



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1104157-9

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1104157-9

(22) Data do Depósito: 03/08/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 16/08/2016

(51) Classificação Internacional: C12P 19/04; C12P 7/08; C12P 7/10.

(54) Título: PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOB ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO - UFES, -. Endereço: Av. Fernando Ferrari, 514, Campus 1, Goiabaeiras, Vitória, ES, BRASIL(BR), 29075-910, Brasileira

(72) Inventor: ERICA DUTRA ALBUQUERQUE; ANTONIO ALBERTO RIBEIRO FERNANDES; PATRICIA MACHADO BUENO FERNANDES.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 03/08/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 15/06/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



Relatório Descritivo

"PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOB ALTA PRESSÃO
HIDROSTÁTICA A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS"

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção trata de um processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática a partir de resíduos agroindustriais, em particular resíduos da casca de coco verde. Por tratar-se de um substrato rico em carboidratos, o processo utiliza-se de enzimas celulasas
10 sob alta pressão hidrostática e temperatura moderada para atividade celulásica como parte do processo de sacarificação para a produção do bioetanol celulósico. O método pode ser utilizado na indústria de biocombustíveis, que utiliza a hidrólise enzimática como parte do processo
15 de sacarificação para a produção de etanol a partir de resíduos agrícolas e agro-industriais de composição lignocelulósica. Na presente invenção os resíduos de coco verde são utilizados como substrato lignocelulolítico e expostos a uma mistura de celulasas sob pressão
20 hidrostática e temperatura, podendo dobrar a eficiência da reação.

ESTADO DA TÉCNICA

Nos últimos anos, o grande apelo ambiental mundial fez com que o mercado mundial de etanol se expandisse de maneira
25 exponencial. Este crescimento deveu-se a diversos fatores como a políticas ambientais e à busca por fontes energéticas alternativas ao petróleo. Desta forma, no Brasil não só o uso de etanol como combustível é

estimulado, como também sua adição a combustíveis fósseis, como a gasolina. Entretanto, devido à grande demanda do etanol, sua quantidade disponível atualmente não é suficiente para atendimento à necessidade mundial.

5 Uma alternativa economicamente viável e ambientalmente sustentável ao problema é a busca por fontes alternativas de etanol, destacando-se a produção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Desta forma, a utilização de resíduos agroindustriais apresenta-se como um importante
10 meio para a produção de etanol aliado ao aproveitamento de resíduos.

Em geral, as atividades agroindustriais são caracterizadas pela geração de grande quantidade de materiais lignocelulósicos. Tais resíduos apresentam-se como os
15 recursos naturais renováveis mais abundantes do planeta Terra. Adicionalmente, a grande disponibilidade desses materiais os torna as matérias-primas ideais para a produção de etanol de forma sustentável.

Quando submetidos a reações de hidrólise, as grandes
20 moléculas de carboidratos presentes nos resíduos agroindustriais podem ser quebradas e disponibilizadas para serem transformadas em etanol em processos posteriores de fermentação. Para que as estruturas dos carboidratos estejam mais disponíveis ao ataque biológico em geral o
25 material lignocelulósico é tratado, facilitando o processo enzimático. Assim, as moléculas de celulose apresentam-se cerca de 10 a 20 vezes mais disponíveis à reação das celulasas. Entretanto, essa quantidade de celulose ainda

apresenta-se muito aquém do que poderia ser extraído dos materiais lignocelulósicos.

Atualmente a grande quantidade de resíduos de casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.) produzido é um grande problema ambiental. O problema existe especificamente nas áreas onde o volume de coco utilizado para, principalmente, o consumo da água é grande. Ainda, nas regiões em que há a utilização do coco para extração da polpa, nos casos do coco seco, o volume de resíduos é acentuado.

10 Segundo dados da FAO a produção brasileira de coco verde em 2009 foi de 1.973.370 de toneladas caracterizando-se como o quarto produtor mundial do coco. Além da grande produção e consumo atual, o mercado do coco verde tende a expandir-se, principalmente em termos de exportações. Esta elevada
15 produção e consumo do coco verde geram uma grande quantidade de resíduos, constituído essencialmente pelas cascas do fruto, que representam de 80-85% do peso bruto do coco.

O problema da disposição dos resíduos do coco verde acentua-se nos grandes centros urbanos, onde esse material é de difícil descarte, sendo enviado para lixões e aterros sanitários. Além disso, o descarte desses resíduos sólidos representa um custo adicional às indústrias processadoras do coco verde, que como grandes geradoras de resíduo
25 apresentam responsabilidade pela coleta do material (ROSA, M. de F., et. al. Caracterização do Pó da Casca de Coco Verde Usado Como Substrato Agrícola. Comunicado Técnico nº 51, p. 1-6, EMBRAPA, 2001).

