulose em açúcares fermentáveis. Entre os microrganismos que produzem simultaneamente celulasas e xilanasas, encontram-se as linhagens mutantes de *Penicillium echinulatum*, cujas enzimas apresentam estabilidade a 50°C, condição relevante para aplicação destas enzimas em hidrólise enzimática e, ainda, contêm  $\beta$ -glicosidasas em maior proporção que o *T. reesei*. Porém, durante a hidrólise enzimática, as celulasas diminuem sua atividade, devido a sua adsorção sobre a celulose, neste sentido a adição de surfactantes durante a hidrólise contribui para modificar as propriedades da celulose, minimizando a ligação irreversível das celulasas sobre a celulose. Neste trabalho, avaliou-se a hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* em diferentes granulometrias (entre 200 e 100 *mesh*, 48 *mesh*, 28 *mesh* e entre 4 e 14 *mesh*), empregando o complexo enzimático de *P. echinulatum*.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Linhagens:

Para a realização da hidrólise enzimática foram utilizadas enzimas - celulasas e xilanasas – obtidas em cultivo em estado sólido, a partir da linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum*. A linhagem utilizada pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do IB/UCS.

#### Crescimento e manutenção de linhagens:

As culturas foram desenvolvidas em tubos de ensaio contendo o meio de crescimento, incubadas por 7 dias a 28 °C até a formação de conídios. Os tubos foram estocados a 4 °C até serem utilizados para a preparação de suspensões de conídios para produção de enzimas.

#### Cultivo em estado sólido:

Foi conduzido em bandejas contendo cerca de 100 g de substrato (farelo de trigo e capim-elefante *in natura*) embebido com 100 mL de solução de sais minerais (Mandels & Reesei, 1957). Estes sistemas foram autoclavados a 121 °C por 30 min. Após, inoculados com  $1 \times 10^6$  conídios.g<sup>-1</sup> de massa seca. A umidade relativa foi mantida em torno de 95%, em temperatura de 28-30 °C, por 5 dias.

Após, foi realizada a extração enzimática (200 mL de água destilada em temperatura de 4 °C foram adicionados a cada sistema. O meio foi homogeneizado e em seguida, 340 mL de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8, foram acrescentados). As amostras foram filtradas, sendo que as atividades enzimáticas foram determinadas.

#### Hidrólise enzimática de capim-elefante:

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com Adsul *et al.* (2005), com algumas modificações. Em frascos de 50 mL foram adicionados 50 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8; 50 mM) e 0,5g de capim-elefante *in natura* em diferentes granulometrias (entre 200 e 100 *mesh*, 48 *mesh*, 28 *mesh* e entre 4 e 14 *mesh*), foram incubadas com caldo enzimático (10 FPU/g de substrato) na presença de 0,01% (m/v) de azida sódica. As amostras foram tratadas com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de Tween 80® ou Triton X-100®, e as que não receberam tratamento, foram utilizadas como controle. Esta mistura foi incubada a 50 °C, sob agitação de 150 rpm, por 72 horas. Volume de 1 mL foi coletado em diversos intervalos de tempo para análises de açúcares redutores (Miller, 1959).

Foram determinadas as atividades do caldo enzimático que foi empregado na hidrólise e todas as hidrólises foram realizadas em triplicata.

#### Dosagem dos açúcares redutores totais da hidrólise do capim-elefante:

Os açúcares redutores presentes nas soluções provenientes da hidrólise enzimática foram dosados pelo método de Miller (1959). Foi construída uma curva padrão com soluções 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2 mg/mL de glicose para a quantificação dos açúcares liberados.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a hidrólise foi favorecida com a adição de surfactantes.

Foram observadas liberações de  $516,02 \pm 48,27$  mg.gms<sup>-1</sup> para o tratamento realizado sem a adição de surfactante. Já para os tratamentos com surfactantes foram observadas liberações de  $566,92 \pm 22,00$  mg.gms<sup>-1</sup> e  $717,02 \pm 5,70$  para Tween 80® e Triton X-100®, respectivamente.

