



## EFEITO DE TRITON X-100 NA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

*Dyoni Matias de Oliveira<sup>1</sup>; Aline Finger-Teixeira<sup>2</sup>; Victor Hugo Salvador<sup>3</sup>; Thatiane Rodrigues Mota<sup>3</sup>; Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>4</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>5</sup>.*

**RESUMO:** A utilização de biomassa vegetal na produção de biocombustíveis desponta como alternativa para substituir os combustíveis fósseis. Esta biomassa é constituída majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é hidrolisada pelas endoglucanases,  $\beta$ -glicosidases e exoglucanases, genericamente chamadas de celulases. A hemicelulose é altamente ramificada e exige diversas enzimas para sua hidrólise completa, sendo a xilanase a mais utilizada para degradar as cadeias de xilano, principal hemicelulose das gramíneas. Tanto as celulases quanto as hemicelulases são necessárias no processo de sacarificação enzimática. Há relatos de que a adição de surfactantes neste processo afeta a digestibilidade positivamente. Neste trabalho, relatamos o efeito do Triton X-100 na digestibilidade de dois substratos, bagaço de cana-de-açúcar e celulose microcristalina, utilizando xilanase e celulase, respectivamente. O uso combinado das enzimas e Triton X-100 reduziu a digestibilidade dos substratos nos tempos de 30, 60 e 120 minutos de hidrólise. Com o aumento das concentrações do surfactante (0,1%, 0,2%, 0,5%, 1% e 2%) foram observadas reduções da produção de açúcares redutores a partir do bagaço. Novos estudos devem ser realizados a fim de compreender melhor o papel dos surfactantes e buscar surfactantes que melhorem o processo de sacarificação enzimática em diferentes biomassas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Digestibilidade; Surfactantes não-iônicos; Xilanases; Celulases.

### 1. INTRODUÇÃO

A utilização da biomassa vegetal como fonte de energia renovável vem apresentando uma importante contribuição para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável. A biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar, apontada como principal biomassa para a produção de bioetanol de segunda geração é constituída, principalmente, de celulose (38-50%), hemicelulose (23-32%) e lignina (15-30%) (pauly & Keegstra, 2010; Sierra et al., 2008).

Na produção do bioetanol de segunda geração, a biomassa é submetida a pré-tratamento para desestruturar o complexo lignina-carboidrato. Após este processo, são utilizados coquetéis enzimáticos para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Tais coquetéis são constituídos de celulases, hemicelulases e enzimas acessórias. As celulases são constituídas por três enzimas: as endoglucanases hidrolisam internamente a cadeia de celulose liberando oligossacarídeos, as exoglucanases realizam a hidrólise dos oligossacarídeos produzindo celobiose, o substrato para a  $\beta$ -glicosidase, liberando glicose como produto final (Gottschalk et al., 2010). Dentre as hemicelulases, as xilanases

<sup>1</sup> Acadêmico do curso de Ciências Biológicas e bolsista PIBIC/CNPq no Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. dyoni\_matias@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Pós-doutoranda no Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná.

<sup>3</sup> Pós-graduandos no Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná.

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

<sup>5</sup> Professor Doutor do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Umuarama – Paraná

são as mais extensivamente utilizadas, elas clivam internamente as cadeias de xilano produzindo substrato com extremidades sobre as quais 1,4- $\beta$ -xilosidases atuam liberando xilose (Gottschalk et al., 2010).

Diferentes tecnologias estão sendo propostas para a hidrólise da biomassa, sendo a hidrólise enzimática a que possui alto potencial para reduzir os custos e melhorar a eficiência do processo (Mussato et al., 2010).

Surfactantes adicionados durante a hidrólise enzimática podem interferir na atividade e estabilidade das enzimas e afetar as interações entre enzima-substrato, possuindo, frequentemente, efeito positivo sobre a digestibilidade (Kim et al., 2006). A literatura relata uma melhoria da digestibilidade com adição de surfactantes não-iônicos (ex: Tween 20, Tween 80, Triton X-100) e redução com surfactantes iônicos (Alkasrawi et al., 2003). Entretanto, ainda não se conhece exatamente o mecanismo deste aumento. Acredita-se que o surfactante possa: 1) mudar a ultra-estrutura do substrato, tornando a lignocelulose mais acessível ao ataque enzimático; 2) aumentar a estabilidade térmica da enzima; 3) afetar na interação enzima-substrato (MacLellan, 2010). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do Triton X-100 na digestibilidade da biomassa de cana-de-açúcar e celulose microcristalina utilizando xilanase e celulase comerciais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 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.

### 2.2 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Amostras de substrato, bagaço de cana (15 mg) e celulose microcristalina (CMC, 10 mg) foram ressuspendidas em tampão citrato de sódio 100 mM pH 5,0 com xilanase 25 U g<sup>-1</sup> (Novozyme®) e celulase 20 U g<sup>-1</sup> (Novozyme®), respectivamente, Triton X-100 0,2% (v/v), e incubados a 50°C por diferentes tempos. Após incubação, do sobrenadante foram analisados os açúcares redutores liberados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959), utilizando glicose como padrão.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta os dados de digestibilidade do bagaço com xilanase e CMC com celulase em diferentes tempos de hidrólise (0, 30, 60 e 120 minutos), demonstrando que o uso combinado com Triton X-100 reduziu a eficiência do processo em todos os tempos e substratos testados, uma resposta contrária àquela descrita na literatura para surfactantes não-iônicos (Alkasrawi et al., 2003; Maclellan, 2010, Park et al., 1992). Foram avaliadas diferentes concentrações do surfactante (0,1%, 0,2%, 0,5%, 1% e 2%) na atividade da xilanase em 60 minutos de hidrólise e foi observado uma redução na produção de açúcares com o concomitante aumento da concentração do surfactante

(Figura 2). Na maior concentração avaliada (2%) a atividade relativa foi reduzida à 50%, demonstrando o efeito negativo do surfactante na sacarificação.