A casca do coco verde apresenta composição variável conforme a época do ano, fonte e a quantidade de chuvas. Rica em fibras naturais é, portanto, composta por grande quantidade de materiais lignocelulósicos. Desta forma, uma
5 excelente alternativa para a redução da geração de resíduos do coco verde é a utilização deste material como fonte de carboidratos para a produção de etanol combustível. Além de trazer importantes vantagens ambientais, a produção de etanol a partir das cascas do coco verde proporciona outros
10 benefícios como a redução da competição entre etanol e alimentos, maior aproveitamento dos recursos naturais, diminuição da quantidade de resíduos gerados pela indústria, barateamento da produção de etanol, dentre outros.

15 Assim, os resíduos do coco verde, provenientes do consumo de sua água, apesar de representar um grande problema ambiental para as áreas consumidoras, podem constituir-se uma valiosa fonte de matéria-prima para a produção de etanol.

20 Para que se possa aproveitar os carboidratos complexos existentes na casca do coco verde é necessária a hidrólise destes carboidratos de forma eficiente. O processo descrito na presente patente apresenta-se como uma excelente alternativa para uma eficaz hidrólise da celulose a
25 carboidratos menos complexos, disponíveis à posterior fermentação alcoólica.

A hidrólise enzimática é uma estratégia que não produz as substâncias tóxicas que são geradas pelo processo da hidrólise química (hidrólise ácida), além de minimizar a

inibição da fermentação. A hidrólise enzimática utiliza-se de enzimas que, biologicamente convertem carboidratos complexos a açúcares disponíveis a serem fermentados. O novo processo revelado aqui, para processamento dos
5 resíduos da casca de coco verde se utiliza de um complexo de celulase, ou celulases totais, para a hidrólise eficiente de carboidratos da casca do coco verde. As enzimas são utilizadas para clivar os polímeros de celulose em açúcares redutores tais como glicose.

10 A alta pressão hidrostática (HHP, do inglês *high hydrostatic pressure*), é uma técnica utilizada em diversos estudos científicos e apresenta aplicação industrial em vários setores. Já é amplamente relatada, inclusive na literatura patentária, a utilização da alta pressão
15 hidrostática para esterilização de alimentos líquidos ou sólidos, que são submetidos a pressões acima de 100 MPa (1 MPa = 145,038 psi = 10 bar). O tratamento à alta pressão hidrostática, que utiliza pressões de 100 a 1000 MPa, é utilizado para destruição dos microorganismos e, ainda,
20 para retardar ou ativar as reações enzimáticas. A pressurização é realizada em espaço limitado, com a água como meio de transferência da pressão e de reação. A pressão aplicada e o tempo de aplicação dependem do tipo do produto a ser tratado e do produto final desejado
25 **(TORREZAN, R. Uso da Tecnologia de Alta Pressão para a Inativação de Microorganismos em Produtos Cárneos. B.CEPPA, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 249-266, 2003).**

A alta pressão hidrostática permite o aumento da atividade das celulases na degradação das fibras da casca do coco
30 verde. Os valores da pressão hidrostática propostos pela

presente patente permitem mudanças conformacionais das enzimas celulasas, aumentando sua atividade hidrolítica. Ainda, essas celulasas mudam sua conformação e sob pressão parecem ser estimuladas por glicose, aumentando sua atividade. A alta pressão não atua apenas nas enzimas, mas também afeta o substrato, liberando maior quantidade de açúcar redutor dos resíduos lignocelulolíticos do que à pressão ambiente, demonstrando uma quebra desses polímeros.

A literatura científica e de patentes sobre processo de hidrólise enzimática a partir de resíduos agroindustriais, será discutida a seguir no presente relatório. Vale salientar que a hidrólise enzimática associada à alta pressão hidrostática não foi relatada em nenhum trabalho. Ainda, não foi observado no estado da arte nenhum processo para a produção de combustíveis utilizando a casca do coco verde. Desta forma, na matéria presente neste invento, não existem trabalhos semelhantes, sendo considerado o estado da técnica. Os demais inventos abaixo relacionados apresentam-se como metodologias distintas para a hidrólise enzimática de outros resíduos agroindustriais. Não obstante, os documentos apresentados são relevantes para a caracterização dos requisitos de novidade e atividade inventiva do processo.

A literatura patentária trata da produção de etanol a partir de diversos tipos de resíduos agroindustriais. O bagaço da cana de açúcar apresenta-se como o principal resíduo relatado nas patentes.

No âmbito comercial, algumas empresas como a BETA-GLUCOSIDASE e GENENCOR produzem enzimas com alta atividade celulásica e

isolam os seus microrganismos produtores. Após o isolamento, tais empresas buscam melhorar a atividade dessas enzimas produzindo misturas celulásicas visando principalmente a hidrólise do bagaço de cana para a
5 produção de etanol.

