

# 12º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



## **TÍTULO DO TRABALHO:**

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASCA DE SOJA PRÉ-TRATADA POR EXPLOSÃO A VAPOR

## **AUTORES:**

Pedro A. Assini, Crisleine P. Draszewski, Ederson R. Abaide

## **INSTITUIÇÃO:**

Universidade Federal de Santa Maria

## HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CASCA DE SOJA PRÉ-TRATADA POR EXPLOSÃO A VAPOR

### Resumo

A hidrólise enzimática é um processo bioquímico que visa quebrar as moléculas complexas de carboidratos presentes na casca de soja em açúcares fermentáveis. Este método utiliza enzimas específicas, como celulasas e xilanases, que atuam sobre as ligações químicas dos polissacarídeos da casca de soja, transformando-os em açúcares simples, como glicose e xilose. Esses açúcares podem então ser fermentados por microrganismos, como leveduras, para produzir biocombustíveis, como etanol de segunda geração. A hidrólise enzimática é uma alternativa sustentável e eficiente para a valorização de resíduos agroindustriais, como a casca de soja, contribuindo para a produção de energia renovável e reduzindo o impacto ambiental. Entretanto para uma maior acessibilidade das enzimas aos carboidratos presentes na casca de soja, torna-se necessário a utilização de algum método de pré-tratamento. Entre os pré-tratamentos ambientalmente amigáveis podemos destacar a explosão a vapor, que abre a estrutura lignocelulósica em poucos minutos. Entretanto, a explosão a vapor geralmente é realizada utilizando uma solução ácida de até 3% m/m. Assim o objetivo deste trabalho é avaliar diferentes tempos de reação (5 e 10 minutos) de explosão a vapor a 180 °C, 5 MPa, utilizando apenas água como solvente e comparar com a eficiência do pré-tratamento utilizando como solvente uma solução ácida de 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, comumente utilizada na obtenção de uma biomassa rica em celulose. Posteriormente realizar a hidrólise enzimática com o coquetel enzimático Cellic CTec2, avaliando uma carga de substrato de 1 e 2%, com atividades enzimáticas de 15 e 30 FPU. Com a explosão a vapor foi possível dobrar o teor de celulose presente na casca de soja e não apresentou diferença significativa entre os solventes utilizados, demonstrando que na condição de pressão e temperatura utilizada, não há a necessidade de fazer uso de ácidos, tornando o processo mais verde. A hidrólise enzimática da casca de soja *in natura* apresentou um rendimento de 6,2 g/L de açúcares fermentescíveis, após a explosão a vapor na melhor condição, o rendimento em açúcares fermentescíveis foi 4 vezes maior. O que demonstra a eficiência deste pré-tratamento utilizando apenas água destilada. A partir da análise apresentada, pode-se concluir que a hidrólise enzimática, combinada com métodos de pré-tratamento, é uma abordagem promissora para a valorização da casca de soja, transformando-a em açúcares fermentáveis e, subsequentemente, em biocombustíveis.

Palavras-chave: explosão a vapor, casca de soja, hidrólise enzimática.

### Abstract

Enzymatic hydrolysis is a biochemical process that targets the brittle carbohydrate molecules present in soybean hulls into fermentable sugars. This method uses specific enzymes, such as cellulases and xylanases, which act on the chemical bonds of the polysaccharides in soybean hulls, transforming them into simple sugars, such as glucose and xylose. These sugars can then be fermented by microorganisms, such as yeast, to produce biofuels, such as second-generation ethanol. Enzymatic hydrolysis is a sustainable and efficient alternative for the recovery of agro-industrial waste, such as soybean hulls, contributing to the production of renewable energy and reducing environmental impact.

