



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA TRATADO COM VAPOR A ALTA PRESSÃO

NERY¹, M. C.; COSTA², H. C. B.; COUTINHO FILHO³, U.; CARDOSO*³, V. L.

¹ Aluna da FEQ/UFU ² Doutorando da FEQ/UFU ³ Professor(a) da FEQ/UFU

Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de Uberlândia

Endereço – FEQ/UFU, Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP. 38.408-14

e-mail: vicelma@ufu.br

RESUMO - A cana-de-açúcar é extensivamente utilizada como matéria-prima para produção de etanol no Brasil, gerando grandes quantidades de bagaço como resíduo. Na maioria das vezes, este bagaço é queimado nas caldeiras das próprias usinas sucro-alcooleiras para fornecer energia ao processo. No entanto, diversos estudos nos últimos anos têm apontado este resíduo como potencial matéria-prima para produção de etanol de segunda geração. Neste presente trabalho, bagaço de cana previamente tratado com vapor a alta pressão foi utilizado como substrato para fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Primeiramente, avaliou-se a produção de etanol por hidrólise por dois tratamentos utilizando diferentes complexos enzimáticos. A hidrólise foi realizada de duas maneiras: anteriormente à fermentação e simultaneamente à esta. A maior produção de etanol foi obtida para o complexo NS 50012 com a fermentação realizada posteriormente à hidrólise. A partir destes resultados, foram feitos testes utilizando o complexo NS 50012 e variando o pH e a temperatura da hidrólise feita anteriormente à fermentação. Os melhores resultados foram obtidos em uma faixa de pH entre 3,5 e 5 e a uma temperatura entre 45 e 70°C.

Palavras-chaves: álcool etílico, celulase, celulose.

INTRODUÇÃO

A agricultura no Brasil sempre desempenhou um papel importante na economia do país e durante muitos anos foi a base da mesma. O setor agrícola brasileiro é um dos maiores exportadores do mundo em diversas espécies de cereais, grãos, frutas, entre outros (Kohlhepp, 2010).

Nesse contexto, a cana de açúcar ocupa a segunda posição de culturas cultivadas no Brasil, quanto à área (ficando atrás apenas da soja). Este fato torna o país o maior produtor de cana do mundo. Tem-se a expectativa que na safra de 2012/2013, de acordo com a Conab, as usinas sucro-alcooleiras do Brasil irão processar mais de 602 milhões de toneladas de cana, produzindo cerca de 39

milhões de toneladas de açúcar e 24 bilhões de litros de etanol (Canilha *et al.*, 2012).

A composição da cana de açúcar pode ser dividida em quatro partes: fibras, sólidos solúveis, sólidos insolúveis e água. As fibras contêm todos os compostos orgânicos sólidos; os sólidos não solúveis geralmente são inorgânicos, como rochas e terras, e são oriundos da colheita da cana; e os sólidos solúveis são compostos principalmente de sacarose.

Por meio de um processo de moagem, do caule da cana é extraído o caldo, líquido constituído por água e açúcares, utilizado para a produção de açúcar ou de etanol. Como um subproduto da moagem tem-se o bagaço que normalmente é queimado para fornecer energia para todo o processo da usina. Para cada tonelada de cana processada obtém-se um total de 270-280 kg de bagaço (Canilha *et al.*, 2012).

O bagaço é composto por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero de cadeia longa, formada por um único monômero: a glicose. A hemicelulose é um polissacarídeo constituído por hexoses, pentoses e ácidos urônicos. A lignina é um composto aromático formado pela polimerização de alguns álcoois e é responsável pela rigidez dos tecidos vegetais (Canilha *et al.*, 2012).

A produção de etanol através do bagaço é possível e vem sendo uma alternativa de destino deste subproduto nas usinas sucro-alcooleiras, substituindo a queima do mesmo. Diferentemente do etanol oriundo do caldo, o bagaço deve passar por algumas etapas antes da fermentação. A celulose presente no mesmo deve ser hidrolisada por complexos enzimáticos produzindo glicose. Assim torna-se possível a fermentação alcóolica realizada por leveduras.