O documento **PI 0605017-4** traz um "**PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS POR VIA ENZIMÁTICA**". A invenção propõe um método para produção de bioetanol a partir de resíduos agrícolas e agroindustriais
10 de composição ligno-celulósica, em particular o bagaço da cana de açúcar. Os carboidratos complexos são submetidos à hidrólise branda com ácido sulfúrico e o material resultante da hidrólise enzimática (SSF) é submetido à fermentação alcoólica, aumentando a conversão à etanol em
15 tempos reduzidos. Em contraposição à **PI 0605017-4**, o pré-tratamento alcalino empregado no presente invento não gera inibidores como hidroximetil furfural e furfural produzidos no tratamento ácido, o que possui vantagens técnicas e econômicas, pois diminui os inibidores da fermentação. Em
20 termos de hidrólise enzimática a patente citada acima utiliza uma grande quantidade de enzimas comerciais GENENCOR, utilizando entre 20 30 FPU.g⁻¹. No processo realizado sob pressão proposto, a concentração de enzimas utilizadas pode ser diminuída pela invenção para alcançar a
25 mesma quantidade de açúcares liberados. Assim, diminuir a quantidade usada de celulase comercial na hidrólise de resíduos lignocelulolíticos é crucial, pois celulases são consideradas um dos maiores custos da produção de etanol celulósico. Pela presente invenção, a eficiência de
30 hidrólise enzimática da **PI0605017 -4** pode ser aumentada com a pressão hidrostática, liberando maior quantidade de

açúcar redutor, e diminuindo a quantidade de enzima utilizada, o que poderá diminuir os custos.

Semelhantemente à SSF (Fermentação e Sacarificação Simultâneas), a hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática aumenta a quantidade de açúcares liberados por aumento da atividade enzimática e por desinibição do processo de hidrólise, já que sob pressão é estimulada por glicose. A vantagem da hidrólise em condições de pressão sob a invenção proposta na **PI0605017-4** é que sob pressão são liberados até 80% menos fenóis, inibidores da fermentação, do que a hidrólise realizada em SSF que possui agitação. Além de diminuir a quantidade de fenóis liberados durante a hidrólise enzimática, a presente invenção também aumenta a glicose liberada, sendo esta maior que em processos que utilizam rotação. Isto caracteriza o hidrolisado gerado como de alta qualidade para a produção de etanol. Assim, a pressão hidrostática pode ser implantada em bioreatores para hidrólise, substituindo a rotação que é de alto custo energético.

A patente brasileira **PI0607857-5 A2 "PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE RESÍDUO DE PROCESSAMENTO CÍTRICO"** apresenta processos para a produção de etanol a partir de resíduos de frutos cítricos. Como o limoneno existente nesses resíduos é agente interferente na fermentação alcoólica, há também a redução da concentração desta substância, melhorando a eficiência fermentativa. Um método alternativo de remoção de limoneno utiliza hidrólise enzimática seguida por centrifugação para separar o líquido contendo açúcar dos sólidos cítricos residuais contendo limoneno. Os açúcares são fermentados e o etanol é destilado da mistura

fermentada . Os sólidos e líquidos resultantes podem ser processados adicionalmente para render outros subprodutos. Neste invento, para que houvesse melhorias no processo, a utilização da pressão conforme descrita na presente
5 patente, poderia diminuir as etapas da metodologia para os resíduos cítricos, por comprimir a biomassa cítrica e liberar mais facilmente o limoneno e/ou utilizar celulase e pressão hidrostática juntas para liberar mais açúcares redutores para posterior produção de etanol .

10 A **PI 0700481-8** apresenta um **"PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL"**, proporcionando um processo de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar e, posterior hidrólise enzimática deste substrato a açúcares fermentáveis e fermentação. A **PI 0700481-8** não
15 utiliza de agitação ou de um processo de sacarificação e fermentação simultâneas, a hidrólise sob pressão hidrostática poderia ser utilizada para aumentar a quantidade de açúcares redutores liberados por desinibição do processo.

20 A patente **PI 0701968-8** trata de um **"PROCESSO DE HIDRÓLISE ÁCIDA CONTÍNUA E CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS CELULÓSICAS"**. A invenção propõe um processo para transformar a biomassa por hidrólise ácida, submetendo o material celulósico à ação de reatores de transformação térmica e ácida contínua e
25 controlada. Tal invento propõe a utilização da hidrólise ácida que possui alto nível de impactos ao meio ambiente. A presente invenção se destaca, pois utiliza enzimas e pressão hidrostática que são tecnologias limpas e com menor gasto energético e não produz inibidores tais como
30 hidroximetilfurfural e furfural .