However, for greater accessibility of enzymes to carbohydrates present in soybean hulls, it is necessary to use some pre-treatment method. Among the environmentally friendly pre-treatments we can highlight the steam explosion, which opens a lignocellulosic structure in a few minutes. However, steam explosion is generally performed using an acidic solution of up to 3% m/m. Therefore, the objective of this work is to evaluate different occurrence times (5 and 10 minutes) of steam explosion at 180 °C, 5 MPa, using only water as solvent and compare with the efficiency of pre-treatment using an acid solution of 0.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, commonly used to obtain cellulose-rich biomass. Subsequently, performed enzymatic hydrolysis with the Cellic CTec2 enzyme cocktail, evaluating a substrate load of 1 and 2%, with enzymatic activities of 15 and 30 FPU. With the steam explosion, it was possible to vary the cellulose content in the soybean hulls. There was no significant difference between the solvents used, demonstrating that under the pressure and temperature conditions, there is no need to use acids, making the process greener. The enzymatic hydrolysis of fresh soybean hulls showed a yield of 6.2 g/L of fermentable sugars, after steam explosion in the best condition, the yield of fermentable sugars was 4 times higher. This demonstrates the efficiency of this pre-treatment using only distilled water. From the analysis presented, it can be concluded that enzymatic hydrolysis, combined with pre-treatment methods, is a promising approach for valorizing soybean hulls, transforming them into fermentable sugars and, subsequently, into biofuels.

Keywords: steam explosion, soybean hulls, enzymatic hydrolysis.

## **Introdução**

A eminente escassez de petróleo bruto, atrelado ao aumento populacional mundial vem preocupando as grandes potências mundiais. Estas desenvolveram um plano de sustentabilidade que dizem respeito às dimensões econômicas, ambientais e sociais. Na última década, a indústria tem se concentrado em desenvolver um método de produção mais sustentável, além disso fontes alternativas ou renováveis de produção de energia têm sido utilizadas e aprimoradas (Vardanega, Osorio-Tobón e Duba, 2022). Entre estas metodologias destaca-se a utilização de enzimas específicas para a conversão de biomassas lignocelulósicas em açúcares fermentescíveis. Dentre as biomassas lignocelulósicas, podemos destacar os resíduos agroindustriais, por serem abundantes e de baixo custo, como por exemplo a casca de soja. A soja é uma cultura vegetal de alta produção, com uma safra mundial em 2023 totalizando 410,6 milhões de toneladas, sendo o Brasil um dos principais produtores, com 148,2 milhões de toneladas (IBGE, 2023). A casca de soja, que representa cerca de 7% do peso total da colheita, é comumente queimada nas indústrias onde ocorre o processamento do grão. No entanto, os elevados teores de celulose e hemiceluloses presentes na casca de soja indicam um potencial significativo na hidrólise enzimática.

A hidrólise enzimática ocorre em condições mais brandas que a hidrólise ácida, por exemplo, sendo conduzida sob pH entre 4 e 5 e temperaturas entre 45 e 50°C. Trata-se de um processo ambientalmente amigável e é a única metodologia de hidrólise onde não ocorre a formação de inibidores de fermentação (Gomes *et al.*, 2020). Apesar dos benefícios da utilização das enzimas, antes desta etapa é de suma importância a realização de um pré-tratamento para que ocorra a abertura da estrutura lignocelulósica facilitando o acesso das enzimas a celulose e hemicelulose. Usualmente nas indústrias

de bioetanol se utilizam os pré-tratamentos ácidos que não são considerados ambientalmente amigáveis (Kumar, Mishra e Upadhyay, 2020). Considerando os métodos de pré-tratamento não tóxicos e de baixo custo, destaca-se a explosão a vapor. A explosão a vapor é um pré-tratamento amplamente empregado, que envolve submeter a biomassa ao calor sob pressão de vapor para despolimerizar a lignina e romper as fibrilas da celulose. Na explosão a vapor, a biomassa é aquecida na presença de vapor em altas temperaturas (160 – 280 °C) durante alguns minutos (1-10) sob alta pressão (0,7 – 4,8 MPa) (Zhang, Yuan e Cheng, 2017). Comumente, a explosão a vapor é realizada utilizando uma solução ácida de até 3% m/m. Porém levando em consideração os conceitos de sustentabilidade, a utilização de ácidos, mesmo que em pequenas concentrações não são indicadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho é realizar o pré-tratamento de explosão a vapor a 180 °C, 5 MPa, na casca de soja, avaliando diferentes tempos de reação (5 e 10 minutos) utilizando apenas água como solvente e comparar com a eficiência do pré-tratamento utilizando como solvente uma solução ácida de 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, comumente utilizada na obtenção de uma biomassa rica em celulose. Posteriormente realizar a hidrólise enzimática com o coquetel enzimático Cellic CTec2, avaliando uma carga de substrato de 1 e 2%, com atividades enzimáticas de 15 e 30 FPU.

