

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Hidrólise Enzimática de Capim-Elefante Pré-Tratado com Água Quente Líquida e Vapor de Água Saturado

Andréia Toscan¹, Roselei Claudete Fontana¹, Marli Camassola¹ e Aldo José Pinheiro Dillon¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Caxias do Sul – RS

RESUMO

*O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa essencial para melhorar o rendimento de açúcares obtidos após a hidrólise enzimática. Este estudo comparou dois métodos de pré-tratamento hidrotérmico em capim-elefante, um utilizando água quente líquida e outro com vapor de água saturado. Na hidrólise enzimática foi utilizado o complexo enzimático do *Penicillium echinulatum*. Os parâmetros avaliados foram tempo e temperatura de pré-tratamento em relação aos resultados obtidos de açúcares redutores (AR) e o rendimento de glicose após a hidrólise enzimática. Apesar dos pré-tratamentos com água quente líquida terem apresentado uma liberação de AR ligeiramente maior que os pré-tratamentos com vapor saturado, a utilização de vapor saturado resultou em maior rendimento de glicose. O rendimento de glicose aumentou com o aumento da severidade do pré-tratamento, e tanto o tempo quanto a temperatura de pré-tratamento são parâmetros significativos no processo.*

Palavras-chave: pré-tratamento hidrotérmico, hidrólise enzimática, biomassa lignocelulósica, capim-elefante.

INTRODUÇÃO

A celulose é um dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica sendo um polímero composto exclusivamente por unidades de glicose. Para o aproveitamento da celulose como matéria-prima em bioprocessos é necessária a redução dessa macromolécula ao seu monômero, de modo semelhante ao que é feito com o amido. Porém, a celulose natural nunca se apresenta de forma isolada na natureza, estando sempre associada à lignina e às hemiceluloses, formando a microfibrila celulósica, que constitui a parede celular vegetal (Reguly, 1996).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é essencial para sua bioconversão, pois a parede celular vegetal é uma estrutura recalcitrante de difícil desestruturação, constituindo diversas barreiras físicas e químicas que dificultam consideravelmente os processos de hidrólise e fermentação (Ramos, 2003).

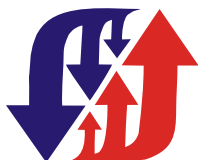
O pré-tratamento hidrotérmico utiliza como princípio a água em temperaturas e pressões elevadas (Laser *et al.*, 2002). Nessas condições a água tem suas propriedades químicas modificadas, aumentando a dissociação de substâncias iônicas e diminuindo do pH, se tornando assim capaz de penetrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e clivar as ligações éter e éster favorecendo a hidrólise da hemicelulose e sua remoção (Mosier *et al.*, 2005).

Neste contexto, o capim-elefante foi pré-tratado hidrotérmicamente com vapor de água saturado e com água quente líquida e submetido à hidrólise enzimática para a comparação dos dois métodos de pré-tratamento e avaliação do efeito destes processos no rendimento da hidrólise enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Para realização deste estudo foi utilizado capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) proveniente do município de Nova Petrópolis (RS, Brasil). O tamanho médio de partícula utilizado foi de 1 mm sendo misturado o colmo e as folhas da planta. A composição do



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

capim-elefante utilizado é de $34,5 \pm 2,3$ % de celulose, $38,1 \pm 4,2$ % de hemicelulose, $13,5 \pm 0,8$ % de lignina, $4,9 \pm 0,4$ % de cinzas, $9,0 \pm 2,4$ % de conteúdo celular e $10,2 \pm 0,3$ % de umidade total.

PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

Os pré-tratamentos foram realizados com água deionizada em reator de aço inoxidável, com volume útil de 2,5 L. Os pré-tratamentos foram conduzidos conforme condições determinadas no planejamento experimental por delineamento composto central rotacional (DCCR), onde foram variadas as condições de tempo e temperatura, ambas variáveis independentes (Tabela 1). As condições estabelecidas foram repetidas utilizando água quente líquida e vapor de água saturado, representados pelas letras L e V, respectivamente após o número do ensaio. Para avaliar a intensidade do pré-tratamento hidrotérmico foi empregado o fator de severidade, o qual é definido por Overend e Chornet (1987) e que considera o tempo de residência em minutos e a temperatura em graus Celsius.

Tabela 1 Condições experimentais de pré-tratamento hidrotérmico repetidos para água quente líquida (L) e vapor saturado (V).

Ensaio	Tempo de residência (min)	Temperatura (°C)	Severidade ($\log R_0$)
1	3,0	178	2,77
2	10,0	178	3,30
3	3,0	212	3,77
4	10,0	212	4,30
5	6,5	170	2,87
6	6,5	220	4,35
7	1,0	195	2,80
8	12,0	195	3,88
9	6,5	195	3,61
10	6,5	195	3,61
11	6,5	195	3,61

A avaliação dos métodos de pré-tratamento, bem como os parâmetros estudados (tempo e temperatura) foram avaliados em função dos resultados obtidos após a hidrólise enzimática, considerando como variáveis dependentes a liberação de açúcares redutores e o rendimento de glicose obtida.

