

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOBUTANOL

Letícia França Lopes da Silva¹ Bruna Pratto¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Centro universitário FEI
leticia22092001@hotmail.com e brunapratto@fei.edu.br

Resumo: O butanol é um combustível sustentável promissor. Para produzi-lo bioquimicamente necessita-se de meios ricos em açúcares fermentescíveis. Deste modo, o objetivo do trabalho foi estudar estratégias para melhorar a produção de açúcares via rota enzimática, aproveitando as frações celulósicas e hemicelulósicas de bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado. Na hidrólise, foi avaliado o efeito da mistura biomassa com hidrolisado hemicelulósico em substituição ao tampão citrato, além da adição de biosurfactante *Tween 80*. O uso do biosurfactante e de uma maior porcentagem de hidrolisado no meio enzimático, promoveu uma maior concentração final de açúcares fermentescíveis.

1. Introdução

Considerando a demanda por novas fontes de combustíveis renováveis, as biomassas lignocelulósicas se apresentam como uma excelente opção em substituição aos recursos não renováveis.

O butanol pode ser produzido pelo processo OXO ou pela rota bioquímica através da fermentação ABE (Acetona-Butanol-Etanol). O butanol produzido através da biomassa lignocelulósica é uma nova tendência para os biocombustíveis, pois possui várias vantagens termodinâmicas com relação ao etanol, como o poder calorífico, octanagem e etc. Além disso, o butanol pode ser utilizado como aditivo na gasolina em qualquer concentração e também como aditivo oxigenado permitindo uma combustão mais completa, reduzindo assim as emissões de monóxido de carbono, fazendo do n-butanol um excelente substituto “verde” para a gasolina [1]. Ao utilizar-se material lignocelulósico para a produção deste combustível algumas etapas devem ser realizadas. Inicialmente, faz-se um pré-tratamento para separação dos três principais componentes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina) facilitando à posterior hidrólise enzimática dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Em muitos casos, após a hidrólise enzimática, é necessário considerar a destoxificação do hidrolisado tendo em vista que durante o pré-tratamento da biomassa são produzidos produtos de degradação tóxicos aos microorganismos fermentadores, como no caso da bactéria *Clostridium*, que é utilizada para a fermentação ABE [3].

Dado tal contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a etapa de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar visando alta concentração de açúcares fermentescíveis para posterior fermentação destes a butanol.

2. Metodologia

Bagaço da cana-de-açúcar foi inicialmente moído, em seguida autoclavado com solução de ácido sulfúrico

1,4% m/m, na proporção 1:10 ($m_{\text{biomassa seca}}/V_{\text{solução ácida}}$) durante 56,4 min a 121°C. A condição do pré-tratamento foi estabelecida previamente por otimização de um planejamento experimental.

Após o pré-tratamento, a biomassa foi hidrolisada enzimaticamente com extrato enzimático comercial *CellicCtec2*[®] (214 FPU/mL). Os ensaios foram realizados a 250 rpm e 50 °C por 72 h, contendo 15% (m/v) de biomassa pré-tratada e dosagem enzimática de 20 FPU/g_{celulose}. Foram realizados ensaios em seis situações distintas, dois para cada meio reacional (biomassa + 100% tampão, biomassa + 50% tampão e 50% hidrolisado; biomassa + 100% hidrolisado), sendo um deles com o biosurfactante *Tween 80* e o outro sem o uso. O hidrolisado se refere à fração líquida oriunda do pré-tratamento, rico em xilose. O *Tween 80* é um reagente surfactante responsável pela mudança na estrutura da biomassa, retirando o impedimento gerado pela lignina à biomassa. Dessa forma, a enzima consegue acessar com maior facilidade à celulose, que não está mais cercada pela lignina. A lignina que antes bloqueava os carboidratos hidrolisáveis, migra para a fração líquida, aumentando a concentração de produtos de degradação no seio líquido [2].

Em diferentes intervalos de tempo, foram retiradas alíquotas para análise da concentração de açúcar redutor pelo método DNS.

Uma vez que hidrolisados oriundos de pré-tratamentos ácidos contêm produtos fenólicos advindos da degradação da lignina, avaliou-se também a uma etapa de destoxificação das amostras de hidrólise, uma vez que tais produtos de degradação são capazes de inibir a atividade metabólica da bactéria *Clostridium*. Para a destoxificação o pH das amostras foi inicialmente ajustado para 10. Após a centrifugação do hidrolisado, o pH foi ajustado novamente, nesse momento para 6,5, que é o pH ideal para a fermentação ABE. Posteriormente, as amostras foram tratadas com carvão ativado (5% m/v) a 28 °C a 250 rpm, por uma hora. Por fim, centrifugou-se as amostras. Espera-se um fluido quase transparente como resultado desta etapa.

3. Resultados

Os resultados de hidrólise enzimática, analisados pelo método DNS, são apresentados na Tabela 1. As concentrações apresentadas no tempo inicial, 4 e 72 h são de açúcares redutores, em g/L, presente nas amostras. Inicialmente foi feito uma previsão da concentração de açúcares presente nas amostras e tendo conhecimento que o hidrolisado do pré-tratamento é rico em xilose (aproximadamente 20 g/L), foram definidos os valores apresentados na tabela 1.