## **Metodologia**

Para a realização da Explosão a vapor, as condições foram baseadas em Cavalaglio (et al., 2021). Primeiramente, o reator foi cuidadosamente abastecido com 10 g de casca de soja, evitando sua compactação. Em seguida, a bomba foi ligada até o preenchimento total da linha com água destilada (ou solução de 0,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> m/m), e o sistema de aquecimento foi ativado até atingir 180 °C, resultando em uma pressão de 5 MPa dentro do reator fechado. Com ambas as condições estabelecidas, o tempo de reação foi de 5 e 10 minutos. Após o tempo de reação, a válvula de saída foi aberta abruptamente para reestabelecer os níveis atmosféricos. A casca de soja pré-tratada foi lavada com água destilada para remoção completa do caldo e seca em estufa a 105 °C por 24 horas. Posteriormente, a composição lignocelulósica da casca pré-tratada foi avaliada para determinar o melhor tempo de reação.

A hidrólise enzimática foi baseada em Marcuzzo (et al., 2024) . O ensaio foi realizado com uma carga de substrato de 1 e 2% em um volume de 100 mL (frascos Erlenmeyer de 250 mL). Portanto, 1 ou 2 g de casca de soja (*in natura* e pré-tratada) foram usados para cada teste. Tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) foi adicionado, bem como solução de azida de sódio a 2%. De acordo com NREL/TP-510-42 629[29] protocolo, a atividade da celulose foi determinada antes da aplicação da enzima. A enzima usada foi a Cellic CTec2. Duas cargas de enzima foram avaliadas com diferentes Unidades de Papel de Filtro (FPU) para sólidos usados (13 e 26 FPU/g de substrato (base de peso seco)). A rotação usada nos testes de hidrólise enzimática foi de 250 RPM e uma temperatura de 50 °C. O tempo total de hidrólise foi de 48 h. Ao final da hidrólise alíquotas foram coletadas estas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **Resultados e Discussão**

A casca de soja pré-tratada a 180 °C, 5 MPa, com um tempo de reação de 5 e de 10 minutos, utilizando água destilada como solvente ou uma solução de 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> m/m, tiveram a sua composição lignocelulósica avaliada, estes resultados estão apresentados na Tabela 1. A variação no tempo de reação da explosão a vapor não ocasionou diferença significativa nos resultados obtidos. A única condição que apresentou variação foi utilizando ácido durante 10 minutos. Nesta condição os teores de celulose foram

inferiores as demais (59,84%), visto que ao utilizar 0,5% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  durante tempos muito prolongados promovem a hidrólise parcial não só da hemicelulose, mas também da celulose presente na biomassa. Como o intuito do pré-tratamento é enriquecer a biomassa em celulose para posterior hidrólise enzimática, esta condição foi descartada. Para as demais condições os teores de celuloses aumentaram aproximadamente 110% ao comparar com a casca de soja *in natura*. Além disso os teores de hemicelulose e lignina reduziram em torno de 63% e 46%, respectivamente. Resultados semelhante foi obtido na condição utilizando a solução ácida (0,5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) por 5 minutos. Demonstrando que é possível obter um sólido rico em celulose em um curto tempo de reação (apenas 5 minutos) sem a utilização de catalisadores ácidos que possam ser prejudiciais ao meio ambiente.