Devido ao aumento do preço do petróleo e da preocupação com a quantidade de CO₂ emitida, os biocombustíveis ganham espaço no mercado mundial (Kohlhepp, 2010). Dessa forma o etanol de segunda geração surge como uma boa opção. Estima-se que com o emprego deste tipo de álcool o rendimento de produção de etanol por hectare de cana plantada aumentará de 6000 L/hectare para 10000 L/hectare (Canilha *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo: avaliar diferentes complexos enzimáticos comerciais na produção de álcool de segunda geração a partir do bagaço de cana; avaliar o procedimento de hidrólise prévia ou simultânea à fermentação alcóolica; estudar o efeito do pH e da temperatura na hidrólise do bagaço através de um planejamento composto central.

MATERIAIS E METODOLOGIA

Materiais

Para produção de etanol de segunda geração, utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado por explosão à vapor a uma pressão de 19 kgf/cm². O bagaço tratado foi adquirido do Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba – SP).

As enzimas utilizadas na hidrólise do bagaço foram os complexos NS 50012, NS 50010 e NS 20074, todos adquiridos da empresa Novozymes[®]. Estes complexos celulolíticos foram adquiridos em frascos plásticos e armazenados sob refrigeração.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 foi adquirida da empresa Mauri Brasil Ind. e Com. Ltda na sua forma liofilizada.

Metodologia

Quantificação do etanol: O etanol produzido na fermentação foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um HPLC modelo Shimadzu LC-20 equipado com coluna Supelcogel Ca. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, fluxo da bomba 0,5 ml/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 microlitros. A detecção foi feita por índice de refração.

Testes preliminares: Primeiramente foram realizados testes preliminares para seleção do melhor complexo enzimático e do procedimento de hidrólise e fermentação. Para isto, realizaram-se quatro tratamentos diferentes, conforme apresentado na Tabela 1. O complexo NS 50012 foi adicionado em 0,5% (v/v) sem complementação de outras enzimas, uma vez que, segundo o fabricante, consegue hidrolisar a celulose até unidades de

glicose. O complexo NS 20074 foi complementado com o complexo NS 50010, uma vez que este último apresenta atividade de hidrólise da celobiose, um dissacarídeo de glicose, resultante da hidrólise incompleta da celulose pelo complexo NS 20074. Para a mistura destes dois complexos, adicionou-se 0,25% (v/v) de cada, totalizando 0,5% (v/v) no meio reacional. A hidrólise e a fermentação foram conduzidas em erlenmeyer de 500 mL acondicionados em incubadora provida de mesa agitadora. A concentração de bagaço utilizado nos ensaios foi de 160 g/L (8 g/50 mL).

Tabela 1 - Testes preliminares para avaliação dos complexos enzimáticos NS 50012 e NS 50010 + NS 20074 e do procedimento hidrólise/fermentação

| | Procedimento | Complexo |
|---|---|---------------------|
| 1 | Hidrólise prévia seguida da fermentação | NS 50012 |
| 2 | Hidrólise e fermentação simultâneas | NS 50012 |
| 3 | Hidrólise prévia seguida da fermentação | NS 50010 + NS 20074 |
| 4 | Hidrólise e fermentação simultâneas | NS 50010 + NS 20074 |

Para a hidrólise prévia, o meio foi mantido a 45°C por 36 horas. Posteriormente, adicionou-se 6 g da levedura (120 g/L) e manteve-se a fermentação a 35°C por 48 horas, cujas condições foram as mesmas para os ensaios com hidrólise e fermentação simultâneas.

Efeito do pH e da temperatura na hidrólise do bagaço: Um planejamento composto central (PCC) foi realizado com o objetivo de otimizar o processo de hidrólise do bagaço em relação às variáveis pH e temperatura. Com exceção destas variáveis, as quais foram ajustadas de acordo com o PCC, as demais condições de hidrólise foram as mesmas descritas no item 2.2 para o tratamento com hidrólise prévia. As faixas de pH e temperatura variaram de 3,4 a 7,6 e 24 °C a 66°C, respectivamente, conforme os pontos axiais apresentados na Tabela 2. O PCC foi composto de três pontos centrais e o alfa de rotabilidade utilizado foi de 1,41. A análise

estatística dos resultados foi realizada através de uma regressão múltipla, mostrada na Equação 1, utilizando o software Statistica 7 (StatSoftTM). Somente parâmetros com nível p de probabilidade menor que 10% foram considerados significativos. Após realizada a hidrólise, iniciou-se o processo fermentativo nas mesmas condições descritas no item 2.2.

