

Foto: Cristiane Vieira Helm



Metodologia de digestibilidade enzimática para avaliar a eficiência do processo de pré-tratamento de biomassa arbórea

Washington Luiz Esteves Magalhães¹

Cristiane Vieira Helm²

Patrícia Raquel Silva Zanoni³

A biomassa lignocelulósica possui uma proporção significativa de celulose, ligada com polímeros de hemicelulose e imersa em uma matriz de lignina. Todas estas frações têm alto potencial como matéria-prima para a produção de energia, produtos químicos ou materiais. Entretanto, ainda existem desafios a serem superados para separá-los de maneira limpa e eficiente, sem degradação química indesejada. Uma importante área da biotecnologia é a produção de açúcares fermentescíveis, principalmente a glicose de biomassa lignocelulósica, e a subsequente conversão destes açúcares em outros produtos, como o etanol (ZHAO et al., 2012).

Para a produção bioquímica de álcool de segunda geração, o maior entrave é o acesso restrito da enzima à celulose imersa no material lignocelulósico. A dificuldade na hidrólise da celulose justifica os altos custos de produção do etanol lignocelulósico, quando comparado ao etanol da cana-de-açúcar. Por esta razão, o pré-tratamento da biomassa é uma etapa

importante realizada antes da sacarificação, visando facilitar o acesso do agente de hidrólise. A desconstrução parcial da matriz lignocelulósica através do pré-tratamento pode envolver processos biológicos, físicos e/ou químicos, que podem atuar tanto na lignina como na hemicelulose, ou em ambas (AGBOR et al., 2011; MOSIER et al., 2005).

O desenvolvimento de uma metodologia para avaliação da susceptibilidade da biomassa à hidrólise enzimática é uma ferramenta laboratorial importante para a comparação entre processos de pré-tratamento e também entre diferentes biomassas.

O objetivo deste trabalho é apresentar um método testado nos laboratórios de Tecnologia de Produtos Florestais da Embrapa Florestas para avaliar o rendimento de sacarificação (digestibilidade) de amostras de biomassa vegetal. Trata-se de hidrólise enzimática conduzida em condições ótimas de temperatura e pH, para a ação das enzimas, e

¹Engenheiro Químico, Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, Pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR

²Engenheira Química, Doutora, Pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR

³Engenheira Química, Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais, Pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR

em baixas concentrações de substrato, para favorecer a sacarificação. Utilizam-se enzimas comerciais para hidrolisar a biomassa. A partir da quantidade de açúcar produzido, é possível calcular a digestibilidade do material.

O método permite, entre outras aplicações, comparar o pré-tratamento realizado em diversos materiais lignocelulósicos, visando à produção de etanol de segunda geração.

Descrição da metodologia

Trata-se de um procedimento adaptado a partir de Selig et al. (2008).

Primeiramente, as amostras devem ser secas em estufa até peso constante, para padronização do procedimento. Todavia, deve-se salientar que a secagem pode diminuir a digestibilidade enzimática dos materiais (SELIG et al., 2008). Provavelmente isto ocorre em virtude da formação de ligações de hidrogênio entre fibrilas de celulose após secagem, dificultando o acesso de moléculas de enzimas às cadeias de celulose. Entretanto, o método serve para comparação entre amostras diferentes.

Preparo da amostra

Após secagem, pesar uma porção de aproximadamente 0,200 g da biomassa (tratada ou não) em tubos tipo Falcon de 50 mL. Sugere-se realizar o experimento em triplicata. Anotar o valor exato da massa para utilização em cálculos posteriores.

Preparo da solução tampão com enzimas

Para o preparo da solução tampão, 19,6 g de ácido cítrico monohidratado e 70,56 g de citrato de sódio diidratado são dissolvidos em água pura e a solução é avolumada para 1,0 L. O pH deve ser ajustado para 5,0, adicionando-se solução 1 mol.L⁻¹ de NaOH e/ou HCl.

Adicionar as enzimas celulase (Celluclast[®] 1,5 L, adquirida da Sigma Aldrich) e celobiase (Novozyme 188, adquirida da Sigma Aldrich) na concentração de 2,25 e 1,125 mL.L⁻¹ (volume de enzima/volume de tampão), respectivamente.

Hidrólise enzimática

A hidrólise deve ser realizada nos tubos Falcon com as amostras previamente pesadas, adicionando-se 40 mL da solução tampão com enzimas (Figura 1). Colocar os frascos em incubadora com agitação de 250 rpm por 24 h à temperatura de 50 °C.

