



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014024610-0 A2



(22) Data do Depósito: 02/10/2014

(43) Data da Publicação: 26/04/2016

(RPI 2364)

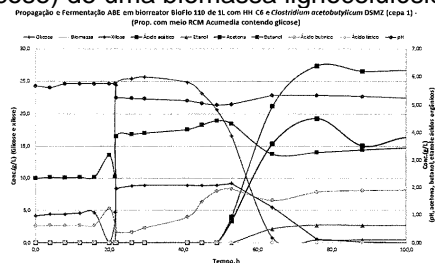
(54) **Título:** PRODUÇÃO DE SOLVENTE À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

(51) **Int. Cl.:** C12P 7/10; C12P 7/16; C12P 7/28; C12R 1/145

(73) **Titular(es):** PETROLEO BRASILEIRO S. A. - PETROBRAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

(72) **Inventor(es):** ABSAI DA CONCEIÇÃO GOMES, LÍDIA PEREIRA JUNIOR, CAROLINA ARAÚJO BARCELOS, ANA PAULA RODRIGUES TORRES, NEI PEREIRA JUNIOR

(57) **Resumo:** PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. É descrito um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona, butanol e etanol, pela fermentação com bactérias do gênero Clostridium de uma mistura de correntes de hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose) de uma biomassa lignocelulósica.



## PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

### CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de processos fermentativos para a produção de solventes, em especial butanol, acetona e etanol. Mais especificamente o processo envolve a hidrólise ácida de uma biomassa lignocelulósica, onde a fração sólida obtida é posteriormente submetida a hidrólise enzimática, sendo os hidrolisados recuperados submetidos a fermentação ABE .

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O processo de fermentação anaeróbica para a produção de acetona, butanol e etanol, ou fermentação ABE (*acetona-butanol-etanol*) já é conhecido há mais de cem anos.

[003] Tal processo emprega bactérias do gênero *Clostridium*, na forma de bacilos gram-positivos, formadores de esporos, em especial as espécies: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* e *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*.

[004] A principal vantagem na aplicação deste gênero de bactéria em processos fermentativos deve-se ao fato destes serem capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono, tal como hexoses (glicose, frutose, manose, sucrose, lactose, galactose), pentoses (xylose e arabinose) e fontes de amido, sem a necessidade de hidrólise dos polímeros de açúcares.

[005] Embora sendo uma rota já conhecida e ser baseado na utilização de matérias-primas renováveis, um dos maiores entraves no emprego de tal rota em larga escala é o aspecto econômico, mais especificamente no que diz respeito a matéria-prima (biomassa) e a energia dispendida nos processos de separação.

[006] Atualmente inúmeros estudos vêm sendo efetuados no sentido de se utilizar como matéria-prima biomassa residuais, ou seja, resíduos ou

subprodutos e excedentes de outros processos produtivos, em especial resíduos lignocelulósicos (bagaço, palha, madeira, resíduos de dendê, dentre outros).

[007] O pedido de patente WO2010098694 descreve um processo para a produção de solventes orgânicos, mais especificamente acetona, butanol e etanol, pela fermentação anaeróbica. O processo envolve a sacarificação de matéria-prima de origem vegetal, previamente triturada fisicamente, com enzimas capazes de degradar ou converter tal material em açúcares solúveis; fermentação dos açúcares pela ação de uma bactéria produtora de ABE e recuperação dos solventes por evaporação difusa através de uma membrana pela aplicação de vácuo. Neste caso, há dificuldades na disponibilização dos açúcares presentes nos resíduos lignocelulósicos, pela utilização de uma única etapa de sacarificação, além disso, a matéria-prima empregada, lascas de madeira, faz necessária uma etapa adicional de remoção de piche por extração com solventes, preferencialmente acetona ou etanol.

[008] A utilização de meios hidrolisados açucarados oriundos do pré-tratamento tais resíduos lignocelulósicos possui, ainda, o inconveniente de gerar inibidores, em especial furfural, 5-HMF, e polifenóis, que inibem tanto o crescimento quanto o metabolismo bacteriano.

[009] Algumas tentativas vêm sendo realizadas com o intuito de superar tais obstáculos.