O documento de patente **JP 2010077 410 'METHOD FOR PRODUCING LIQUID FUEL DERIVED FROM BIOMASS, AND APPARATUS THEREFOR'** traz um método e um aparato para a produção de combustível líquido derivado de biomassa. Neste a decomposição térmica
5 de gás gerado por decomposição de biomassas vegetais (dentre os quais cascas de coco) é fracionado em alcatrão, ácido acético, água, etc. Após os estágios de fracionamento, o combustível líquido de alta qualidade é produzido. A pressão hidrostática juntamente com celulases
10 aplicada à patente **JP 2010077 410** poderia diminuir o tempo de decomposição de biomassas vegetais e produzir gás mais rapidamente para a decomposição térmica, isso devido à maior liberação dos açúcares e desfibrilamento da biomassa vegetal facilitando a decomposição.

15 A patente **WO 2010134219 'METHOD FOR PRODUCING BIODIESEL FUEL OIL AND PRODUCTION DEVICE THEREFOR'** propõe um método pelo qual um óleo combustível com baixa viscosidade, ponto de fluidez baixo e alto número de cetanos, pode ser produzido por decomposição térmica de óleos de um conjunto
20 de frutas, dentre estas o óleo de coco. O material é aquecido a uma temperatura entre 360 °C e 510 °C. Quando a temperatura atinge o nível projetado, um catalisador de decomposição é adicionado e a temperatura de decomposição térmica é conduzida a uma temperatura superior ao nível
25 projetado. Tal processo requer o gasto de muita energia térmica. O processo proposto no presente documento se destaca por caracterizar-se como uma tecnologia energeticamente econômica.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática para produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

5 Mais especificamente, o processo da invenção compreende o pré-tratamento do pó da casca de coco verde, um resíduo agroindustrial, com hidróxido de sódio para amenizar a interação das fibras da casca de coco verde por retirar parte da lignina, tornando-as mais acessíveis à atuação das
10 enzimas celulolíticas. Após incubação, o material é submetido à hidrólise enzimática sob condições de alta pressão hidrostática e temperatura entre 40 °C e 60 °C, permitindo a quebras das moléculas dos carboidratos complexos à açúcares menores.

15 A presente invenção apresenta vantagens consideráveis frente ao estado da técnica. A introdução da alta pressão durante o processo de hidrólise aumenta em cerca de duas vezes a eficiência das celulasas na liberação de açúcar. Ainda, a hidrólise de compostos celulósicos feita por
20 misturas de celulasas utilizando a alta pressão hidrostática é aumentada, liberando cerca de duas vezes mais açúcares redutores, como a glicose, do que a hidrólise à pressão ambiente, o que conseqüentemente poderá aumentar a produção do etanol celulósico. Isto permite que a
25 metodologia proposta destaque-se como potencializadora da hidrólise de carboidratos complexos, permitindo que a alta pressão hidrostática seja aplicada a várias metodologias de degradação de carboidratos complexos. Desta forma, o aumento da quantidade de açúcares redutores permite que tal

processo possa diminuir os custos com enzimas pela metade e também os custos do processo por galão de etanol na ordem de milhões de dólares.

Além das vantagens produtivas, o mecanismo proposto
5 apresenta-se como ecologicamente correto, já que além de não utilizar os reagentes degradadores ambientais da hidrólise ácida, a produção de etanol a partir das cascas do coco verde proporciona maior aproveitamento dos recursos naturais. Por meio da presente invenção, as cascas do coco
10 verde, antes classificadas como resíduos de difícil disposição, podem ser utilizadas como substratos para a geração de fonte energética. Tal característica, além de contribuir com o meio ambiente, proporciona a diminuição dos custos de produção de combustíveis.

15 Outros benefícios como a redução da competição entre etanol e alimentos e a diminuição da quantidade de resíduos gerados pela indústria também podem ser elencados entre as importantes vantagens do processo proposto no presente documento.

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O processo descrito na presente invenção pode ser melhor detalhado e compreendido mediante referência às figuras presentes neste pedido e a seguinte descrição:

A presente invenção tem por objetivo o aproveitamento dos
25 resíduos da casca do coco verde, os quais poderão ser substratos para obtenção de biocombustível, mais especificamente o etanol. Tal etanol poderá ser utilizado como combustível ou poderá constituir um aditivo a outros

combustíveis como a gasolina e em outros processos químicos.

As frações polissacarídicas originárias da presente invenção podem também ser utilizadas em outras áreas. Atualmente, o interesse na utilização de polissacarídeos de origem vegetal tem aumentado tanto para na medicina quanto na área de cosméticos. Os efeitos na saúde em humanos à partir da introdução dos polissacarídeos vegetais na dieta incluem efeitos anti-câncer, imunomodulação, antibacterianos e anti-cardiovasculares. Outra área de interesse é na dieta animal como ração, os restos dos sólidos não hidrolisados pelas enzimas podem ser utilizados na alimentação animal, já que são ricos em fibras e lignina que tem importante papel na digestão.