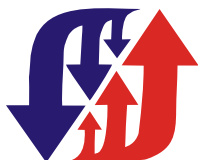
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática do capim-elefante, com e sem pré-tratamento, foi realizada em triplicata de acordo com Adsul *et al.* (2005), com modificações. A hidrólise foi realizada em frascos Duran® de 50 mL, utilizando 1 g (em base seca) de matéria-prima, 0,01 % (m/v) de azida sódica, o volume de caldo enzimático correspondente a 15 FPA de atividade enzimática e o volume foi completado para 50 mL com solução tampão citrato de sódio (pH 4,8; 50 mmol/L). A temperatura foi mantida em 50 °C e frequência do agitador em 150 rpm. O complexo enzimático utilizado foi o do *Penicillium echinulatum* produzido em cultivo em estado sólido. Amostras de 1 mL foram coletadas a cada 3 h durante as primeiras 12 h de processo, iniciando no tempo zero, e, posteriormente, as amostras foram coletadas a cada 12 h até completar 72 h.

CARACTERIZAÇÃO

A liberação de açúcares redutores (AR) formados durante a hidrólise enzimática foi realizada pelo método DNS (ácido 3,5 di-nitrosalicílico) (Miller, 1959).

As amostras coletadas no tempo de 48 h de hidrólise enzimática foram avaliadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para análise das concentrações de glicose, utilizando coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm de diâmetro



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

interno), operada a 60 °C e tendo como eluente uma solução 5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄ com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, e detector de índice de refração.

O rendimento da hidrólise foi calculado considerando a concentração de glicose obtida em mg de glicose.g⁻¹ de capim-elefante *in natura* e a concentração de celulose presente no capim-elefante *in natura*, dado em mg de celulose.g⁻¹ de capim-elefante *in natura*.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados estatisticamente por análises de variâncias empregando o software PrismGraphPad 5.01 (Graph Pad, San Diego, CA) e Statistica 8.0 (StatSoft Inc.,USA).

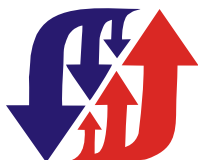
RESULTADOS E DISCUSSÕES

A liberação dos açúcares redutores (AR) na hidrólise enzimática foi avaliada para as biomassas pré-tratadas com vapor saturado e água quente líquida bem como para o capim-elefante sem pré-tratamento. Todas as biomassas pré-tratadas tiveram maior liberação de AR quando comparadas com a hidrólise do capim-elefante *in natura*. Entre os pré-tratamentos com vapor de água saturado o ensaio 6V resultou, na maioria dos tempos de coleta de amostra, no maior rendimento de AR, sendo que o maior incremento no rendimento foi observado até o tempo de 48 h de processo. O máximo rendimento de AR foi atingido após 60 h de hidrólise no ensaio 11V e foi de aproximadamente 576 mg de AR.g⁻¹ de capim-elefante *in natura*. Entre os pré-tratamentos com água quente líquida as condições do ensaio 8L proporcionaram a maior liberação de AR no meio durante praticamente todo o processo de hidrólise enzimática, chegando ao máximo de liberação de AR no tempo de 48 h, liberando aproximadamente 596 mg de AR.g⁻¹ de capim-elefante *in natura*, sendo esse valor 20 mg superior ao máximo valor de AR liberado nas hidrólises enzimáticas da biomassa pré-tratada com vapor de água saturado.

O rendimento de glicose, obtido em relação a quantidade de glicose que poderia ter sido obtida se toda a celulose disponível na biomassa sem pré-tratamento fosse convertida, foi analisado em relação a severidade dos pré-tratamentos (Figura 1). Tanto nos pré-tratamentos realizados com vapor saturado (Figura 1A), como nos pré-tratamentos com água quente líquida (Figura 1B), os rendimentos aumentam com o aumento da severidade. Nos pré-tratamentos com vapor saturado, pode-se observar que os três ensaios realizados com severidades igual e superior a 3,88 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) de rendimento entre si e dos demais ensaios. O maior rendimento foi observado na severidade de 4,35 correspondente ao ensaio 6V, chegando a 60,44 % de conversão. As severidades 3,88 e 4,30 correspondem respectivamente, aos ensaios 8V e 4V, e obtiveram como rendimentos 45,42 % e 52,09 %. Nos pré-tratamentos com água quente líquida os maiores rendimentos também foram observadas com severidades iguais e acima de 3,88, porém, as três condições testadas não apresentaram diferenças significativas entre si sendo que no ensaio 8L, que corresponde a severidade de 3,88, o rendimento foi de 50,73 %.

