

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Hidrólise Enzimática de *Landoltia punctata* Proveniente de Tratamento de Esgoto Doméstico Visando Produção de Etanol

Flávia Nunes Costa¹, Luciana Reis Fontinelle Souto¹, Lindomar Alberto Lerin¹, Rodrigo de Almeida Mohedano², Débora de Oliveira¹ e Jorge Luiz Ninow¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina - Depto. de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Caixa Postal 476 - 88040-900 – Florianópolis – SC – E-mail: flav1nhanc@hotmail.com

²Universidade Federal de Santa Catarina - Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental
Caixa Postal 476 - 88040-900 – Florianópolis – SC

RESUMO

*A necessidade de explorar novas fontes de energia renovável e limpa vem exigindo o desenvolvimento de biocombustíveis. Nesse contexto, as lemnas vêm ganhando interesse, por não competirem com alimentos e terras produtivas para produção de etanol. O objetivo deste trabalho foi definir a melhor condição para a sacarificação enzimática do amido e da celulose presente na biomassa de lemnas (*Landoltia punctata*), proveniente de tratamento de esgoto. Os experimentos de hidrólise, para estudo da sacarificação, foram realizados utilizando um planejamento tipo Plackett-Burman (12 ensaios, 6 variáveis e triplicata no ponto central), cujas variáveis foram: pH (3,0 a 6,0), temperatura (45 a 65 °C), concentração de Spirizyme Fuel (0,1 a 0,3% v/m) de Pectinex Ultra AFP (0 a 0,1% v/m), de Cellic Ctec2 (0 a 6% v/m) e de Cellic Htec2 (0 a 0,5% v/m). A variável resposta foi concentração de glicose. Sendo as variáveis significativas temperatura e concentração de Cellic Ctec2.*

Palavras-chave: Lemnas, *Landoltia punctata*, hidrólise enzimática.

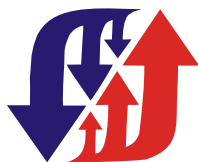
INTRODUÇÃO

Combustíveis alternativos, como os biocombustíveis, são considerados uma alternativa promissora aos combustíveis tradicionais, já que além de reduzir as emissões de gases de efeito estufa podem também atender a demanda cada vez maior por energia.

O etanol é produzido em escala industrial, principalmente, a partir de matérias-primas que contêm amido e açúcar, como o milho nos EUA e a cana-de-açúcar no Brasil (SANCHEZ; CARDONA, 2008). Tendo estes modos de produção alguns problemas, que incluem a segurança alimentar, meio ambiente e a insuficiência de terras agrícolas (CHEN et al., 2012). Assim, explorar matérias-primas alternativas faz-se necessário.

As lemnas, conhecidas popularmente no Brasil como “lentilha d’água” ou “marrequinha”, podem ser cultivadas em praticamente qualquer local e clima, embora prefiram os quentes e úmidos, e já vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de águas residuais. Possuem como principal vantagem a capacidade de acumular biomassa a velocidades mais rápidas do que outras plantas superiores com um tempo de duplicação de 2-7 dias (ORON; PORATH; WILDSCHUT, 1986; LANDOLT; KANDELER, 1987).

A espécie utilizada nesse estudo foi *Landoltia punctata*, cuja ocorrência foi verificada na região litorânea de Santa Catarina (MOHEDANO, 2010). Como fator de interesse, estudos



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

anteriores indicaram sua capacidade de acumular amido (3 a 75%) dependendo das condições de cultivo (REID; BIELESKI, 1970 apud CHEN et al., 2012). Aliado a isso, por ser uma espécie aquática e de pequeno porte, a pequena quantidade de lignina e a deficiência em hemicelulose facilita a conversão da fração de celulose em etanol, potencializando a utilização dessa matéria-prima (GE et al, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi definir a melhor condição para a sacarificação enzimática do amido e da celulose presente na biomassa.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

A espécie de lemnácea utilizada foi *Landoltia punctata*, cultivadas em esgoto sanitário oriundo de condomínios residenciais, e cedidas pelo Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Foram testadas as enzimas: Termamyl 2X (α -amilase), Spirizyme Fuel (amiloglucosidase), Pectinex Ultra AFP (pectina-liase), Cellic CTec2 (complexo de celulase, com elevada quantidade de β -glucosidasas) e Cellic Htec2 (endoxilanase com especificidade para hemicelulose), todas cedidas pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR.

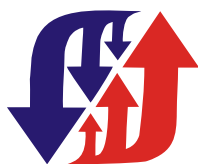
MÉTODOS

A biomassa seca (55 °C por 24 horas) e triturada foi analisada quanto ao teor de amido, usando um kit de amido total (Megazyme Internacional Irlanda), e quanto ao de celulose, pelo método de Van Soest (1994).

