



## SUPLEMENTAÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS APLICADOS NA SACARIFICAÇÃO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR

*Victor Hugo Salvador<sup>1</sup>; Dyoní Matias de Oliveira<sup>2</sup>; Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>3</sup>,  
Wanderley Dantas dos Santos<sup>4</sup>*

**RESUMO:** O etanol pode ser produzido a partir dos açúcares que compõem a biomassa lignocelulósica utilizando-se processos enzimáticos capazes de promover a sacarificação dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis. Contudo, a presença de lignina e compostos fenólicos dificulta o acesso das hidrolases. O desenvolvimento de plantas com lignina modificada e/ou menor conteúdo de lignina poderá contribuir aumentar o poder nutricional de forragens e reduzir os custos na produção de papel e celuloses. Além disso, juntamente com a otimização dos coquetéis enzimáticos poderá viabilizar a produção de etanol celulósico a custos competitivos com o petróleo. Colmos de cana-de-açúcar tratados com inibidores da via de lignificação foram secados, moídos e submetidos à sacarificação com diferentes coquetéis enzimáticos. Os diferentes coquetéis enzimáticos apresentaram tempo ótimo de sacarificação similar (1 h). Todos os coquetéis foram positivamente afetados pela presença de hemicelulases. A aplicação *in vivo* de inibidores da lignificação e a suplementação dos coquetéis com hemicelulases, principalmente xilanase, contribuíram para a melhorar a sacarificação da biomassa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Celulase; Hemicelulase; Xilanase; Digestibilidade.

### 1. INTRODUÇÃO

Na produção do bioetanol lignocelulósico, a biomassa é submetida à hidrólise enzimática para a desconstrução da parede celular de forma coordenada. A aplicação de coquetéis enzimáticos formados com diferentes enzimas desponta como alternativa para a degradação completa da biomassa lignocelulósica. Tais coquetéis são constituídos de celulasas, hemicelulases e enzimas acessórias, que agem sinergicamente reduzindo problemas de inibição pelo produto (Bhat & Bhat, 1997).

As celulasas são formadas por endoglucanases que hidrolisam a celulose internamente de maneira aleatória, as exoglucanases (celobiohidrolases) que removem dímeros (celobiose) das extremidades da celulose, atuando inclusive sobre a sua forma cristalina e desta maneira produzindo substratos para as  $\beta$ -glucosidases, que promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celo-oligossacarídeos (Grange et al., 2010). O xilano, o maior componente hemicelulósico presente na biomassa lignocelulósica, é hidrolisado por endoxilanases liberando xilo-oligossacarídeos (Collins et al., 2005). A aplicação de celulasas e hemicelulases em

<sup>1</sup> Doutorando em Ciências Biológicas área de concentração Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. victorhsalvador@hotmail.com

<sup>2</sup> Acadêmico do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná.

<sup>3</sup> Professor Doutor do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná.

<sup>4</sup> Professor Doutor do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Umuarama – Paraná.

sinergia contribui para a otimização do processo de sacarificação e desponta como possibilidade para a suplementação de coquetéis enzimáticos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência hidrolítica a partir da suplementação de coquetéis enzimáticos aplicados em biomassa de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento *in vivo* com inibidores de duas enzimas da via de lignificação, o ácido piperonílico (PIP) e o ácido metilenodioxicinâmico (MDCA).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. PROCEDIMENTOS GERAIS

Colmos de cana-de-açúcar (variedade RB966928) foram seccionados, homogeneizados e colocados em bandejas com areia e água por 15 dias para enraizamento. Em seguida, foram plantados em vasos de 14 litros e cultivados por 60 dias em casa de vegetação. Após os 60 dias, foi iniciado o tratamento por 30 dias com 120  $\mu\text{M}$  de MDCA, 100  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$  de PIP, controles foram irrigados com água destilada. Ao final deste período, as plantas foram colhidas, separadas em suas diferentes partes e pesadas para obtenção da biomassa fresca. Colmos foram secos em estufa com circulação de ar a 60 °C até peso constante e considerado como biomassa seca. Os colmos, após secos, foram triturados em moinho de esfera por 5 minutos e considerados como bagaço de cana.

### 2.2. RETIRADA DE AÇÚCARES SOLÚVEIS DO BAGAÇO DE CANA

Para a retirada de açúcares solúveis do bagaço de cana, as amostras foram incubadas em etanol (80%, 80°C, 20 min) e centrifugadas (13.000 g, 10 min). O procedimento foi repetido (cerca de 8 vezes) a fim de extrair todo o açúcar solúvel. Ao final, uma alíquota do sobrenadante foi testada sucessivamente a cada lavagem para detectar a presença de açúcares solúveis pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956). Extratos de parede celular, livres de açúcares solúveis, foram lavados com água (8x, 13.000 g, 25°C) para remover o etanol. O precipitado insolúvel foi utilizado nas etapas seguintes.