O menor rendimento, conforme esperado, coube a hidrólise enzimática do capim-elefante sem pré-tratamento (severidade igual a zero), alcançando rendimento de 26,53 %. O rendimento do capim-elefante sem pré-tratamento não apresentou diferença significativa do rendimento dos ensaios de menor severidade, sendo estas 2,77; 2,80 e 2,87 para água quente líquida e para vapor saturado, sendo que para este último a severidade 3,30, referente ao ensaio 2V, também não apresentou diferença significativa para a biomassa não tratada (Figura 1).

A concentração de glicose nas amostras de 48 h de hidrólise foi analisada estatisticamente com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95 % ($p < 0,05$). Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose mostraram que, tanto para os pré-tratamentos com água quente líquida quanto para vapor saturado, o tempo e a temperatura são parâmetros significativos no processo de pré-tratamento, resultando em incremento da liberação de glicose.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

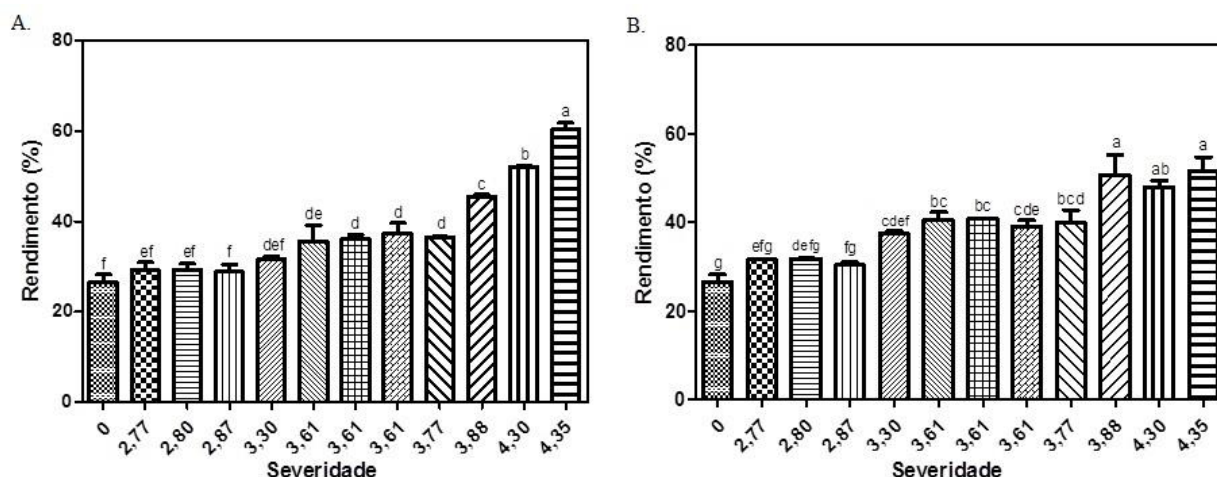


Figura 1. Rendimento da hidrólise enzimática (glicose liberada/glicose máxima⁻¹) após 48 h de processo em relação à severidade do pré-tratamento hidrotérmico utilizando vapor de água saturado (A) e água quente líquida (B).

Laser e colaboradores (2002) compararam os pré-tratamentos hidrotérmicos com água quente líquida e vapor saturado para o bagaço de cana-de-açúcar, e observaram que, mantendo-se a severidade constante, altas temperaturas em menores tempos de processo são favoráveis na dissolução de xilana e na conversão do processo de simultânea sacarificação e fermentação para o uso de água quente líquida. Estes resultados estão de acordo com a análise estatística deste trabalho em que se constatou que a temperatura é mais significativa para o resultado final do que o tempo de processo.

CONCLUSÕES

No presente trabalho foi constatado que o pré-tratamento hidrotérmico é eficiente como processo para aumentar o rendimento da hidrólise enzimática do capim-elefante e que temperatura e tempo de processo são parâmetros significativos, seja o pré-tratamento realizado com água quente líquida ou com vapor saturado. O rendimento do processo aumenta conforme o aumento da severidade de pré-tratamento, sendo os resultados mais promissores obtidos no ensaio 6V (6,5 min, 220 °C) e 8L (12 min, 195 °C), para vapor saturado e água quente líquida, respectivamente. Além disso, observou-se que os pré-tratamentos com vapor de água saturado atingiram rendimentos totais superiores aos atingidos pelos pré-tratamentos com água quente líquida, apesar de esses últimos terem atingido maior concentração de AR nos hidrolisados de massa durante o processo do que o pré-tratamento com vapor de água saturado.

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
- Laser, M.; Schulman, D.; Allen, S. G.; Lichwa, J.; Antal Jr., M. J.; Lynd, L. R. 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* 81: 33-44.
- 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.
- Overend, R. P.; Chornet, E. 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments. *Philos Trans. R. Soc. Lond. A.* 321:523-536.
- Ramos, L. P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quím. Nova.* 26: 863-871.
- Reguly, J. C. 1996. *Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos.* Editora universitária, Universidade Federal de Pelotas. Vol.1.