Tabela 2 – Valores codificados e respectivos valores reais adotados para as variáveis pH e temperatura para o Planejamento Composto Central

| | (Valor Codificado) | | | | |
|--------|--------------------|------|-----|------|------|
| | Valor Real | | | | |
| | (-α) | (-1) | (0) | (+1) | (+α) |
| pH | 3,4 | 4,0 | 5,5 | 7,0 | 7,6 |
| T (°C) | 24 | 30 | 45 | 60 | 66 |

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{j=1}^k \sum_{m=1}^k b_{jm} X_j X_m + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_j^2 \quad (1)$$

Y = concentração de etanol (g/L)

β_0 = média da concentração de etanol (g/L)

k = número de variáveis independentes

X_j = variáveis independentes

b_j ; b_{jm} ; b_{jj} = parâmetros do modelo

RESULTADOS E DICUSSÕES

O tratamento que apresentou maior produção em etanol para os testes preliminares foi o tratamento 1, sendo obtido 8,23 g/L de álcool, conforme apresentado na Tabela 3. Portanto, decidiu-se utilizar o complexo enzimático NS 50012 previamente à fermentação para hidrolisar o bagaço e posteriormente, proceder à adição da levedura para fermentar o meio hidrolisado. A hidrólise prévia do bagaço para o complexo NS 50012 apresentou um aumento da produção de etanol em aproximadamente 37% em comparação ao tratamento feito com o mesmo complexo, porém com a hidrólise simultânea à fermentação. Isto pode estar relacionado ao maior tempo de hidrólise, que por sua vez, pode ter aumentado a concentração de

açúcares fermentescíveis no meio.

Tabela 3 – Resultados dos testes preliminares para avaliação dos complexos enzimáticos NS 50012 e NS 50010 + NS 20074 e do procedimento hidrólise/fermentação

| | Procedimento | Complexo | Etanol (g/L) |
|---|---|---------------------|--------------|
| 1 | Hidrólise prévia seguida da fermentação | NS 50012 | 8,23 |
| 2 | Hidrólise e fermentação simultâneas | NS 50012 | 5,99 |
| 3 | Hidrólise prévia seguida da fermentação | NS 50010 + NS 20074 | 5,93 |
| 4 | Hidrólise e fermentação simultâneas | NS 50010 + NS 20074 | 7,86 |

O uso da mistura dos complexos NS 50010 e NS 20074, principalmente para o tratamento de hidrólise prévia seguida da fermentação pode ter apresentado baixos resultados pela liberação de inibidores no meio de fermentação, uma vez que a produção de etanol para o tratamento com maior tempo de hidrólise foi menor do que o resultado apresentado para o tratamento com hidrólise e fermentação simultânea. Como se trata de complexos enzimáticos contendo diversas carbohidrolases, o maior tempo de hidrólise pode ter aumentado a concentração de alguns potenciais inibidores no meio.

Pelos resultados obtidos no planejamento composto central, uma superfície de resposta foi gerada com o auxílio do software Statistica 7 (StatSoftTM), como mostra a Figura 1. Para a faixa de estudo trabalhada, apenas a variável pH foi significativa ao nível de 10% de probabilidade. Pela superfície obtida, verifica-se que o gráfico aponta maior produção de etanol para a faixa de pH entre 3,5 e 5,0 e faixa de temperatura entre 45°C e 70°C. Para valores de pH mais alcalinos, a produção de álcool diminuiu drasticamente, o que pode estar relacionado à menor atividade enzimática nestas condições. Segundo a literatura apresentada por Um e Walsum (2010), o complexo NS 50012 apresenta melhor atividade para a faixa de pH entre 4,5 e 6,0. A melhor faixa de pH encontrada neste presente trabalho está de acordo com os trabalhos de Andrade *et al.* (2013) e Mesa *et al.* (2011), que também estudaram, a produção de etanol por hidrólise prévia do bagaço de cana por complexos enzimáticos seguida de fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*.