### 2.3. PREPARO DOS COQUETÉIS ENZIMÁTICOS

As enzimas utilizadas foram obtidas junto a Novozyme<sup>®</sup>, sendo elas: Complexo de Celulase,  $\alpha$ -glucosidase, hemicelulase, xilanase e complexo enzimático (composto por: arabinase,  $\alpha$ -glucanase, hemicelulase, pectinase e xilanase). Foram feitos coquetéis com duas ou três destas enzimas, além de analisar a enzima xilanase individualmente. As quantidades das enzimas em cada coquetel seguiram as recomendações contidas no manual da empresa. Os coquetéis foram montados de acordo com o quadro 1.

**Quadro 1.** Distribuição das enzimas nos coquetéis enzimáticos.

Coquetel	Complexo de Celulases (U g <sup>-1</sup> )	$\alpha$ -glucosidase (U g <sup>-1</sup> )	Hemicelulases (U g <sup>-1</sup> )	Complexo enzimático (U g <sup>-1</sup> )	Xilanase (U g <sup>-1</sup> )
<b>CGH 3%</b>	30	8	14	-	-
<b>CGH 4%</b>	40	10	19	-	-
<b>CXG</b>	40	10	-	-	125
<b>ECX</b>	40	-	-	55	125

<b>X</b>	-	-	-	-	125
----------	---	---	---	---	-----

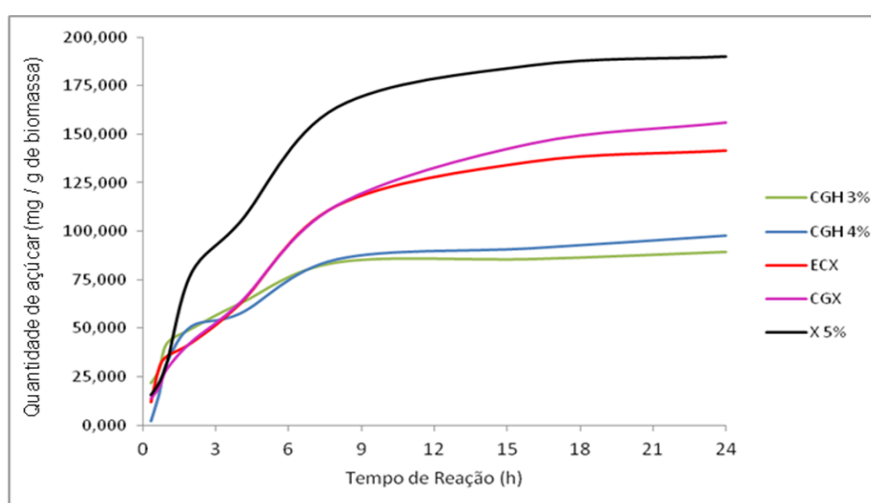
**Legenda:** O hífen indica ausência da respectiva enzima/complexo enzimático.

## 2.4 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

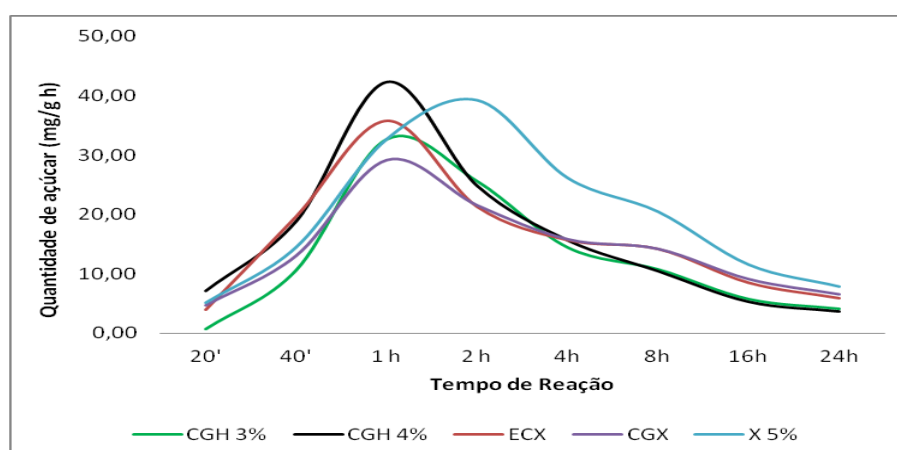
Amostras de bagaço (10 mg) foram ressuspendidas em tampão citrato de sódio 100 mM pH 5,0 juntamente com os coquetéis e incubados por diferentes as reações foram conduzidas por 20, 40 minutos, 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas a 50°C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14000g e do sobrenadante foram analisados os açúcares liberados pelo método fenol-sulfúrico a 490 nm (Dubois et al., 1956), utilizando sacarose como padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, utilizando bagaço controle, uma análise dos coquetéis foi feita a fim de obter algumas informações, como tempo de saturação da atividade enzimática (Figura 1) e tempo ótimo de reação (Figura 2).