[010] O pedido de patente US 20100330633, por exemplo, descreve o processo de obtenção de butanol por fermentação ABE a partir de resíduos lignocelulósicos pré-tratados, com uma etapa prévia de destoxificação pelo uso de sistemas de resinas de troca iônica, de maneira a reduzir as altas concentrações de inibidores gerados no processo de pré-tratamento, que utiliza a hidrólise ácida à altas temperaturas, entre 170° e 230° C.

[011] Apesar de ser responsável pela remoção dos inibidores a etapa

de destoxificação acarreta alto custo ao processo tecnológico, além de ocasionar perdas representativas de substrato e de nutrientes, fundamentais na obtenção de altos rendimentos na fermentação ABE.

[012] Sendo assim, não há na literatura, descrição nem sugestão de um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona-butanol e etanol, de forma que não seja necessária a utilização de uma etapa para a remoção de compostos inibidores, sendo este processo descrito e reivindicado a seguir.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[013] A presente invenção propõe a produção fermentativa para a obtenção de butanol, acetona e etanol utilizando uma bactéria do gênero *Clostridium* a partir de uma mistura de uma corrente rica em glicose (concentração acima de 60%*m/m*) e uma corrente rica em xilose (concentração acima de 60%*m/m*), provenientes do processo hidrolítico de uma biomassa lignocelulósica.

[014] Neste processo, uma carga composta por biomassa lignocelulósica é submetida à uma etapa de pré-tratamento ácido em condições brandas (temperaturas de 110°C a 120°C), sendo obtidas duas fases: uma fase sólida e uma fase líquida rica em xilose, a fase sólida é submetida a etapa adicional de hidrólise enzimática empregando um tensoativo como aditivo, e, posteriormente, uma corrente líquida rica em glicose, obtida após a prensagem da fase sólida, é misturada com a corrente líquida rica em xilose, sendo a mistura submetida então a uma etapa de fermentação ABE.

[015] O processo possibilita atingir rendimento global na faixa de 0,35 a 0,47 g/g, com concentração ABE final de 11,5 a 18,7 g/L, valores este similares aos encontrados na literatura, e produtividade volumétrica global de 0,17 a 0,67 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, sem o inconveniente da necessidade de uma etapa adicional de destoxificação para a remoção de compostos inibidores (furfural, 5-hidroximetil-furfural e compostos fenólicos).

[016] De um modo amplo o processo aqui descrito combina três vantagens em relação ao estado da técnica quanto a produção por rota bioquímica de solventes:

- a) Emprego de um microrganismo capaz de utilizar o açúcar na sua forma oligomérica, evitando o emprego de grandes quantidades de enzimas celulásicas, acima de 10%*m/m* na hidrólise de biomassa lignocelulósica, já que o objetivo de tais enzimas é quebrar estes oligossacarídeos em monômeros.
- b) Emprego de tensoativo:
  - i) Na etapa de hidrólise: ao modificar a propriedade da superfície da celulose, minimiza a ligação irreversível das celulasas sobre a celulose, o que promoveria a perda de atividade das celulasas.
  - ii) Na etapa de fermentação ABE: aumento da produtividade;
- c) Hidrólise ácida a temperatura inferior às empregadas usualmente, de modo que os compostos inibidores (HMF, furfural e compostos fenólicos) são produzidos em uma concentração tal que não é necessária a etapa prévia de destoxificação.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[017] A Figura 1 apresenta o perfil cinético de uma fermentação ABE, empregando uma cepa de *Clostridium acetobutylicum*, tendo como substrato uma mistura de um hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose) de uma biomassa lignocelulósica, contendo 25 g/l de glicose e 8 g/L de xilose respectivamente.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[018] A presente invenção trata de um processo fermentativo ABE (acetona, butanol e etanol), utilizando como fonte de substrato e nutrientes o hidrolisado proveniente do processo hidrolítico de biomassa lignocelulósica.

[019] Tal biomassa lignocelulósica pode ser escolhida dentre: resíduos de milho, capim elefante, palha de arroz, palha de trigo, bagaço de cana, palha ou resíduos de dendê, madeira.