Como não houve correção do pH após o procedimento de hidrólise, o pH,

provavelmente, também afetou o desempenho da levedura. Os trabalhos de fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* a partir de diferentes substratos encontrados na literatura geralmente utilizam valores de pH dentro da faixa de pH de maior produção de etanol encontrado neste presente estudo (Fischer *et al.*, 2013; Romão *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2012; Jackowitz *et al.*, 2011).

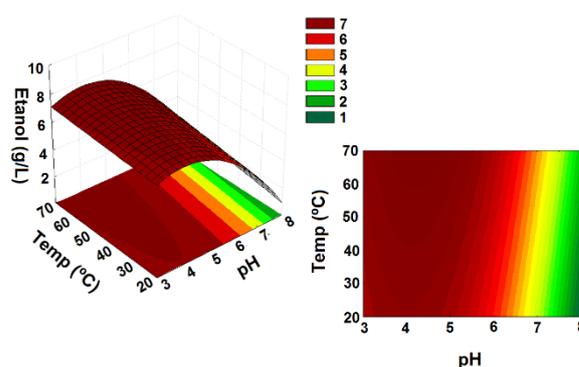


Figura 1 – Superfície de resposta do Planejamento Composto Central para o efeito do pH e da temperatura na hidrólise do bagaço de cana para fermentação alcoólica.

CONCLUSÃO

O complexo enzimático NS 50012 e a fermentação realizada depois da hidrólise apresentaram melhores resultados. Para estas condições, obteve-se uma concentração de álcool de 8,23 g/L.

Utilizando o complexo enzimático NS 50012 a uma concentração de 0,5% e uma fermentação com pH de 4,5 e temperatura de 35°C, observou-se que a hidrólise deve ser feita preferencialmente a um pH entre 3,5 e 5,0 e a uma temperatura entre 45 e 70°C. Também se observou que a temperatura, ao contrário do

pH, não apresentou efeito significativo na hidrólise.

De forma geral os resultados obtidos foram satisfatórios, o que confirma que o bagaço de cana tem potencial para ser utilizado na produção de etanol nas usinas sucro-alcooleiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R. R., MAUGERI FILHO, F., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. (2013), "Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle." *Bioresource Technology*, v. 130, p. 351-359.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. S., ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C., FELIPE, M. G. A., SILVA, S. S. (2012), "Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation." *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 1-15.

FISCHER, J., LOPES, V. S., GALVÃO, C. M. A., TEODORO, J. C., COUTINHO FILHO, U., CARDOSO, V. L. (2013), "Utilization of Cheese Whey and Cellulosic Biomass for Production of Ethanol by Selected Fungi Strain from Brazilian Savanas." *Chemical Engineering Transactions*, v. 32, p. 1075-1080.

JACKOWETZ, J. N., DIERSCHKE, S., ORDUÑA, R. M. (2011), "Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetic during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*." *Food Research International*, v. 44, p. 310-316.

KOHLHEPP, G. (2010), "Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil." *Estudos Avançados*, v. 24, No. 68, p. 223-253.

LEITE, I. R., FARIA, J. R., MARQUEZ, L. D. S., REIS, M. H. M., RESENDE, M. M., RIBEIRO, E. J., CARDOSO, V. L. (2013), "Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations." *Fuel*

Processing Technology, v. 106, p. 611-618.

MESA, L., GONZÁLEZ, E., ROMERO, I., RUIZ, E., CARA, C., CASTRO, E. (2011), "Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse." *Chemical Engineering Journal*, v. 175, p. 185-191.

ROMÃO, B. B., SILVA, F. B., RESENDE, M. M., CARDOSO, V. L. (2012), "Ethanol Production from Hydrolyzed Soybean Molasses." *Energy and Fuels*, v. 26, p. 2310-2316.

UM, B., WALSUM, P. (2010), "Evaluation of Enzyme Mixtures in Releasing Fermentable Sugars from Pre-pulping Extracts of Mixed Northeast Hardwoods." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, Issue 1-8, p. 432-447.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPEMIG.