

PRODUÇÃO DE ETANOL DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE PAPEL DE ESCRITÓRIO DESCARTADO

Bárbara Ribeiro Alves Alencar¹; Ester Ribeiro Gouveia²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas modalidade bacharelado - CCB – UFPE; E-mail: barbara.ribeiro_dbbs@hotmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Antibióticos – CCB –UFPE. E-mail: estergouveia@gmail.com.

Sumário: O uso de papel de escritório apresenta-se como uma vantajosa biomassa para a produção de bioetanol. Pré-tratamentos são necessários para uma maior obtenção de carboidratos fermentescíveis. Esse processo pode ser melhorado com o uso de surfactantes não iônicos. O objetivo do trabalho é produzir etanol, a partir de papel de escritório. Foram realizadas hidrólise enzimáticas, com e sem o surfactante Tween 80 (2,5 g/L), com carga de 5% m/V de biomassa. O hidrolisado com maior concentração de glicose foi fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*. Ao final da hidrólise, cerca de 30 g/L de glicose foram formados, nos ensaios com surfactante, proporcionando a produção de 14 g/L de etanol. Na presença do Tween-80, a digestibilidade das enzimas aumentou, proporcionando maior formação de glicose. A partir disso, pode-se concluir que o uso de surfactante melhora a formação de glicose, proporcionando uma maior produção de etanol.

Palavras-chave: bioetanol, hidrólise enzimática, papel

INTRODUÇÃO

O papel descartado está inserido na fração de resíduos sólidos urbanos que tem potencial para ser uma matéria-prima para a produção de bioetanol. As razões para isto incluem: (1) custo relativamente baixo; (2) possuem níveis elevados de carboidratos; (3) a produção de bioetanol pode ser uma rota alternativa útil e valiosa para a gestão destes materiais, além de um complemento para a reciclagem (Wang *et al.*, 2012). Os processos de hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose, para obtenção de carboidratos, em meio aquoso, catalisado por celulasas, possuem valores de rendimentos baixos, principalmente devido a elevada cristalinidade da estrutura da celulose. Para tornar a hidrólise celulósica mais eficiente, são necessárias etapas de pré-tratamento da matéria-prima, visando aumentar a acessibilidade do substrato à ação enzimática (Mosier *et al.*, 2005), já que ele desestabiliza a estrutura celulósica, porém não a hidrolisa totalmente (Gámez *et al.*, 2005). Qi *et al.* (2011) observaram que celulasas, quando na hidrólise ácida contendo o surfactante Tween 20, permaneceram mais livres, do que quando a hidrólise foi realizada sem a presença deste composto. O objetivo do trabalho é a produção de etanol a partir do hidrolisado enzimático do papel de escritório descartado, avaliando a influência do surfactante no pré-tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

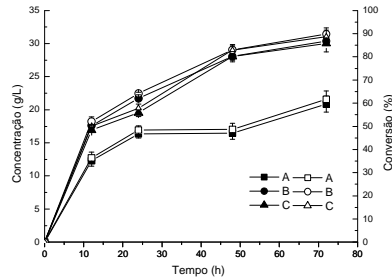
O papel de escritório foi coletado no Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Uma carga de 5 % m/V foi submetida ao pré-tratamento com ácido sulfúrico (1% V/V), em mesa incubadora rotativa (TECNAL, TE-421), a 50°C e 150 rpm, durante 3 horas. A biomassa foi caracterizada pela metodologia de Gouveia *et al.* (2009). Foram realizadas hidrólises enzimáticas (Novozyme - Celluclast 1.5L; 7 FPU/mL), em frascos de erlenmeyers, com e sem pré-tratamento químico. Na hidrólise sem pré-tratamento, o papel de escritório descartado foi moído. Posteriormente,