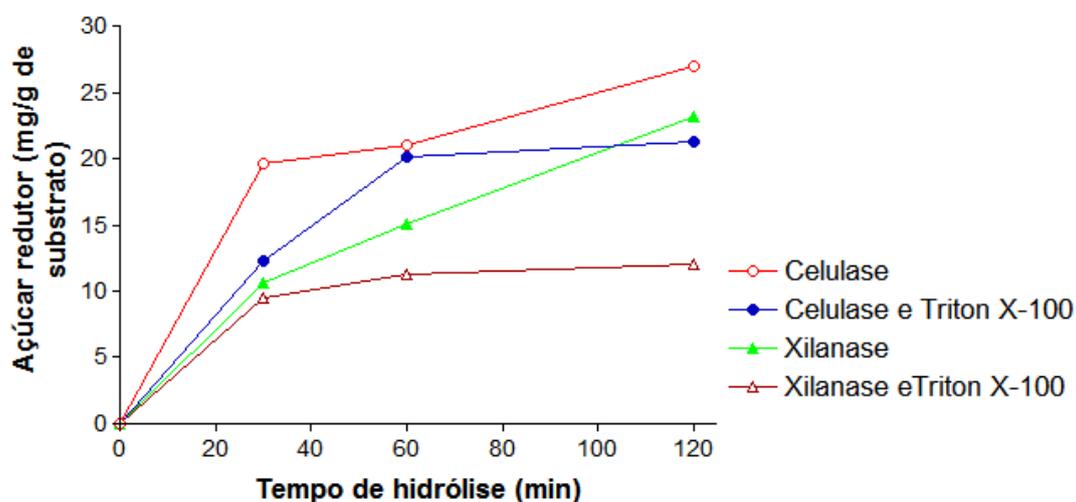


Figura 1 - Hidrólise enzimática de bagaço de cana e CMC.

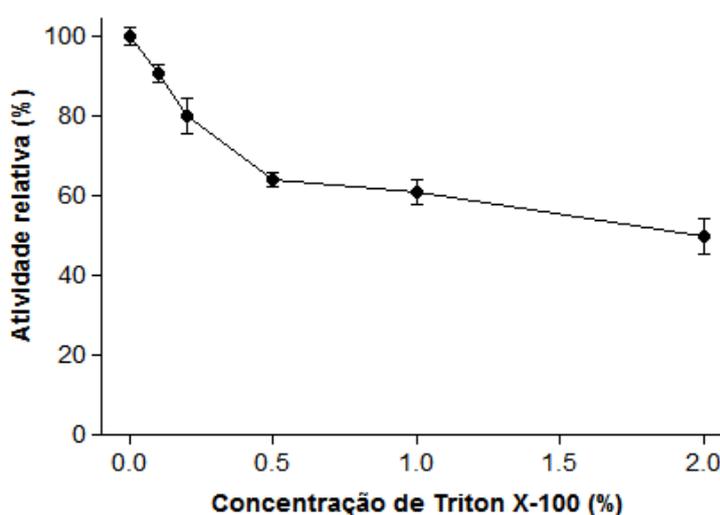


Figura 2 – Atividade relativa da xilanase em diferentes concentrações de Triton X-100.

#### 4. CONCLUSÃO

O uso combinado das enzimas com Triton X-100 durante a sacarificação reduziu a produção de açúcares a partir de diferentes substratos, um efeito diferente do descrito na literatura para surfactantes não-iônicos. Os resultados sugerem que a interação entre enzimas hidrolíticas, biomassa e surfactantes é mais complexa do que se discute na literatura e precisa ser mais bem estudada. A metodologia relatada neste resumo oferece um contraponto que pode ser útil no aprofundamento da compreensão do fenômeno e ajudar a buscar que atuem de modo sinérgico na sacarificação enzimática em diferentes materiais vegetais.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALKASRAWI, M., ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., WINGREN, A., GALB, M., TJERNELD, F., ZACCHI, G. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, 33, 71–78, 2003.
- 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.
- GOTTSCHALK, L.M.F., OLIVEIRA, R.A., BON, E.P.D.S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, 51, 72–78, 2010.
- KIM, S.B., KIM, H.J., KIM, C.J. Enhancement of the Enzymatic Digestibility of Waste Newspaper Using Tween. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 129(132), 2006.
- MACLELLAN, J. Strategies to enhance enzymatic hydrolysis of Cellulose in Lignocellulosic Biomass, **MMG 445 Basic Biotechnology**, 6, 31-35, 2010.
- MILLER, J.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3), 1959.
- MUSSATTO, S.I., DRAGONE, G., R.GUIMARÃES, P.M., SILVA, J.P.A., CARNEIRO, L.M., ROBERTO, I.C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, 28, 817–830, 2010.
- PARK, J.W., TAKAHATA, Y., KAJIUCHI, T., AKEHATA, T. Effects of Nonionic Surfactant on Enzymatic Hydrolysis of used Newspaper. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 117-120, 1992.
- PAULY, M., KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. **Current Opinion in Plant Biology**, 13, 305–312, 2010.
- SIERRA, R., SMITH, A., GRANDA, C., HOLTZAPPLE, M.T. Producing Fuels and Chemicals from Lignocellulosic Biomass. **SBE Special Section – Biofuels**, 10-18, 2008.