

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Influência de Biossurfactante Ramnolipídico na Hidrólise Enzimática de Papel de Escritório Descartado**

**Káren Gercyane Oliveira Bezerra, Bárbara Ribeiro Alves Alencar, Georon Ferreira de  
Sousa, Ester Ribeiro Gouveia.**

Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Biociências – Departamento de Antibióticos  
CEP: 50670-901 Recife – PE - E-mail: karengercyane@gmail.com

#### **RESUMO**

*Avaliou-se a influência da adição de biossurfactante sobre a hidrólise enzimática de papel de escritório. Os experimentos com a enzima Cellic Ctec 1 foram realizados com pré-tratamento em autoclave, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 e 1,0 % V/V). Comparou-se as hidrólises com biossurfactante e com Tween80. De uma forma geral, nas hidrólises a 0,5 % foram obtidas maiores conversões, de celulose e hemicelulose, independente da presença de aditivos. Entretanto, a presença do biossurfactante aumentou a conversão de celulose e hemicelulose em relação à hidrólise controle a 1,0 %. Apesar de as maiores conversões de celulose (> 50 %) e de hemicelulose (> 40 %) terem sido com Tween-80, estas conversões foram maiores 25 e 14 %, para celulose e hemicelulose, respectivamente, quando adicionado o biossurfactante. O que justifica estudos com maiores concentrações do biossurfactante, uma vez que, neste trabalho, a concentração utilizada foi 46 vezes menor do que a do surfactante químico.*

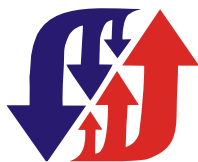
Palavras-chave: Conversão da Celulose e Hemicelulose, Biomassa Lignocelulósica, Biossurfactante.

#### **INTRODUÇÃO**

A hidrólise do material lignocelulósico é uma alternativa para a obtenção de açúcares, que podem ser fermentados gerando diversos produtos, como por exemplo biocombustíveis (OGEDA & PETRI, 2010).

O processo de hidrólise desses substratos pode ser realizado através da ação de um complexo enzimático, que é composto por endoglucanases, exoglucanases, e  $\beta$ -glucosidases. Com o intuito de otimizar a ação enzimática, faz-se necessário o uso de pré-tratamentos com soluções ácidas de baixa concentração, que tem, por função, provocar o inchaço na estrutura celulósica, permitindo que essas proteínas interajam mais fortemente com a matriz celulósica, principal porção de interesse do processo (AGBOR et al., 2011).

A fim de melhorar a hidrólise da celulose, estudos têm demonstrado que a adição de agentes tensoativos, como Tween 80 e Triton X-100, podem aumentar significativamente a conversão enzimática da celulose em açúcares redutores. Dentre os mecanismos propostos para essa ação do surfactante, estão que eles podem atuar sobre a membrana celular causando liberação de enzimas, e que podem aumentar a estabilidade da enzima e evitar a desnaturação destas durante a hidrólise (ZHOU et al., 2015). No entanto, os tensoativos quimicamente sintetizados não são biodegradáveis, e apresentam toxicidade para o meio ambiente (TU & SADDLER, 2010).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Biossurfactantes, por outro lado, têm atraído muita atenção devido à sua especificidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Os ramnolipídeos, biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, foram relatados com potencial de estímulo à hidrólise de biomassa lignocelulósica pelo aumento das atividades de celulasas e xilanase, reduzindo a necessidade de grandes quantidades de enzimas (WANG et al. 2011).

Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de um biossurfactante ramnolipídico, no aumento da eficiência da hidrólise enzimática de papel de escritório descartado, sobre diferentes condições de pré-tratamento ácido, comparando com os efeitos do surfactante químico, Tween 80.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Micro-organismo, Meio e Condições de Cultivo

*Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 569, cedida pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos foi utilizada neste trabalho. Para o inóculo, a linhagem liofilizada foi transferido para 50 mL de caldo nutriente, e mantida por 14 horas, a 28°C e 150 rpm em incubador rotativo (TE-422/Tecnal). Em seguida, uma suspensão de células de 2 % V/V foi inoculada em um frascos de 500 mL contendo 50 mL do meio mineral, como descrito por Patel & Desai (1997). Este meio continha glicerol (30 g/L) e NaNO<sub>3</sub> (6 g/L), como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente. Os frascos foram novamente acondicionados nas mesmas condições do inóculo. O cultivo foi realizado em replicata, durante 96 h. As amostras foram centrifugadas e o caldo livre de células foi usado para a quantificação e extração do biossurfactante.