15 Como mostrado na **Figura 1** as cascas de coco verde in natura (1) são estocadas de -8 a -10 °C. Após lavagem em água destilada para remover os resíduos, o material é seco a 85 - 90 °C até a obtenção de peso constante. Desta forma, são obtidos os sólidos totais, que são moídos em moinho de 20 discos vibratórios por 3 - 5 minutos. O pó da casca de coco verde obtido é então padronizado por tamisação e suas partículas separadas em peneira de 40-mesh com abertura de 0.42mm.

A primeira etapa do Processo de Hidrólise Enzimática sob 25 Alta Pressão Hidrostática a Partir de Resíduos Agroindustriais compreende o pré-tratamento do pó da casca do coco verde (2), com hidróxido de sódio e desestruturação das interações das fibras lignocelulósicas da casca de coco verde. Para deslignificação, o pó da casca de coco

resultante da trituração é tratado na proporção 1:10 p/v com hidróxido de sódio 2,0 - 2,5 M na temperatura ambiente por 30 - 40 minutos, sob agitação orbital a 150 - 160 RPM, a 20 - 21 °C. Logo após, submete-se o material à ação da autoclave, a 123 12 5 °C por 30 4 0 minutos. Após resfriamento até a temperatura ambiente, o material é filtrado a vácuo com o auxílio do funil de buchner. A lavagem é então realizada até a água da lavagem atingir um pH próximo da neutralidade. Novamente, a fim de se obter um peso constante e os sólidos totais, o material é seco a 85 - 90 °C (3).

Esta desestruturação propiciada pelo pré-tratamento torna as fibras mais acessíveis à atuação das enzimas celulolíticas.

15 Após o tratamento básico, os sólidos totais são submetidos à hidrólise enzimática sob condições de alta pressão hidrostática entre 200 - 400 MPa e temperatura entre 40 °C e 60 °C (4), permitindo a quebra do material lignocelulósico a açúcares menores. As enzimas utilizadas na hidrólise no presente invento são enzimas celulases de fungos celulolíticos (*Trichoderma* sp, *Trichoderma reesei* RUT C 30, *Aspergillus niger*) e celulases comerciais tais como É um complexo enzimático de cellulases 1.51 e Beta-glucosidase 188 (Beta-glucosidases, Dinamarca). As enzimas comerciais foram misturadas em uma proporção de 20 25 volume de 1:1.

Para a hidrólise incuba-se o substrato juntamente com celulases diluídas ou não em tampão acetato de sódio. A solução reacional é feita utilizando-se tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, o qual é adicionado juntamente com as

celulases (carga enzimática de 1 FPU - 30 FPU.g⁻¹), ao substrato com concentração de sólidos de 2% em massa. A proporção de volume utilizada de enzimas e de tampão acetato de sódio é 1:1, a concentração final da solução reacional é de 2% (p/v). Antes de incubar esta solução reacional em condições de pressão, a célula de pressão é pré-aquecida nas condições de temperatura desejadas (40 - 60 °C). A solução reacional é incubada sob condições de pressão hidrostática entre 200 e 400 MPa e temperatura entre 40 e 60 °C por 30 minutos. O processo de sacarificação segue-se em condições similares por 72 horas utilizando enzimas comerciais em uma concentração de 5 FPU - 7 FPU.g⁻¹ de substrato.

A dosagem de açúcares redutores (5) é feita utilizando método de DNS (Miller, 1959), em que alíquotas de 100 µl do hidrolisado são reagidas com 300 µl de reagente DNS à 100 °C por 10 minutos. A leitura da absorbância é feita à 540nm após diluição em 800 µl de água destilada esterilizada. A dosagem de glicose é feita utilizando um kit comercial baseado no teste enzimático colorimétrico com a enzima glicose-oxidase e a peroxidase.

A taxa de hidrólise (6) é calculada de acordo com a curva padrão de glicose como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor.min⁻¹.ml⁻¹ (UI). A dosagem de celulases utiliza o método de Bradford (1976), sendo expressa em mg.ml⁻¹. A taxa de hidrólise é calculada no final como µmol de açúcar redutor.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína ou UI.mg⁻¹ de proteína (celulase).

A presente invenção apresenta-se como um avanço no estado da técnica já que a utilização da alta pressão juntamente com a temperatura como um mecanismo para aumentar a hidrólise enzimática, ou sacarificação, em até 200% pode ser implantada em reatores de biorefinarias. Desta forma o processo industrial da geração de etanol poderá ter seus resultados dobrados.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS/DESENHOS

A operação da invenção, juntamente com vantagens adicionais da mesma podem ser bem explanadas e compreendidas mediante referência aos desenhos em anexo e a seguinte descrição:

A **Figura 1** anexa, apresenta um fluxograma simplificado das principais etapas do processo da invenção.