[020] Neste processo, a carga de biomassa lignocelulósica é submetida a uma etapa de cominuição, sendo geradas partículas de sólido de tamanho variando de 1 a 60 mm, que são então submetidas a um pré-tratamento com uma solução aquosa de um ácido forte em concentrações variando de 0,5-1%*m/m*, numa relação sólido/líquido variando de 1:2 a 1:4, por um período de tempo de 20 a 40 minutos e pressão variando de 1 a 2atm.

[021] Dentre os ácidos fortes úteis para a presente invenção podemos citar: ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico, ou misturas destes.

[022] A biomassa é então submetida a uma etapa de separação física, mais especificamente prensagem, onde é removida uma fase líquida rica em xilose (concentração acima de 60%*m/m*) e uma fase sólida. A fase sólida é então submetida à hidrólise enzimática, na presença de um tensoativo em concentrações variando de 3 a 5%*m/m*, seguida de nova separação física, dando origem a uma corrente líquida rica em glicose (concentração acima de 65%*m/m*).

[023] Os tensoativos uteis para a presente invenção são tensoativos não iônicos, escolhidos dentre: poli(oxietileno), sorbitan-monolaurato, polietilenoglicol, ou ainda misturas destes.

[024] Durante a hidrólise enzimática as celulases diminuem a sua atividade, sendo a adsorção irreversível das celulases sobre a celulose parcialmente responsável por essa desativação. A adição de tensoativos durante a etapa de hidrólise é relevante, pois é capaz de modificar a propriedade da superfície da celulose, minimizando a ligação irreversível das celulases sobre a celulose.

[025] A hidrólise enzimática é efetuada com o auxílio de um preparado enzimático celulásico com uma concentração de proteínas variando de 60

a 90 mg proteínas/L, composto por uma mistura de enzimas escolhidas dentre :celobiohidralases e beta-glicosidades. A adição de tais preparados à fase sólida é efetuada sob pH controlado, na faixa de 4,5 a 5,5, e numa proporção sólido/líquido de 10 a 20%. Esta etapa tem duração de 48 a 72 horas (ou de no mínimo – 48 horas) e ocorre a temperaturas variando de 45 a 55°C.

[026] A corrente rica em glicose e a corrente rica em xilose obtidas nas etapas anteriormente descritas são misturadas em uma razão (xilose) / (glicose) de 1:2 a 1:6 e servem como carga para um reator contendo biomassa de bactérias do gênero *Clostridium*, obtida após uma etapa de propagação bacteriana utilizando meio nutriente otimizado (6g/L de peptona, 6g/L de extrato de levedura e 12g/L de glicose) no período de 8 a 24 horas, a 37° C.

[027] Dentre as bactérias do gênero *Clostridium*, as úteis para a presente invenção são aquelas das espécies: *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium beijerinckii*, em especial a da espécie *Clostridium acetobutylicum*.

[028] A fermentação ABE ocorre a uma temperatura variando de 35 a 40, por um período de pelo menos 48 horas para o consumo de glicose e xilose.

[029] Assim, a presente invenção trata de um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona, butanol e etanol, por fermentação ABE, empregando a bactéria do gênero *Clostridium*, dito processo incluindo as seguintes etapas:

- 1) Prover uma carga para o processo, constituída por biomassa lignocelúlosica;
- 2) Acrescentar uma solução aquosa de um ácido forte à carga em uma concentração variando de 0,5-1% m/m, numa relação sólido/líquido de 1:2 a 1:4, à temperatura entre 110°C e 120 °C, e sob agitação de

- modo a obter uma corrente com alto teor de sólidos, de pelo menos 20% m/m;
- 3) Submeter a corrente de alto teor de sólidos a um processo de separação, obtendo-se uma fase sólida, com razão sólido/líquido de pelo menos 20%, e uma fase líquida rica em xilose (concentração acima de 60% m/m);
  - 4) Acrescentar à fase sólida um preparado enzimático celulásico, na presença de um tensoativo, e na proporção sólido/líquido entre 10% e 20% m/m, a um pH entre 4,0 e 5,5 por um tempo necessário para a geração de uma fase líquida rica em glicose (concentração acima de 6,5%);
  - 5) Misturar a fase líquida rica em xilose com a fase líquida rica em glicose na proporção 1:2 a 1:6;
  - 6) Adicionar a mistura obtida no item (5) a um reator contendo biomassa compreendendo bactérias do gênero *Clostridium*, numa proporção 1:1v/v, iniciando-se assim a fermentação a uma temperatura variando de 35 a 40°C, por um período de pelo menos 48 horas, de modo a produzir os solventes, acetona, butanol e etanol.