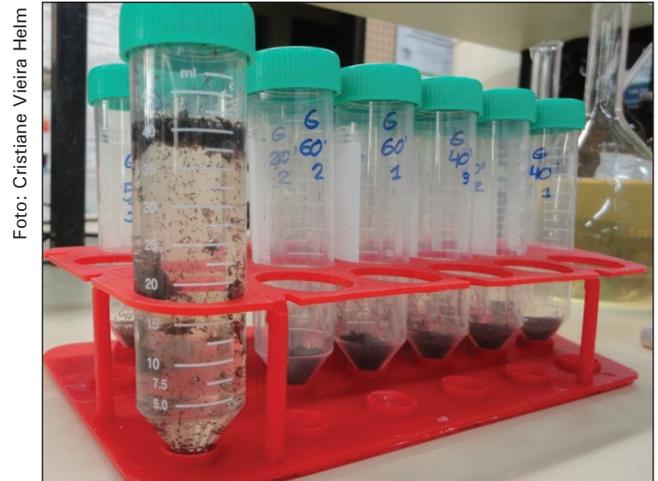


Foto: Cristiane Vieira Helm

Figura 1. Tubos Falcon contendo solução tampão com enzimas e biomassa a ser hidrolisada.

Para interromper a hidrólise enzimática, colocar os tubos imersos em banho-maria com água fervente (~ 100 °C) por 10 min, para promover a desnaturação das enzimas.

Em seguida, centrifugar os frascos por 10 min a 5000 rpm, para separar os sólidos da solução hidrolisada. Com o auxílio de seringa, filtrar em membrana de nylon de 0,45 μm (Figura 2) e congelar em freezer a -20 °C, se a análise não for realizada imediatamente.



Foto: Patrícia Raquel Silva Zanoni

Figura 2. Sistema de filtração das amostras hidrolisadas.

Caracterização dos açúcares

Determinar a concentração de açúcares na solução hidrolisada por meio de cromatografia iônica.

Outra possibilidade é o emprego de metodologias por via úmida, como os métodos de Fehling (LAZZAROTTO et al., 2012), DNS (ácido dinitrosalicílico) (NEGRULESCO et al., 2012) ou Fenol-ácido sulfúrico (CHOW; LANDHAUSSER, 2004). Entretanto, o uso da cromatografia apresenta vantagens, principalmente por permitir a identificação e quantificação dos açúcares individualmente, incluindo açúcares não-redutores. Além disso, a técnica de cromatografia permite analisar maior número de amostras de maneira mais rápida e eficiente.

Cálculo da digestibilidade

A digestibilidade (D) é o percentual de açúcar liberado na hidrólise enzimática ($m_{prática}$) em relação ao teor máximo de açúcar possível de se obter a partir da biomassa ($m_{máxima}$). O teor máximo de açúcar na biomassa (pré-tratada ou não) é medido através de hidrólise ácida total, cujo procedimento é detalhado a seguir.

$$D = \frac{m_{prática}}{m_{máxima}} * 100 \quad \text{[Equação 1]}$$

Hidrólise ácida total

Utiliza-se uma adaptação do protocolo de Sluiter et al. (2011).

Em um tubo de ensaio de vidro com tampa rosqueável, pesar 30 mg de amostra de madeira moída (partículas entre 0,25 e 0,35 mm) e previamente seca. Adicionar 1 mL de ácido sulfúrico 12 mol.L⁻¹.

- Colocar o tubo de ensaio tampado em banho-maria a 37 °C, por 1 h.
- Adicionar 11 mL de água ultrapura, tampar novamente e colocar em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 30 min.
- Retirar os tubos da autoclave, resfriar e filtrar.

- Centrifugar os tubos a 5.000 rpm por 10 min.
- Transferir o sobrenadante com auxílio de pipeta de *Pasteur* para frascos com tampa.

Se a análise não for realizada imediatamente, congelar as amostras em freezer a -20 °C para análises posteriores por cromatografia iônica.

Exemplo de aplicação: avaliação da influência da temperatura do pré-tratamento alcalino de *Eucalyptus benthamii* pelo teste de digestibilidade

Amostras moídas (partículas entre 0,25 e 0,35 mm) de madeira de *E. benthamii* foram submetidas a um pré-tratamento alcalino, baseado em uma adaptação do processo *Kraft* de polpação. Foi realizado o cozimento das amostras com licor verde por 60 min, em reator de aço inoxidável cilíndrico com capacidade de 50 mL (marca Parr). A proporção utilizada de licor verde em relação à massa de madeira foi de 4:1 (v/m). Um bloco digestor com controle de temperatura (marca: Marconi, modelo: MA4005) foi utilizado para aquecimento dos reatores. Foram avaliadas duas temperaturas de pré-tratamento, 120 e 180 °C. Os reatores foram inseridos no bloco digestor após este ter atingido a temperatura programada. A contagem do tempo (60 min) foi iniciada após a estabilização da temperatura. Ao final do período, a amostra pré-tratada foi transferida para um frasco erlenmeyer de 250 mL e o reator foi lavado com 100 mL de água. A mistura foi neutralizada com H₂SO₄ concentrado sob agitação constante. A seguir, o sólido foi filtrado e seco em estufa a 105 °C por 4 h.