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL pela adição de 2 g de biomassa seca em 50 mL de tampão citrato de sódio (50 mM e pH 6,0), proporção essa definida em teste, e foi dividida em duas etapas: 1) Liquefação: etapa realizada em banho-maria, onde nesse estudo foi mantida fixa, sendo utilizada a concentração da α -amilase Termamyl 2x em 0,2% (v/m, em relação a biomassa), pH 6,0, temperatura de 95 °C, agitação de 150 rpm e tempo de 2 horas, baseado nas condições ótimas da própria enzima e em literatura consultada (ABUJAMRA, 2009; TORRES, 2009); 2) Sacarificação: etapa realizada em shaker e que nesse trabalho foi investigada, através de planejamento experimental, quanto ao pH, temperatura e concentrações das enzimas utilizadas (Spirizyme Fuel, Pectinex Ultra AFP, Cellic CTec2 e Cellic Htec2) em volume de enzima por massa de biomassa seca. O tempo de sacarificação foi determinado por cinética e a agitação mantida a 150 rpm.

Baseado em estudos prévios (CHEN et al., 2012; XU et al., 2011; GE et al., 2012), e com a finalidade de selecionar variáveis com maiores efeitos sobre o processo de hidrólise, foi empregado um planejamento do tipo Plackett-Burman, com 12 experimentos e triplicata no ponto central, apresentado na seção a seguir (Tabela 1). A variável resposta (dependente) do planejamento foi a concentração de glicose (g/L) e as faixas de estudo das variáveis independentes foram escolhidas levando em consideração as condições ótimas das enzimas e as recomendações dos fabricantes.

Os efeitos estimados de cada variável através do erro global entre os dados experimentais e as análises de variância (ANOVA) foram realizados utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc, USA).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

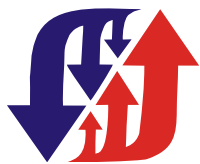
A biomassa utilizada nos experimentos continha 6,53% (p/p base seca) de amido, quantidade esta que está relacionada com as condições de crescimento, como afirma Reid e Bielecki (1970) apud Chen et al. (2012), que em estudos indicaram que *L. punctata* pode ter um teor de 3 a 75%, demonstrando o potencial dessa espécie em acumular amido. No entanto, devido à necessidade de uma grande quantidade de matéria-prima para condução dos experimentos e ao tempo hábil, não foi possível trabalhar com biomassa enriquecida. A celulose apresentou valor médio de 12,83% (p/p base seca) e em conformidade com Ge et al. (2012), que afirmam que lemnáceas têm aproximadamente 10% de celulose em peso seco.

A fim de definir o tempo de reação para a etapa de sacarificação, foi realizada uma cinética prévia de 24 horas, após a liquefação (tempo 0). As condições de sacarificação foram fixadas no ponto central do planejamento Plackett-Burman (Tabela 1) e amostras destrutivas, para determinação de glicose, foram retiradas em 0, 0,5, 1, 1,5, 2 horas e a partir daí retiradas a cada 2 horas até um total de 24 horas, onde foi possível observar que a concentração de glicose aumentou significativamente até as 2 horas (6,05 g/L), apresentando depois uma tendência a estabilizar, obtendo ao final do experimento, com 24 horas, uma concentração de 6,78 g/L (aumento de 12%), sendo então o tempo de 2 horas definido com o tempo de reação de sacarificação. Com isto, foi então realizado um planejamento do tipo Plackett-Burman para a etapa de sacarificação com o intuito de avaliar o efeito do pH, temperatura e concentração das enzimas Spirizyme Fuel (Amilo), Pectinex Ultra AFP (Pect), Cellic CTec2 (Ctec) e Cellic Htec2 (Htec) sobre a concentração de glicose. A etapa de liquefação, como descrita anteriormente, foi mantida constante em todos os experimentos.

A partir da Tabela 1 pode-se verificar que valores maiores e similares de concentrações de glicose foram obtidos nos ensaios 8, 9, 10 e no ponto central do planejamento (ensaios 13, 14 e 15) com um valor médio de 5,89 g/L \pm 0,25, sendo que nos três primeiros ensaios citados o ponto em comum foi a utilização da menor temperatura (45 °C) e a maior concentração de Cellic Ctec2 (6%).