visando aumentar a conversão de celulose, foram realizadas hidrólises enzimáticas do material pré-tratado com ácido sulfúrico e adicionando surfactante (Tween-80), antes ou após o pré-tratamento. Em todas as hidrólises, os frascos de 125 mL foram mantidos em mesa incubadora rotativa, a 50°C e 150 rpm, durante 72 horas, sendo retiradas amostras a cada 12 horas. Todas as hidrólises foram realizadas em duplicata. O hidrolisado enzimático (fração líquida) foi utilizado na preparação do meio de cultura da fermentação, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o qual continha: 4 g/L extrato de levedura, 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 2 g/L KH₂PO₄ e 0,75 g/L MgSO₄.7H₂O. O pH deste meio foi ajustado para 4,9 com NaOH (18 M). Na preparação do inóculo, a linhagem foi repicada em tubos de ensaio contendo o meio de preservação (20 g/L glicose, 4 g/L extrato de levedura, 3 g/L peptona e 15 g/L ágar; pH 7.0), o qual foi mantido em estufa a 30°C durante 24 horas. Após esse período, a levedura foi transferida para frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de inóculo (meio de preservação, mas sem adição de ágar), o qual foi submetido a 200 rpm e 37°C, por 12 horas, em mesa incubadora rotativa. Posteriormente, 5 mL do volume foi transferido para o frasco de erlenmeyer de 125 mL, contendo 45 mL do meio de fermentação. A temperatura e a agitação foram 37°C e 80 rpm, respectivamente. As fermentações foram realizadas durante 48 horas e em duplicata. Celobiose, glicose e etanol foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC; Shimadzu Corporation - Kyoto, Japan), em coluna Aminex HPX-87H+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a 60°C, vazão 0,6 mL/min, H₂SO₄ (5mM), sendo analisados por índice de refração (RID; Shimadzu, RID 10A). O índice de cristalinidade da celulose foi determinado através da análise por difracção de raios-X (DRX) de acordo com a equação proposta por Park *et al.* (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

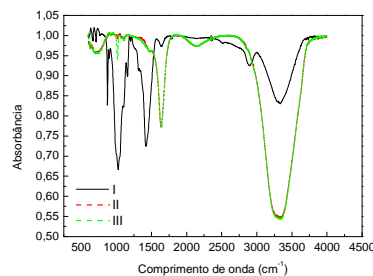
Os percentuais de celulose e hemicelulose, no material sem e com pré-tratamento foram de 63,11% e 14,38%, no primeiro caso, e 65,61% e 14,00%, no segundo. Apesar da pequena variação no teor de hemicelulose do material, sem e com pré-tratamento, houve um aumento considerável na conversão da celulose. A hemicelulose parece não ter sido solubilizada com o pré-tratamento utilizado e, mesmo assim, houve um aumento na conversão, contrariando o que é conhecido na literatura, que a solubilização da hemicelulose, especialmente da xilana, aumenta a hidrólise da celulose (Varnáí *et al.*, 2010). Provavelmente, o aumento observado na conversão de celulose, quando foi utilizado o papel de escritório descartado e pré-tratado tenha sido devido à ausência de lignina em relação ao material sem pré-tratamento. Esta hipótese foi analisada através da espectroscopia por infravermelho e será apresentada mais adiante. As concentrações de glicose (símbolos cheios) e conversões de celulose (símbolos vazios), nos ensaios sem (A) e com adição do surfactante (B e C) são apresentadas na Figura 1. As maiores concentrações foram encontradas para os tratamentos com Tween-80, independente da adição ser antes (B) ou após o pré-tratamento (C). Não há diferença significativa entre as concentrações de glicose encontradas em B e C, a 95 % de confiança. O valor máximo encontrado foi de aproximadamente 90 % (30 g/L), para as hidrólises B e C, enquanto que, em A, foi de apenas 60 % (20 g/L).

Figura 1. Concentração de glicose e conversão de celulose do papel de escritório pré-tratado.



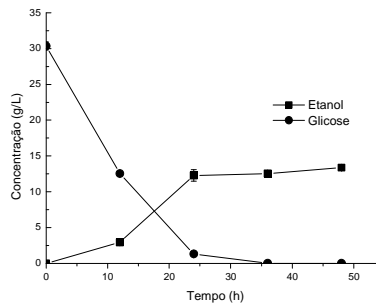
A análise de espectroscopia por infravermelho foi realizada para tentar entender o que poderia ter ocorrido na estrutura do material lignocelulósico sem (amostra I) e com pré-tratamento químico, sendo este, sem (amostra II) e com a adição de Tween-80 (amostra III). Os espectros das três amostras são apresentados na Figura 2. Todas as amostras exibiram um pico na região de 3400 cm^{-1} . Geralmente, amostras de biomassa tratadas exibem aumento das intensidades nas regiões de 3400 cm^{-1} , $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ e $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (Sim *et al.*, 2012). Um pico na região de 1640 cm^{-1} , foi observado apenas para as amostras tratadas. Por outro lado, pico na região próximo a 1400 cm^{-1} , que indica a presença de lignina, foi observado apenas na amostra não tratada (Xu *et al.*, 2013). A partir das análises por difração de raio X, foram determinados os índices de cristalinidade dessas amostras, os quais foram 66,37 % (amostra I), 66,53 % (amostra II) e 69,08 % (amostra III). Não houve diferença significativa, no nível de 95 % de confiança, entre as amostras sem (I) e com pré-tratamento ácido, mas sem adição do surfactante (II). No entanto, o valor do índice de cristalinidade foi maior para o papel de escritório descartado pré-tratado e com adição do surfactante (III). Alguns trabalhos na literatura têm mostrado que a adição de surfactantes não iônicos, tais como, Tween-80 e Tween-20 podem melhorar a digestibilidade de vários substratos, incluindo celulose e materiais lignocelulósicos (Tu e Saddler, 2009). Quando Tween-80 foi adicionado, a digestibilidade das enzimas livres sobre Avicel foi aumentada (Yu *et al.*, 2013). Isto provavelmente foi o que ocorreu no presente trabalho.