As amostras obtidas após o pré-tratamento e também uma amostra de madeira sem tratamento foram submetidas ao teste de digestibilidade, conforme metodologia descrita anteriormente. As soluções de açúcares resultantes, chamadas de hidrolisados, foram analisadas quanto aos teores de açúcares redutores totais pela técnica do DNS. A digestibilidade dos materiais foi calculada pela Equação 1 e os resultados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de açúcares redutores totais obtidos no teste de digestibilidade, teor calculado de açúcares por massa de biomassa tratada, percentual de sólidos pré-tratados em relação à biomassa bruta, e digestibilidade calculada pela Equação 1.

<i>E. benthamii</i> Com 0,6857 kg de holocelulose/kg de biomassa	Concentração de açúcares após hidrólise enzimática (g/L)	kg açúcar/kg biomassa tratada	Total de sólidos após o pré-tratamento (%)	Digestibilidade (kg de açúcar/kg de holocelulose na biomassa não tratada) (%)
Sem pré-tratamento	0,19	0,04	100,00	5,57
120 °C /1 h	0,50	0,10	73,53	10,62
180 °C /1 h	4,69	0,92	52,65	70,67

Os resultados indicaram que a temperatura de 180 °C foi mais eficiente em desconstruir a biomassa e facilitar a sacarificação, quando comparada à temperatura de 120 °C. Assim, a metodologia de digestibilidade mostrou-se útil para comparação entre diferentes tratamentos e para a definição das melhores condições de processo, visando maiores rendimentos na etapa posterior de hidrólise enzimática. Entretanto, é importante ressaltar que no processo industrial a hidrólise enzimática poderá apresentar um rendimento menor do que o obtido no teste de digestibilidade. A proporção utilizada de água para biomassa (40 mL:0,2 g) não é economicamente interessante, pois a concentração de açúcares resultante no hidrolisado é muito baixa (4,69 g L⁻¹, para 180 °C). Alguns autores afirmam que, para que a recuperação do etanol no final do processo de fermentação seja viável economicamente, a concentração do etanol no meio fermentado deve ser superior a 40 g L⁻¹ (WINGREN et al., 2003). Para tanto, seria necessário que a concentração de açúcares no hidrolisado fosse superior a 87 g L⁻¹, considerando um fator de conversão de 0,46 g etanol/g açúcar. Assim sendo, a razão de líquido para sólido adotada na hidrólise deveria ser muito menor. Em contrapartida, esta condição pode provocar a diminuição do rendimento da reação de hidrólise enzimática, uma vez que maiores concentrações de açúcares podem inibir a ação das celulasas (XIAO et al., 2004).

Referências

- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
- CHOW, P. S.; LANDHAUSSER, S. M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in wood plant tissues. **Tree Physiology**, Oxford, v. 24, p. 1129-1136, 2004. DOI: 10.1093/treephys/24.10.1129
- LAZZAROTTO, M.; NETIPANYJ, R. R. **Método de Fehling adaptado**: uma ferramenta para analisar açúcares redutores totais em madeira hidrolisada. Colombo: Embrapa Florestas, 2012. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 311).
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.06.025
- NEGRULESCO, A.; PATRULEA, V.; MINCEA, M. M.; IONASCU, C.; VLAD-OROS, B. A.; OSTAFE, V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012. DOI: 10.1590/S0103-50532013005000003

SELIG, M.; WEISS, N.; JI, Y. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass.

Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008. (Technical Report, NREL/TP-510-42629).

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2011. (Technical Report, NREL/TP-510-42618).

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of Bottlenecks. *Biotechnology Progress*, New York, v. 19, p. 1109–17, 2003.

XIAO, Z. Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 113-116, p. 1115-1126, 2004.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, Chichester, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012. DOI: 10.1002/bbb.1331, 2012.

Comunicado Técnico, 356

Embrapa Florestas
Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319
Colombo, PR, CEP 83411-000
Fone / Fax: (0***) 41 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/



1ª edição
Versão eletrônica (2015)

Comitê de Publicações

Presidente: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Secretária-Executiva: *Elisabete Marques Oaida*
Membros: *Elenice Fritzsos, Giselda Maia Rego, Ivar Wendling, Jorge Ribaski, Luis Cláudio Maranhão Froufe, Maria Izabel Radomski, Susete do Rocio Chiarello Pentead, Valderes Aparecida de Sousa*

Expediente

Supervisão editorial: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Revisão de texto: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Normalização bibliográfica: *Francisca Rasche*
Editoração eletrônica: *Rafaele Crisostomo Pereira*