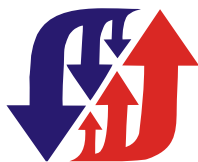
#### Quantificação e Extração do Ramnolipídeo

A quantificação do ramnolipídeo, expressa em termos de ramnose, foi realizada utilizando o método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A absorvância foi medida a 490 nm e a concentração de ramnolipídeo foi calculada utilizando uma curva padrão preparada com ramnose comercial.

Para a extração, um volume de 255 mL do sobrenadante sem células foi acidificado a pH 2,0 (HCl 2N) e guardado em geladeira por 16 horas. Posteriormente, a amostra foi colocado em um funil de separação, em frações de 50 mL, onde se adicionou a mesma quantidade de diclorometano (1:1 V/V). A fase orgânica foi levada ao evaporador rotativo (TE-210, TECNAL) para ser concentrado a uma temperatura de 40°C (OLIVEIRA, 2010). O concentrado obtido foi ressuspenso em 10 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,8).

#### Material Lignocelulósico, Pré-Tratamento e Métodos Analíticos

A biomassa utilizada foi papel de escritório descartado. O papel foi cortado no tamanho de 2 cm e 2,5 g foram colocados em erlenmeyers de 125 mL. O pré-tratamento foi realizado em autoclave, utilizando ácido sulfúrico (0,5% e 1%), durante 20 minutos, à 121°C e 1 atm. Posteriormente, após a retirada do ácido, foram adicionados, aos erlenmeyers, 50 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,8), 0,2 mL da enzima Celic Ctec 1, 0,2 mL de Tween 80 (4,22 g/L) e 2 mL do biossurfactante (0,102g/L). Foram realizadas três condições: 1- hidrólise sem surfactante



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

(HSS), 2- hidrólise com surfactante químico (HSQ), e 3 - hidrólise com biossurfactante (HSB), cada hidrólise em duas condições de pré-tratamento (0,5% e 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os frascos foram mantidos a 50°C e 150 rpm, durante 72 h, no incubador rotativo. As hidrólises foram realizadas em duplicata.

A quantificação dos carboidratos (glicose e xilose) nas amostras dos hidrolisados enzimáticos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Uma coluna Aminex HPX-87H<sup>+</sup> foi usada a 60°C, com uma fase móvel de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM), num fluxo de 0,6 mL/min. O detector por índice de refração foi utilizado.

### Tratamento Estatístico

Foi utilizado o Past para fazer a análise de variância.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na conversão da celulose não houve diferença significativa entre a HSS, HSB e HSQ a 0,5%, contudo a HSQ 0,5% obteve maior rendimento quando comparado as HSB e HSS, ambos a 1%, observando-se um aumento de 23,72% e 36,28%, respectivamente. A HSQ 1% obteve uma conversão 23,47% maior que a HSS 1%.

Quando são comparados os rendimentos de cada condição de hidrólise da celulose, levando em consideração os dois pré-tratamentos utilizados, percebe-se que a variação da concentração de ácido não promoveu um aumento significativamente diferente, exceto para a HSS, em que a 0,5% obteve uma conversão 23,48% maior que em 1% (Gráfico 1).

Na conversão da hemicelulose a HSS 0,5% exibiu um aumento de 13,58% quando comparada a HSS 1%. A HSQ 0,5% e HSQ 1% proporcionaram um aumento de 17,43% e 14,06%, respectivamente, com relação a HSS 1%. As HSB não foram significativamente diferentes entre si, com os dois tipos de pré-tratamento, nem quando comparadas a HSS 0,5% e 1% e a HSQ 0,5% e 1% (Gráfico 2).