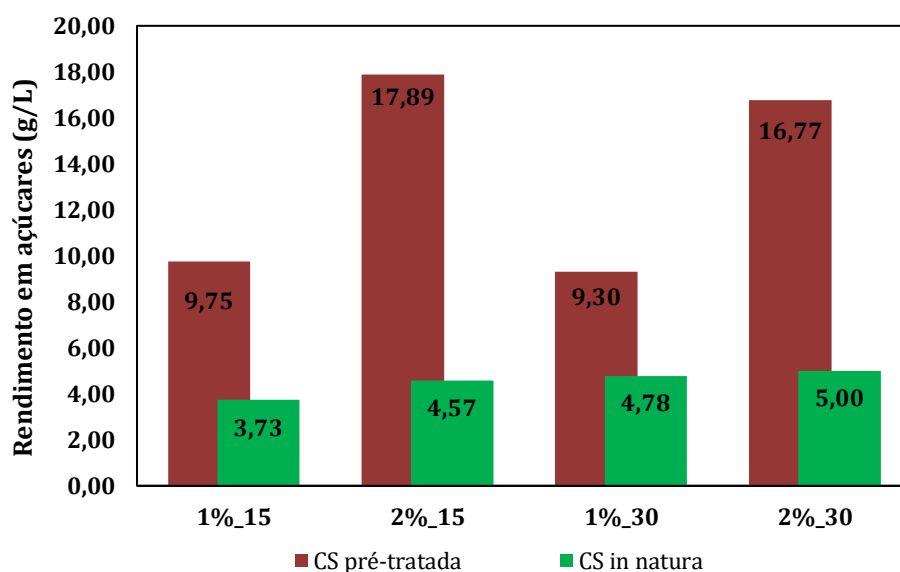
Tabela 1. Composição lignocelulósica da casca de soja *in natura* e daquela submetida a explosão a vapor a 180 °C, 5 MPa, por 5 min (EV 5 min), por 10 min (EV 10 min) e submetida a solução de 0,5% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,5% ac).

| Condição            | Celulose (%)              | Hemicelulose (%)          | Lignina (%)               | Sólido remanescente (%)   |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| CS <i>in natura</i> | 33,72 ± 0,67 <sup>a</sup> | 24,42 ± 0,34 <sup>a</sup> | 20,15 ± 0,83 <sup>a</sup> | -                         |
| EV 5 min            | 70,52 ± 1,47 <sup>b</sup> | 9,08 ± 0,73 <sup>b</sup>  | 10,87 ± 0,50 <sup>b</sup> | 48,28 ± 0,52 <sup>a</sup> |
| EV 10 min           | 75,04 ± 2,04 <sup>b</sup> | 8,91 ± 0,63 <sup>b</sup>  | 11,92 ± 0,62 <sup>b</sup> | 46,76 ± 0,40 <sup>a</sup> |
| 0,5% ac 5 min       | 73,34 ± 0,86 <sup>b</sup> | 6,82 ± 0,21 <sup>c</sup>  | 15,26 ± 1,15 <sup>b</sup> | 37,20 ± 0,24              |
| 0,5% ac 5 min       | 59,84 ± 2,36 <sup>c</sup> | 5,62 ± 0,26 <sup>c</sup>  | 12,82 ± 0,21 <sup>b</sup> | 24,59 ± 0,41              |

Letras diferentes em uma mesma coluna, indica que há diferença estatística entre elas, de acordo com teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Após a determinação da melhor condição de explosão a vapor (EV 5 min) esta foi utilizada na realização da hidrólise enzimática. A Figura 1 apresenta o rendimento em açúcares fermentescíveis para as hidrólises realizadas tanto com a casca de soja *in natura*, quanto com aquela submetida a explosão a vapor em diferentes condições.

Figura 1- Rendimento em açúcares fermentescíveis da hidrólise enzimática da casca de soja *in natura* e da pré-tratada por explosão a vapor.