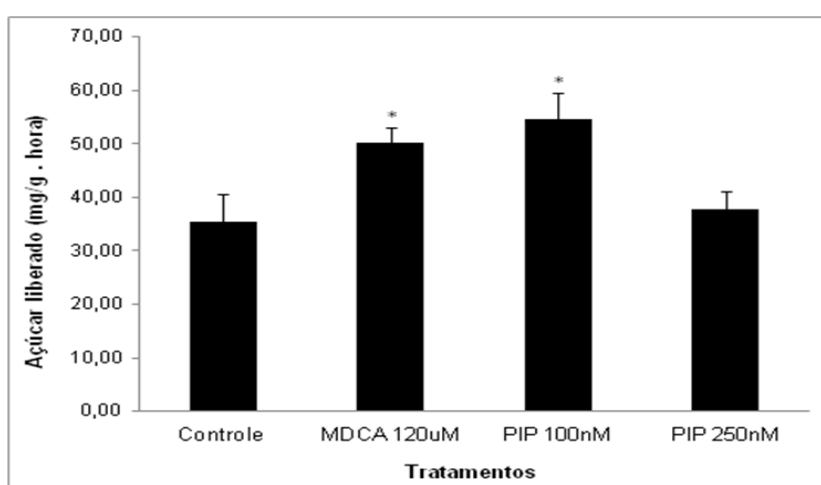
**Figura 1.** Curvas de saturação da atividade enzimática dos diferentes coquetéis utilizados. (N=3 para cada tempo).



**Figura 2.** Curvas do tempo ótimo de reação dos diferentes coquetéis utilizados. (N=3 para cada tempo)

A Figura 1 mostra que o ponto de saturação em todos os coquetéis foi próximo ao tempo de 8 horas. Nota-se também uma leve diferença entre os coquetéis CGH 3% e CGH 4%, que deve ser devido a maior concentração do complexo de celulase no CGH 4%. Os coquetéis aditivados com xilanase apresentaram maior atividade enzimática.

Em relação à figura 2, com exceção da xilanase (X 5%), todos os coquetéis apresentaram seu tempo ótimo de reação em torno de 1 hora, indicando que o sinergismo na sacarificação da biomassa por coquetéis acelera a degradação, enquanto que a ação isolada da xilanase exige um tempo maior para hidrolisar a biomassa vegetal. Os coquetéis CGH 4% e X 5% apresentaram as maiores quantidades de açúcares liberados por hora de reação, enquanto que o coquetel CGX foi o que menos liberou açúcar do colmo, confirmando o efeito positivo das hemicelulases para a hidrólise enzimática (Grange et al., 2010). Com base nestes dois experimentos, a X 5% foi escolhida para testar a digestibilidade da cana-de-açúcar submetida a diferentes tratamentos para reduzir o conteúdo de lignina. Os resultados obtidos da digestibilidade podem ser visualizados na figura 3.



**Figura 3.** Análise da digestibilidade dos diferentes tratamentos utilizado a enzima xilanase (X 5%), no tempo de 2 horas. Valores médios ( $N=4 \pm$  erro padrão da média) marcados com \* são diferentes significativamente ( $p \leq 0,05$ , teste  $t$  – Student).

A figura 3 revela um aumento significativo na quantidade de açúcar liberado nos tratamentos com MDCA 120  $\mu$ M e PIP 100  $\eta$ M em relação ao controle. Isto indica que estes tratamentos afetaram a recalcitrância da parede celular, melhorando a digestibilidade da biomassa vegetal.

#### 4. CONCLUSÃO

A suplementação de hemicelulases, principalmente xilanase, em coquetéis enzimáticos, contribui para a melhoria da sacarificação. Este efeito é potencializado em biomassas menos recalcitrantes.

#### 5. REFERÊNCIAS

BHAT, M.K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, 15(3/4), 583-20, 1997.

COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, 3–23, 2005.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, 28(3), 350-356, 1956.

GRANGE, D.C.L., HAAN, R., ZYL, W.H.V. Engineering cellulolytic ability into boprocessing organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87, 1195–1208, 2010.