A **Figura 2** anexa, mostra um gráfico que ilustra os resultados obtidos com o processo da invenção, demonstrando a média de todas as hidrólises celulásicas realizadas pelas celulasas dos fungos e pelas comerciais, tanto sob alta pressão hidrostática quanto em pressão ambiente. Nele é apresentada a porcentagem de aumento da hidrólise enzimática, ou taxa de aumento, tanto em substrato do tipo papel de filtro (utilizado como controle, celulose pura) como em casca de coco (substrato lignocelulósico). O aumento da hidrólise sob pressão hidrostática é cerca de 2 vezes maior que na pressão ambiente (fora da pressão hidrostática).

A **Figura 3** anexa, mostra um gráfico que ilustra os resultados obtidos com o processo da invenção. Nele é apresentada a quantidade de açúcar redutor (em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$

¹mg⁻¹ de substrato) para amostras de papel filtro e casca de coco sob pressão ambiente e pressão hidrostática. A figura demonstra o efeito da pressão sob os substratos na ausência de enzimas. O papel de filtro e casca de coco, são
5 ligeiramente hidrolisados na ausência de enzimas sob pressão hidrostática, demonstrando que existe uma quebra.

A **Figura 4** anexa demonstra um gráfico que ilustra os resultados obtidos com o processo da invenção. Nele é apresentada a hidrólise sob pressão ambiente e alta pressão
10 hidrostática durante um período de 72 horas usando a mistura de enzimas comerciais É um complexo enzimático de cellulases 1.5 L e Novozymc
188.

EXEMPLOS

As avaliações utilizando o processo proposto permitiram o
15 aumento da eficiência do processo de hidrólise. Os resultados obtidos estão representados nas **Figuras 2, 3 e 4**.

Os resíduos lignocelulolíticos são deslignificados durante o pré-tratamento. Assim, os sólidos totais obtidos pelo
20 pré-tratamento são misturados com as celulases (diluídas ou não), com carga enzimática de 1 FPU 30 FPU.g⁻¹ de substrato, sendo o volume completado com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 (em uma proporção de volume de 1:1/tampão:enzima) para obter uma concentração final da
25 solução reacional de 2% p/v. Essa solução reacional é então incubada em condições de alta pressão. O aumento da taxa de hidrólise celulolítica ocorre em condições de pressão variando de 200 400 MPa juntamente com o aumento da temperatura. A taxa de aumento foi cerca de duas vezes

maior quando comparada com a da pressão ambiente, demonstrando que em média a hidrólise celulásica sob alta pressão hidrostática é mais eficiente que a hidrólise realizada na pressão ambiente (**Figura 2**). Isso é devido
5 tanto à quebra do substrato sob pressão (**Figura 2**) quanto à mudança conformacional das celulasas que ocorre entre os valores de pressão de 200 400 MPa, este último fator demonstrou ser de fundamental importância, pois sem a mudança conformacional das enzimas não ocorreria um aumento
10 significativo da hidrólise celulolítica em condições de aumento de temperatura e pressão.

A pressão é capaz de diminuir o volume reacional e aumentar o contato das celulasas com o substrato. Além de que, a pressão hidrostática também atua sob o substrato na
15 ausência de enzimas, liberando uma maior quantidade de açúcares redutores do que o substrato à pressão ambiente após 30 minutos(ilustrado na **Figura 3**). Isto demonstra uma quebra do substrato ou formação de fissuras, o que aumenta o contato com as enzimas. O efeito provocado na figura 3, sozinho, não é capaz de realizar uma hidrólise efetiva.
20

Somente a pressão não é capaz de liberar uma quantidade significativa de açúcares redutores dos resíduos lignocelulolíticos, mas o efeito sinérgico de pressão hidrostática, celulasas e temperatura aumenta a eficiência
25 da hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulolíticos. A média de todas as taxas de hidrólises celulolíticas (μmol de açúcar redutor $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) realizadas pelas enzimas celulasas demonstrou que o aumento pode ser alcançado em até 2 vezes (**Figura 3**).