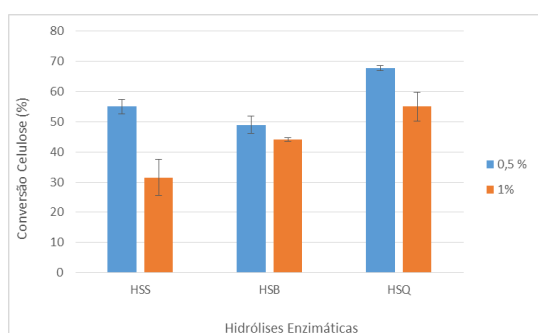


Gráfico 1. Conversão da Celulose.

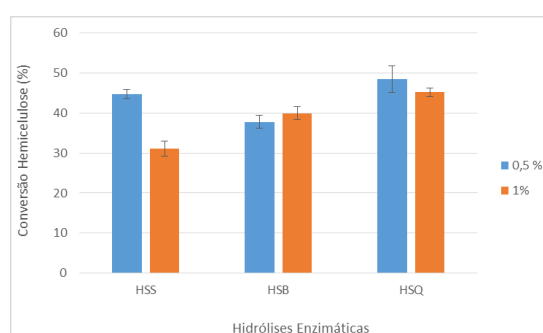
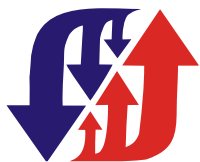


Gráfico 2. Conversão da Hemicelulose.

Os resultados apresentados acima mostram que o pré-tratamento a 0,5% é melhor, pois proporciona as maiores conversões, tanto para celulose como para hemicelulose, na HSS e na HSQ. A presença do biossurfactante aumentou a conversão de celulose e hemicelulose em relação à hidrólise controle a 1,0%.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

É importante salientar que a concentração do surfactante químico foi 46 vezes maior do que a do ramnolípido, e mesmo com essa diferença de concentração a HSB mostrou rendimentos semelhantes à HSS e a HSQ. Portanto, melhoramentos nas etapas de cultivo e extração do ramnolípido serão realizados, para que estudos com maiores concentrações do bio surfactante possam ser realizados.

### CONCLUSÕES

Conclui-se que tanto para a conversão da celulose como da hemicelulose, o pré-tratamento a 0,5% apresentou resultados maiores.

A adição do surfactante químico proporcionou os maiores valores de conversão da celulose e hemicelulose a 0,5%, e o surfactante biológico influenciou no aumento da conversão em pré-tratamento a 1% em relação a hidrólise sem surfactante.

Comparando o dois tensoativos, foi possível perceber que não houve grande diferença entre suas atuações na melhora da hidrólise do papel, e levando em consideração que a concentração do ramnolípido foi menor do que a do Tween 80, estudos com maiores concentrações de bio surfactante são necessários.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbor, Valery B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- Chu, K. H.; Feng, X. Enzymatic conversion of newspaper and office paper to fermentable sugars. 2013. *Process Safety and Environmental Protection*. v.91, p.123-130.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (3), 408-412.1981.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (3), 408-412.1981.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Amilton, J.K. 1956. Colorimetric determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Ogeda, T. L; Petri, D. F. S. 2010. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 7, 1549-1558.
- Oliveira, A. C. S. M. 2010. Recuperação e Purificação de Ramnolípidos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* P029-GVIIA utilizando Melaço de Cana como substrato. Tese de Doutorado.
- Patel, R.M., Desai, A.J. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 91-94.
- Tu, M; Saddler, J. N. 2010. Potential Enzyme Cost Reduction with the Addition of Surfactant during the Hydrolysis of Pretreated Softwood. *Appl Biochem Biotechnol.* v.161:274-287.
- Wang, H. Y.; Fan, B. Q.; Li, C. H.; Liu, S.; Li, M. 2011. Effects of rhamnolipid on the cellulase and xylanase in hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*. v.102, p. 6515- 6521.
- Zhang, Q.; He, G.; Wang, J.; Cai, W.; Xu, Y. 2009. Mechanisms of the stimulatory effects of rhamnolipid biosurfactant on rice straw hydrolysis. *Applied Energy*. v.86, p.233-237.
- Zhou, Y.; Chen, H.; Qi, F.; Zhao, X.; Liu, D. 2015. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. *Bioresource Technology*. v.182, p.136-143.