Pela Figura 1 é nítido o aumento nos rendimentos após submeter a casca de soja a explosão a vapor. Utilizando uma carga sólido de 1% e 15 FPU após a explosão a vapor, o rendimento apresentou um aumento de 2,6 vezes, já utilizando uma carga sólido igual a 2% o rendimento apresenta um acréscimo superior a 3,9. Utilizando uma atividade enzimática de 30 FPU o rendimento em açúcares foi aproximadamente 2 vezes maior para a casca de soja pré-tratado, quando comparada com a *in natura* para a carga de sólido de 1%. Para a carga de sólido de 2% este valor é ainda maior chegando a 3,4 vezes maior. É importante destacar que a avaliação das diferentes atividades enzimáticas avaliadas (15 e 30 FPU) não apresentaram diferença significativa. Já a carga de sólido utilizada esta diretamente ligada ao rendimento em açúcares fermentescíveis. Os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por Silva (et al., 2024), que realizou um processo de extração da celulose do bambu e a submeteu a hidrólise enzimática a 50 °C e em 48h obteve um rendimento de 14,36 g/L. O que corrobora a eficiência da explosão a vapor como pré-tratamento para posterior hidrólise enzimática. Visto que neste trabalho a biomassa pré-tratada ainda apresentava teores de hemicelulose e lignina e mesmo assim foi capaz de obter resultados superiores aos expostos na literatura.

### Conclusões

De acordo com os resultados apresentados, a casca de soja foi satisfatoriamente submetida a explosão a vapor sob 180 °C, 5 MPa, usando como solvente água destilada, e com apenas 5 minutos de reação apresentou um enriquecimento nos teores de celulose de aproximadamente 110%, demonstrando que não há a necessidade de fazer uso de catalisadores ácidos. Além disso ao utilizar a casca de soja pré-tratada na hidrólise enzimática os rendimentos em açúcares fermentescíveis apresentaram um aumento de 4 vezes mais, sob a condição de 2% de carga sólido, com uma atividade enzimática de 15 FPU. Observando os resultados obtidos ainda é possível destacar que como não ocorreu diferença estatística entre as atividades enzimáticas avaliadas seria interessante realizar novos ensaios experimentais utilizando valores ainda menores para atividades e verificar se é possível realizar a diminuição da quantidade de enzima utilizada sem prejudicar o rendimento total obtido.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Recursos Humanos (PRH/ PRH 52.1) da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

### Referências Bibliográficas

CAVALAGLIO, G. *et al.* Acid-catalyzed steam explosion for high enzymatic saccharification and low inhibitor release from lignocellulosic cardoon stalks. **Biochemical Engineering Journal**, v. 174, p. 108121, out. 2021.

GOMES, M. G. *et al.* Pretreatment of sugarcane bagasse using citric acid and its use in enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 157, p. 332–341, set. 2020.

IBGE, I. B. DE G. E E. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola- maio 2023.**

KUMAR, M.; MISHRA, P. K.; UPADHYAY, S. N. Thermal degradation of rice husk: Effect of pre-treatment on kinetic and thermodynamic parameters. **Fuel**, v. 268, p. 117164, maio 2020.

MARCUZZO, N. *et al.* Obtaining oil and fermentable sugars from olive pomace using sequential supercritical fluid extraction and enzymatic hydrolysis. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 211, p. 106288, set. 2024.

SILVA, M. F. DA *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis of cellulose extracted from bamboo culm for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* modified via CRISPR/Cas9. **Food Research International**, v. 192, p. 114768, set. 2024.

VARDANEGA, R.; OSORIO-TOBÓN, J. F.; DUBA, K. Contributions of supercritical fluid extraction to sustainable development goal 9 in South America: Industry, innovation, and infrastructure. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 188, p. 105681, set. 2022.

ZHANG, X.; YUAN, Q.; CHENG, G. Deconstruction of corncob by steam explosion pretreatment: Correlations between sugar conversion and recalcitrant structures. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 351–356, jan. 2017.