[030] Os exemplos, a seguir, correspondem a experimentos em escala de laboratório sem limitar o escopo do processo, detalhadamente descrito até aqui.

### **EXEMPLO 1**

[031] Num reator foi efetuada a etapa de propagação microbiana de uma cultura de uma bactéria da espécie *Clostridium acetobutylicum* (DSMZ cepa1), caracterizada nas primeiras 20 horas com a formação de ácidos butírico e acético. Após este período, foi adicionado ao reator o hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose), contendo 25 g/l de glicose e 8 g/L de xilose para a promoção da fermentação ABE, conforme a Figura 1. A fase acidogênica da fermentação (formação de



ácido butírico e ácido acético) ocorreu entre 16 e 50 horas de processo e, em seguida, a fase solventogênica, que atingiu o máximo de concentração dos solventes butanol, acetona e etanol em 80 h, com concentrações de 6,5 g/L, 4,9 g/L e 0,8 g/L, respectivamente. O processo fermentativo (sem contar com a propagação) teve duração de 48 horas, com utilização da glicose primeiramente e, em seguida da xilose. Ambos os substratos foram esgotados no meio, obtendo-se um rendimento global ( $Y_{P/S}$ ) de 0,37g/g, concentração ABE final de 12,2 g/L e produtividade volumétrica global de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , valores compatíveis com a literatura.

## REIVINDICAÇÕES

1- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA, caracterizado por** compreender a fermentação, empregando bactérias do gênero Clostridium, utilizando como fonte de substrato e nutrientes o hidrolisado proveniente do processo hidrolítico de biomassa lignocelulósica.

2- **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA, caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- 1) Prover uma carga para o processo, constituída por biomassa lignocelulósica;
- 2) Acrescentar uma solução aquosa de um ácido forte à carga em uma concentração variando de 0,5-1% m/m, numa relação sólido/líquido de 1:2 a 1:4, à temperatura entre 110°C e 120 °C, e sob agitação de modo a obter uma corrente com alto teor de sólidos, de pelo menos 20% m/m;
- 3) Submeter a corrente de alto teor de sólidos a um processo de separação, obtendo-se uma fase sólida, com razão sólido/líquido de pelo menos 20%, e uma fase líquida rica em xilose (concentração acima de 60% m/m);
- 4) Acrescentar à fase sólida um preparado enzimático celulásico, na presença de um tensoativo, e na proporção sólido/líquido entre 10% e 20% m/m, a um pH entre 4,0 e 5,5 por um tempo necessário para a geração de uma fase líquida rica em glicose (concentração acima de 6,5%);
- 5) Misturar a fase líquida rica em xilose com a fase líquida rica em glicose na proporção 1:2 a 1:6
- 6) Adicionar a mistura obtida no item (5) a um reator contendo biomassa compreendendo bactérias do gênero Clostridium, numa proporção 1:1v/v, iniciando-se assim a fermentação a uma

temperatura variando de 35 a 40°C, por um período de pelo menos 48 horas, de modo a produzir os solventes, acetona, butanol e etanol.

**3- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por a biomassa lignocelulósica ser escolhida dentre: resíduos de milho, capim elefante, palha de arroz, palha de trigo, bagaço de cana, palha ou resíduos de dendê, madeira.

**4- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por a biomassa lignocelulósica ser submetida a uma etapa de cominuição, sendo geradas partículas de sólido de tamanho variando de 1 a 60 mm.

**5- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o ácido forte ser escolhido: ácido sulfúrico, ácido nítrico, e ácido clorídrico, ou misturas destes.

**6- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por a por a adição do ácido forte ser efetuada durante um período de tempo de 20 a 40 minutos e sob pressão variando de 1 a 2atm.

**7- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por a adição do preparado enzimático celulásico ser efetuada na presença de um tensoativo em concentrações variando de 3 a 5%<sub>m/m</sub>.