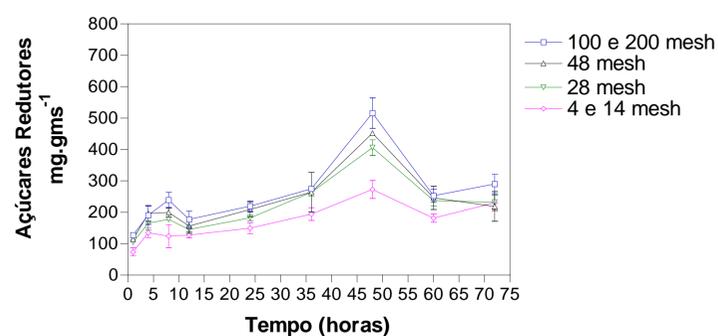


Fig. 1: Liberação de açúcares redutores por hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* em função da granulometria. Os valores apresentados na legenda referem-se à granulometria do substrato sem adição de surfactante. Empregou-se uma concentração enzimática de 10 FPU.g<sup>-1</sup>.

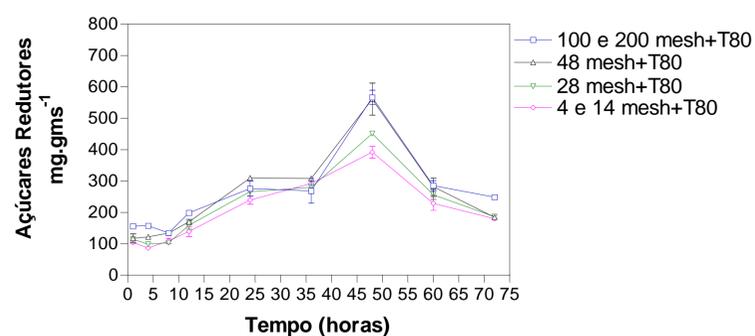


Fig. 2: Liberação de açúcares redutores por hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* em função da granulometria. Os valores apresentados na legenda referem-se à granulometria do substrato em tratamentos com Tween 80®. Empregou-se uma concentração enzimática de 10 FPU.g<sup>-1</sup>.

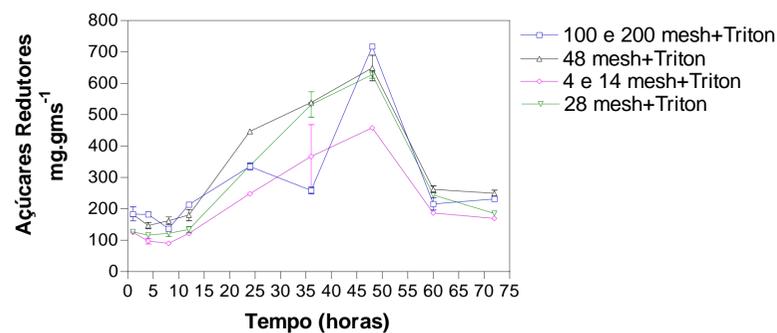


Fig. 3: Liberação de açúcares redutores por hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* em função da granulometria. Os valores apresentados na legenda referem-se à granulometria do substrato em tratamentos com Triton X-100®. Empregou-se uma concentração enzimática de 10 FPU.g<sup>-1</sup>.

### CONCLUSÃO

Estes dados, embora preliminares, indicam a importância da utilização de surfactantes para melhorar a eficiência das hidrólises enzimáticas de lignocelulósicos. Além, disso, a utilização de biomassas alternativas, tal como o capim-elefante, constitui-se em um importante acesso biotecnológico para obtenção de combustíveis renováveis, com um menor potencial poluente que os combustíveis fósseis.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Shaikh, H.; Singh, R.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma A.J. (2005). Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carb. Polym.* 62: 6-10.
- Converse, A. O.; Matsuno, R.; Tanaka, M.; Taniguchi, M. (1988). A model for enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme *Biotechnol. Bioeng.* 32: 38 – 45.
- Mandels, M.; Weber, J. (1969). The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.* 95: 391-414.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chemis.* 31: 426-428.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96: 673-686.