A produção de açúcares não é afetada pelo uso do hidrolisado e, conseqüentemente, nem pelos produtos de degradação, uma vez que foi verificado um aumento em torno de 50 e 40 g/L de açúcares redutores em relação ao tempo inicial para os ensaios com e sem o *Tween 80*, respectivamente. O aumento direto presenciado com o aumento do hidrolisado, se deve à concentração inicial de xilose na solução.

Entretanto, espera-se que a concentração de açúcar seja maior nos ensaios em que o *Tween 80* foi empregado, uma vez que ele facilita o acesso da enzima ao substrato. A produção de açúcares foi em torno de 10 g/L maior para os ensaios no qual o surfactante foi empregado. Entretanto, durante esse processo, o *Tween 80* libera produtos de degradação que estavam presentes na biomassa lignocelulósica, fazendo com que a concentração de fenólicos nas amostras aumentam, conforme verificado na Tabela 1 (linhas “fenólicos” e “fenólicos após a destoxificação”).

LÓPEZ-LINARES, Juan C. et al. também estudou o uso de todas as frações oriundas do pré-tratamento na fermentação e para isso realizou a destoxificação do material. Realizou-se duas formas de destoxificação, a primeira com carvão ativado e a outra com resina de troca iônica. Evidenciou-se que enquanto utilizando carvão ativado a concentração de fenólicos foi de 1 g/L para 0,3 g/L, enquanto com a resina de troca iônica foi de 1 g/L para 0,6 g/L [4].

Dessa forma, foi escolhido utilizar a metodologia de destoxificação com o carvão ativado. O carvão ativado disponível era em grânulos, que possui uma área de contato e conseqüentemente uma eficiência menor que o em pó. De acordo com a Tabela 1, a remoção de compostos fenólicos variou de 20 a 100% após a destoxificação, sendo menor valor para a condição com *Tween 80* e 100% de hidrolisado e o maior valor para o ensaio sem *Tween 80* e 100% de tampão.

Tabela 1 – Resultados da concentração de açúcares redutores durante a hidrólise enzimática

	100% tampão	
	C/ Tween	S/ Tween
Início	0,00	0,00
04:00 hrs	24,68	22,96
72:00 hrs	55,99	43,80
Fenólicos	0,34	0,22
Fenólicos após destoxificação	0,19	-
	50% Tampão e 50% hidrolisado	
	C/ Tween	S/ Tween
Início	10,00	10,00
04:00 hrs	40,88	36,38
72:00 hrs	67,06	56,82
Fenólicos	0,56	0,45
Fenólicos após destoxificação	0,37	0,27
	100% hidrolisado	
	C/ Tween	S/ Tween
Início	20,00	20,00
04:00 hrs	56,88	52,24
72:00 hrs	84,65	72,58
Fenólicos	0,64	0,58
Fenólicos após destoxificação	0,53	0,41

Fonte: Autor

A influência da presença e concentração dos produtos de degradação será estudada futuramente através dos ensaios de fermentação.

4. Conclusões

Conclui-se que a utilização do reagente *Tween 80* promoveu um aumento de açúcar redutor em todas as condições de hidrólise enzimática realizadas. Além disso, pela hidrólise, percebe-se que a produção de açúcares é constante entre os ensaios com e sem o hidrolisado do pré-tratamento, sendo a concentração de açúcares maior conforme há um aumento na quantidade de hidrolisado, isso porque, inicialmente, o hidrolisado é rico em xilose.

A produção de açúcares redutores se manteve em torno de 50 g/L para as amostras onde foram empregados o surfactante *Tween 80* junto da enzima e em torno de 40 g/L nos quais foram utilizados apenas a enzima.

Em condições ideais, altas concentrações de açúcares fermentescíveis se traduzem em elevados teores de produtos de fermentação, assim, em princípio, a condição na qual utiliza 100% do hidrolisado e *Tween 80* seria a mais adequada. No entanto, nesta condição, a concentração de fenólicos também é a maior, devendo ser investigada essa influência durante a fermentação.

5. Referências

- [1] GREEN, E. M. Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n. 3, p. 337–343, 2011
- [2] GUAN, Wenjian; SHI, Suan; BLERSCH, David. Effects of Tween 80 on fermentative butanol production from alkali-pretreated switchgrass. *Biochemical Engineering Journal*, v. 135, p. 61-70, 2018.
- [3] YAO, Dunfan et al. Robustness of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* for acetone-butanol-ethanol production: Effects of lignocellulosic sugars and inhibitors. *Fuel*, v. 208, p. 549-557, 2017.
- [4] LÓPEZ-LINARES, Juan C. et al. Integral valorization of cellulosic and hemicellulosic sugars for biobutanol production: ABE fermentation of the whole slurry from microwave pretreated brewer's spent grain. *Biomass and Bioenergy*, v. 135, p. 105524, 2020.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro Universitário FEI pelo apoio financeiro e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil).

¹ Aluno de IC FEI CNPq. Projeto com vigência de 09/2021 a 08/2022.