Os resultados do presente invento em um período de 72 horas de hidrólise enzimática podem ser observados na **Figura 4**. Nele é apresentada a hidrólise sob pressão ambiente e alta pressão hidrostática usando a mistura de enzimas comerciais

5 É um complexo enzimático de cellulases 1.5 L e Beta-glucosidase 188. A quantidade de açúcares reductores liberados do resíduo da casca de coco por hidrólise enzimática, sob pressão hidrostática, pode ser de até 2 vezes mais do que a hidrólise enzimática do resíduo à

10 pressão ambiente. Em um período de 24 horas obteve-se um aumento de até 2 vezes, tanto para açúcares reductores totais quanto para a glicose (**Figura 4**). Em 72 horas pouca quantidade de celobiose é convertida à glicose, aumentando a quantidade de glicose, mas não alterando a quantidade de açúcar redutor. Hidrolisados de resíduos lignocelulolíticos

15 são caracterizados por conterem diversas frações monossacarídicas, principalmente xilose e glicose, por isso a maior quantidade de açúcares reductores totais. Vale ressaltar que a hidrólise realizada pela pressão hidrostática não utiliza de agitação orbital, como nos

20 processos de SHF (Fermentação e Hidrólise em Separado) e em SSF (Fermentação e Hidrólise/Sacarificação Simultâneas), tornando a pressão hidrostática uma ferramenta energeticamente econômica que pode substituir a agitação em bioreatores de biorefinarias.

25 Na **Figura 4** também pode ser notado que a hidrólise sob pressão é estimulada pela liberação de glicose, com efeito de desinibição semelhante à SSF, porém com a vantagem de não precisar de agitação liberando até 80% menos fenóis que em agitação orbital. Isto caracteriza o hidrolisado obtido

30 como de qualidade para a fermentação, pois contém baixa concentração de inibidores.

Reivindicações

"PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SOB ALTA PRESSÃO
HIDROSTÁTICA A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAISu

- 5 1 . Processo de hidrólise enzimática caracterizado por
ser submetido à alta pressão hidrostática e utilizar
casca- de coco como resíduo agroindustrial (1) e
compreender as seguintes etapas:
- 10 a. pré-tratamento do resíduo agro-industrial com solução
de hidróxido de sódio (2);
- b. obtenção de sólidos totais (3);
- c. hidrólise do material celulósico sob condições de
alta pressão e temperatura (4);
- 15 d. dosagem de açúcares redutores (5);
- e. cálculo da taxa de hidrólise (6);
2. Processo de hidrólise enzimática caracterizado por
ser submetido à alta pressão hidrostática e utilizar,
por exemplo , a casca de coco verde como resíduo
agroindustrial;
- 20 3. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a
reivindicação 1, caracterizado por utilizar cascas de
coco verde , conforme etapa a., o qual após ser moído em
moinho de disco vibratório e suas partículas
padronizadas por tamisação, é tratado com hidróxido de

sódio 2,0 - 2,5 M na proporção 1:10 p/v por 30 - 40 minutos sob agitação de 150 - 160 rpm de 20 - 21 °C;

4. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por submeter o material à autoclavagem, a 123 - 125 °C por 30 - 40 minutos e posterior filtração à vácuo;

5. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por submeter o material à lavagens para obtenção de pH entre 6 - 8;

6. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 1, etapa b., caracterizado pelo material ser seco uma faixa de temperatura entre 85 - 90°C para obtenção de sólidos totais;

7. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 1, etapa c., caracterizado por utilizar enzimas celulasas, em uma carga enzimática de 1 FPU - 30 FPU.g⁻¹ de substrato, de fungos celulolíticos (como por exemplo, *Trichoderma* sp, *Trichoderma reesei* RUT C30, *Aspergillus niger*) e celulasas comerciais (tais como É um complexo enzimático de celulasas e Novozyrne 188, na proporção de 1:1);

8. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo material ser submetido à alta pressão hidrostática de 200 - 400 MPa e temperatura de 40 - 60 °C;

9. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo substrato ser

incubado com celulasas diluídas ou não em tampão acetato de sódio;

10. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela solução reacional
5 ser composta por tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, o qual é adicionado juntamente com as celulasas (1:1/ tampão :celulasas) ao substrato, na concentração de sólidos de 2% em massa, com concentração final de 2% (p/v) ;

10 11. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 1, etapa d., caracterizado pela dosagem de açúcares redutores ser feita utilizando método de DNS, em que alíquotas de 100 µl do hidrolisado reagem com 300
15 µl de reagente DNS à 100 °C por 10 minutos e serem diluídas em 800 µl;

12. Processo de hidrólise enzimática, de acordo com a reivindicação 1, etapa e., caracterizado pela taxa de hidrólise ser calculada de acordo com a curva padrão de glicose e calculada como µmol de açúcar redutor.min⁻¹.mg⁻¹
20 ¹de proteína (ou UI.mg⁻¹ de proteína) ;

13. Processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por aumentar a hidrólise enzimática de qualquer resíduo lignocelulolítico em concentração
25 enzimática de 1 FPU - 30 FPU.g⁻¹ de substrato;

14. Processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo aumento do processo de sacarificação enzimática em um período de até 72 horas;

5 14. Processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela sua utilização em aumento do processo de sacarificação enzimática em um período de até 72 horas utilizando misturas de enzimas comerciais em concentração de 5 FPU - 7 FPU.g⁻¹ de substrato para a produção de etanol;

10 15. Processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática, de acordo com a reivindicação 1 a 14, caracterizado pela sua utilização na produção de etanol.