**8- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o tensoativo ser um tensoativo não iônico.

**9- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE**

**BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o tensoativo ser escolhido dentre: poli(oxietileno), sorbitan-monolaurato, polietilenoglicol, ou ainda misturas destes.

**10- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o preparado enzimático celulásico com uma concentração de proteínas variando de 60 a 90 mg proteínas/L, composto por uma mistura de enzimas escolhidas dentre: celobiohidrolases e beta-glicosidases.

**11- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o tempo necessário para a geração da fase líquida rica em glicose ter duração de 48 a 72 horas e sob temperaturas variando de -45 a 55°C.

**12- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por a biomassa de bactérias ser obtida após uma etapa de propagação de uma cultura de bactéria do gênero *Clostridium* utilizando meio nutriente otimizado (6g/L de peptona, 6g/L de extrato de levedura e 12g/L de glicose) no período de 8 a 24 horas, a 37° C.

**13- PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por a bactéria do gênero *Clostridium*, ser escolhida dentre uma bactéria das espécies: *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium beijerinckii*, em especial a da espécie *Clostridium acetobutylicum*.

Propagação e Fermentação ABE em biorreator BioFlo 110 de 1L com HH C6 e *Clostridium acetobutylicum* DSMZ (cepa 1) -  
(Prop. com meio RCM Acumedia contendo glicose)

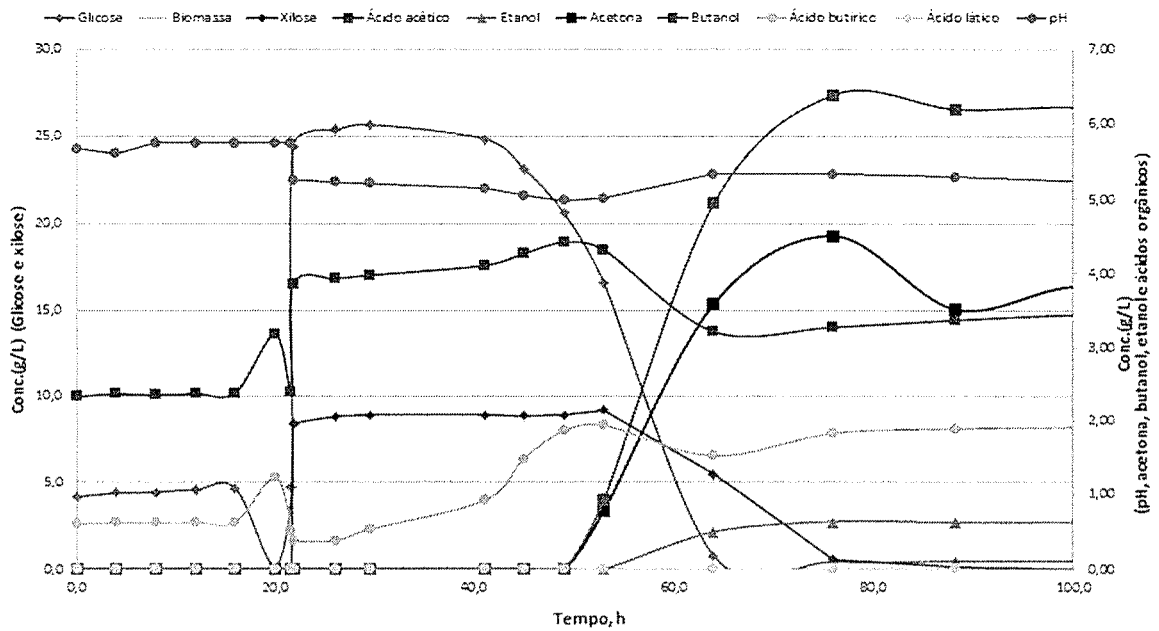


FIG. 1

## **RESUMO**

### **PRODUÇÃO DE SOLVENTES À PARTIR DE HIDROLISADOS DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

É descrito um processo para a produção de solventes, mais especificamente acetona, butanol e etanol, pela fermentação com bactérias do gênero *Clostridium* de uma mistura de correntes de hidrolisado hemicelulósico (xilose) e celulósico (glicose) de uma biomassa lignocelulósica.