Tabela 1 - Matriz do planejamento de experimentos Plackett-Burman (valores reais e codificados) com resposta em termos de concentração de glicose.

	pH	Temp (°C)	Amilo (%v/m)	Pect (%v/m)	Ctec (%v/m)	Htec (%v/m)	Glic (g/L)
1	6,0 (1)	45(-1)	0,3 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	2,92
2	6,0 (1)	65 (1)	0,1 (-1)	0,1 (1)	0 (-1)	0 (-1)	2,95
3	3,0(-1)	65 (1)	0,3 (1)	0 (-1)	6 (1)	0 (-1)	5,16
4	6,0 (1)	45(-1)	0,3 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,5 (1)	3,83
5	6,0 (1)	65 (1)	0,1 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	4,29
6	6,0 (1)	65 (1)	0,3 (1)	0 (-1)	6 (1)	0,5 (1)	4,55
7	3,0(-1)	65 (1)	0,3 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,5 (1)	3,12
8	3,0(-1)	45(-1)	0,3 (1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	6,17
9	3,0(-1)	45(-1)	0,1 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0,5 (1)	5,85
10	6,0 (1)	45(-1)	0,1 (-1)	0 (-1)	6 (1)	0,5 (1)	5,84
11	3,0(-1)	65 (1)	0,1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,5 (1)	3,31
12	3,0(-1)	45(-1)	0,1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	3,49
13	4,5 (0)	55 (0)	0,2 (0)	0,05 (0)	3 (0)	0,25 (0)	6,06
14	4,5 (0)	55 (0)	0,2 (0)	0,05 (0)	3 (0)	0,25 (0)	5,60
15	4,5 (0)	55 (0)	0,2 (0)	0,05 (0)	3 (0)	0,25 (0)	6,00



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Os dados apresentados na Tabela 1 foram tratados estatisticamente e os principais efeitos das variáveis, observados no Diagrama de Pareto, demonstraram que a concentração de Cellic Ctec2 e a temperatura apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) sobre a concentração de glicose. O efeito da Ctec (% v/m) mostrou-se positivo indicando que a elevação desse nível proporciona aumento da liberação de glicose. Já o efeito da variável temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foi negativo, assim a sua diminuição favorece a elevação de glicose. Esses resultados podem ser considerados relevantes, principalmente quando não demonstrada a necessidade de utilização de todas as enzimas estudadas, o que tornariam o processo mais oneroso. Além disso, o processo pode ser facilitado e ter seu custo diminuído pela não necessidade de correção do pH, possibilitando trabalhar com um pH único em toda a reação.

CONCLUSÕES

O baixo teor de amido encontrado na biomassa (6,53%) foi associado aos nutrientes do efluente utilizado para sua produção, que favorece seu crescimento e desfavorece o acúmulo de amido, sendo então necessária uma etapa adicional de enriquecimento após sua produção, como a escassez de nutrientes. Com o auxílio de um planejamento de experimentos do tipo Plackett-Burman foi possível determinar as variáveis significativas da etapa de sacarificação (concentração de Cellic Ctec2 e temperatura) e fixar a concentração de amiloglucosidase (0,1% v/m) e o pH (6,0). O tempo de reação foi determinado cineticamente em 2 horas. Devido à essa capacidade das lemnáceas de acumular amido, associada ao fato de crescerem em superfícies de águas residuais, não competindo assim com terras produtivas e nem com alimentos, as mesmas tornam-se uma matéria-prima potencial para produção de etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abujamra LB. 2009. Produção de destilado alcoólico a partir de mosto fermentado de batata-doce. 156f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade De Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.
- Chen Q, Jin Y, Zhang G, Fang Y, Xiao Y, Zhao H. 2012. Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. *J Energies* 5: 3019-3032.
- Ge X, Zhang N, Phillips GC, Xu J. 2012. Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *J Bioresour Technol* 124: 485-488.
- Landolt E, Kandeler R. 1987. The family of Lemnaceae - a monographic study: phytochemistry, physiology, application and bibliography in Biosystematic investigation the family of duckweeds. Zurich: Veroffenteichungendes Geobotanischen Institutes der Eidg. Techn. Hochschule, (ETH). pp.638.
- Mohedano RA. 2010. Uso de macrófitas Lemnáceas (*Landoltia punctata*) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono. Florianópolis: UFSC. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Oron G, Porath D, Jansen H. 1987. Performance of duckweed species *Lemna gibba* on municipal waste water for effluent renovation and protein production. *J Biotec & Bioeng* 29 (2):258-268.
- Reid MS, Bielecki RL. 1970. Response of *Spirodela-oligorhiza-M* to Phosphorus Deficiency, *J Plant Physiol* 46 (4): 609 - 613.
- Sanchez OJ, Cardona CA. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *J Bioresour Technol* 99:5270-5295.
- Torres LM. 2009. Caracterização dos parâmetros técnicos do processo de fabricação de aguardente a partir de gengibre. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Campus de Botucatu, São Paulo.
- Xu J, Cui W, Cheng, J J, Stomp AM. 2011. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *J Biosyst Engin* 110:67-72.