Figura 2. Espectroscopia do papel de escritório, com e sem pré-tratamento e Tween 80



Devido à concentração de B ser numericamente superior à de C, esse hidrolisado foi utilizado na fermentação, cujos valores da produção de etanol são apresentados pela Figura 3. Ao término do processo, foram produzidos 14 g/L de etanol, cujo rendimento foi de 0,42 g/g.

Figura 3. Produção de etanol, a partir do hidrolisado enzimático de papel de escritório



Santos *et al.* (2010) obtiveram, após 48h de fermentação, aproximadamente 12g/L de etanol e um rendimento 0,35 g/g, usando bagaço de cana-de-açúcar deslignificado. Na produção de etanol, a partir do hidrolisado ácido, sintetizado a partir de papel de escritório descartado, usando a mesma linhagem do presente trabalho, Lima *et al.* (2015) obtiveram um rendimento de aproximadamente 0,39 g/g.

CONCLUSÕES

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído mostrou-se eficiente para a desestabilização da estrutura celulósica. Porém, quando adicionado o Tween 80, a concentração de glicose aumentou em 50%, mostrando que o uso de surfactantes melhora a ação enzimática, e, por conseguinte, aumenta a concentração final de carboidratos provenientes de material lignocelulósico, já que aumenta a digestibilidade das enzimas livre.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Gámez, S., González-Cabriales, J. J., Ramírez, J. A., Garrote, G., & Vázquez, M. 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of food engineering*, 74, 1, 78-88.
- Gouveia, E. R., Nascimento, R. D., Souto-Maior, A. M., & Rocha, G. D. M. 2009. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, 32, 6, 1500-1503.
- Lima, D. A., De Luna, R. L. N., Martín, C., & Gouveia, E. R. 2015. Comparison of bioethanol production from acid hydrolyzates of waste office paper using *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora passalidarum*. *Cellulose Chemistry and Technology*, 5492-5500.
- 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. *Bioresource technology*, 96, 6, 673-686.
- Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K., 2010. Research cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*. 3, 10.
- Qi, B., Chen, X., Su, Y., & Wan, Y. 2011. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresource technology*, 102, 3, 2881-2889.
- Santos, J. R. A. D., Souto-Maior, A. M., Gouveia, E. R., & Martín, C. 2010. Comparison of SHF and SSF processes from sugar cane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, 33, 4, 904-908.
- Sim, S. F., Mohamed, M., Lu, N. A. L. M. I., Sarman, N. S. P., & Samsudin, S. N. S. 2012. Computer-assisted analysis of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra for characterization of various treated and untreated agriculture biomass. *BioResources*, 7, 4,

- 5367-5380. Tu, M., & Saddler, J. N. 2010. Potential enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161, 1-8, 274-287.
- Várnai, A., Siika-aho, M., & Viikari, L. 2010. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme and microbial technology*, 46, 3, 185-193.
- Várnai, A., Siika-aho, M., & Viikari, L. 2010. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. *Enzyme and microbial technology*, 46, 3, 185-193.
- Wang, L., Templer, R., & Murphy, R. J. 2012. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Applied Energy*, 99, 23-31.
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., & Wang, D. 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini-review. *Applied Energy*, 104, 801-809.
- Yu, Z., Jameel, H., Chang, H. M., Philips, R., & Park, S. 2013. Quantification of bound and free enzymes during enzymatic hydrolysis and their reactivities on cellulose and lignocellulose. *Bioresource technology*, 147, 369-377.