FIG. 1

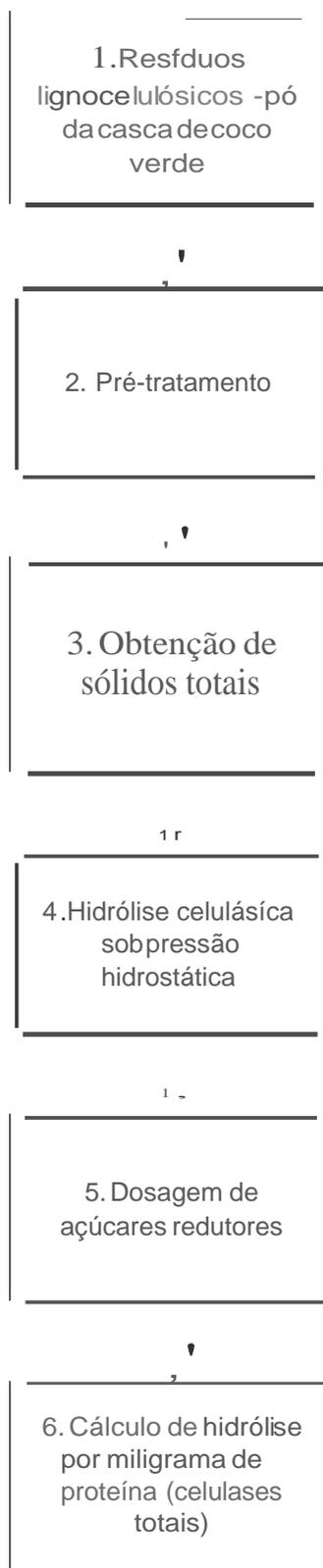


FIG . 2

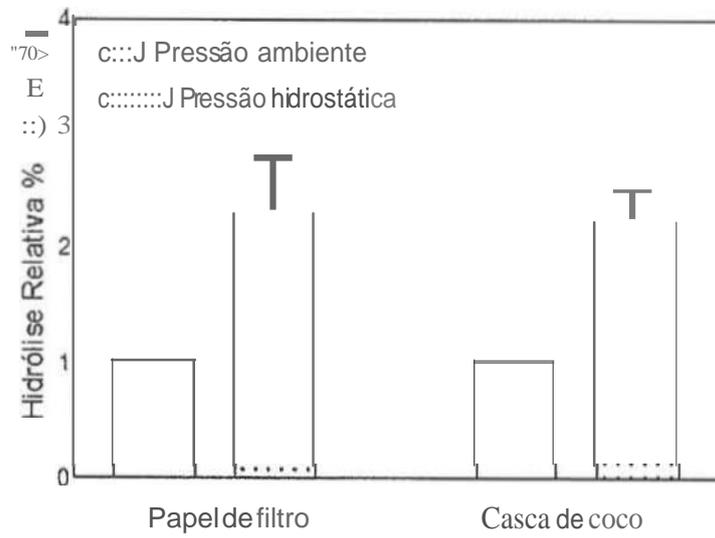


FIG. 3

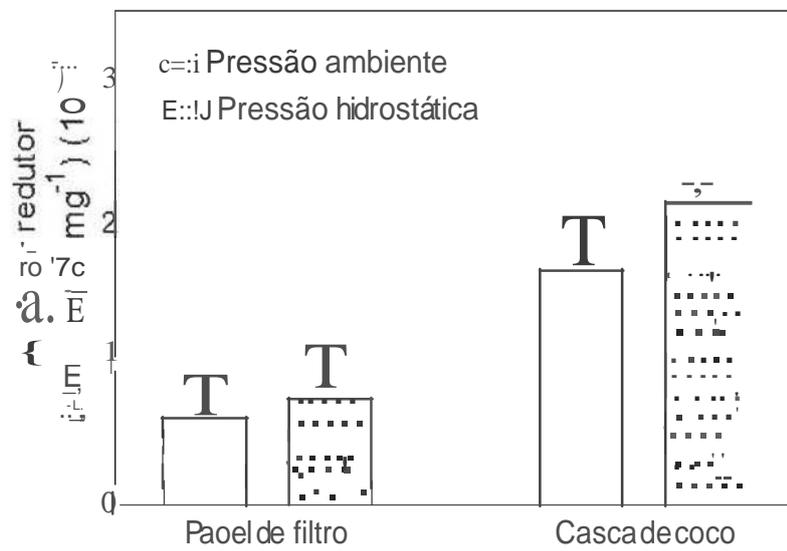


FIG. 4

