



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

AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO CONSIDERANDO ALTAS CARGAS DE SÓLIDOS

GUERRA*¹, J.V.S.; ANDRADE², R.R.; COSTA, A.C.³

¹ Aluno da FEQ/Unicamp ² Docente da Unifesp/ Pesquisador FEQ/Unicamp
³ Docente da FEQ/Unicamp

FEQ - Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas

Endereço – Cidade Universitária Zeferino Vaz, SN, Campinas, CEP 13083-970, SP
email: accosta@feq.unicamp.br

RESUMO - A produção de etanol de segunda geração, a partir de substratos lignocelulósicos como o bagaço de cana, é um desafio técnico, pois o processo deve ser eficiente e ter custo viável, além de ser mais atraente do que a co-geração já praticada nas usinas. O pré-tratamento é uma das etapas mais importantes, porque tem impacto na hidrólise enzimática e na fermentação. Um pré-tratamento adequado possibilita altas taxas de hidrólise com altas conversões e usando baixas cargas enzimáticas.

Nesse trabalho foram avaliadas as condições de pré-tratamento considerando 15% de sólidos na etapa de pré-tratamento e 10% de sólidos na etapa de hidrólise enzimática. Para a análise, foi realizado um planejamento fatorial 2x2+ponto central variando a concentração de peróxido (4%, 6%, 8%) e a temperatura (25°C, 50°C, 75°C) durante o pré-tratamento, e mantendo a carga enzimática fixa em 10 FPU/g bagaço de celulase e 25 CBU/g bagaço de β -glicosidase. A resposta avaliada foi o rendimento em glicose obtido após a hidrólise enzimática. Foi realizada a análise dos dados obtidos usando o software Statistica para determinar a influência dos fatores do pré-tratamento no rendimento obtido na etapa de hidrólise e determinar a necessidade de novos ensaios.

Palavras chave: bagaço, cana-de-açúcar, pré-tratamento.

INTRODUÇÃO

A produção de etanol de primeira geração já está consolidada no Brasil, mesmo que ainda seja possível a otimização das etapas do processo, porém a produção de etanol de segunda geração ainda está em fase de pesquisa. Dentro desse cenário, a motivação

desse projeto consiste na necessidade de determinar fatores que interferem no processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

As tecnologias envolvidas na produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos são complexas, levando a custos mais altos do que para o etanol de primeira geração. Desta

forma, várias pesquisas vêm sendo feitas nos últimos anos tentando viabilizar o processo de produção de etanol de segunda geração. Dentre as etapas desse processo está a hidrólise da celulose em glicose, que pode ser fermentada a etanol. A hidrólise pode ser ácida ou enzimática, sendo que diversos estudos apontam a última via como a mais promissora.

Um parâmetro importante nas etapas de pré-tratamento e hidrólise é a concentração de sólidos. No pré-tratamento, altas concentrações de sólidos possibilitam a diminuição no consumo de água, requerem reatores menores para processar a mesma carga de bagaço e resultam em menor consumo de reagente. No caso do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, o desempenho dessa etapa depende mais da concentração de peróxido em solução do que da quantidade de peróxido por grama de bagaço (Garcia, 2009). Na hidrólise, altas concentrações de biomassa resultam em altas concentrações de açúcares, que favorecem a fermentação posterior e, em particular, a destilação. A operação com altas concentrações de sólidos reduz gastos de energia na destilação, aumenta a produtividade volumétrica da planta, além de diminuir o consumo de água, levando a menores custos tanto para a hidrólise quanto para as operações subsequentes (Hodge et al., 2009). No entanto, a operação com altas concentrações de sólidos introduz um novo conjunto de problemas associados à mistura e efetividade das enzimas, devido às propriedades reológicas de uma suspensão fibrosa muito densa. Em altas concentrações de sólidos, a inibição das enzimas pelos açúcares se torna mais importante, somada à dificuldade aumentada na etapa de difusão. O controle de temperatura também se transforma em um problema e pontos quentes locais no reator podem alterar significativamente a atividade das enzimas (Hodge et al., 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima

A matéria-prima para os experimentos foi bagaço de cana-de-açúcar fornecido pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE). O mesmo foi

armazenado em sacos plásticos hermeticamente fechados, em ambiente ausente de umidade, e usado sem moer ou peneirar nas etapas subsequentes. A caracterização do bagaço foi feita como descrito em Rabelo (2010).

Enzimas

Foram utilizadas as enzimas celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) e β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). As atividades enzimáticas foram determinadas experimentalmente, de acordo com Rabelo (2010).

Reação de pré-tratamento

O pré-tratamento foi feito adicionando-se amostras de aproximadamente 15,0 g de bagaço seco em Erlenmeyers de 500mL, onde se adicionaram 100 mL da solução contendo H_2O_2 (concentração definida no planejamento de experimentos) com pH ajustado a 11,5 usando NaOH. Os Erlenmeyers foram mantidos em shaker com rotação de 150 rpm por 1 h. A temperatura foi fixa em cada experimento, conforme determinado pelo planejamento (Rabelo, 2007; Garcia, 2009). Ao término de cada uma das reações o líquido reacional foi descartado e os resíduos restantes lavados com água destilada até que toda a coloração e a sensação escorregadia desaparecessem. As amostras foram secas em temperatura ambiente, pesadas em uma balança analítica e armazenadas na geladeira em sacolas plásticas identificadas, estando assim prontas para etapa de hidrólise enzimática. Os ensaios foram realizados em duplicata, de forma com que o bagaço pré-tratado obtido em um dos ensaios foi usado para hidrólise posterior e outro foi seco em estufa e pesado para determinar o rendimento do pré-tratamento, definido como a massa de bagaço pré-tratado dividida pela massa de bagaço bruto.

Hidrólise do bagaço pré-tratado

Após a determinação da umidade de cada uma das amostras de bagaço submetidas ao pré-tratamento, aproximadamente 10,0 g (massa seca) de cada material pré-tratado foi pesado e adicionado em Erlenmeyers com 100 mL de tampão citrato. O pH e temperatura

foram fixados em 4,8 e 50 °C, respectivamente, considerados condições ótimas para as enzimas. A concentração de celulase usada foi de 10 FPU/g de bagaço e a concentração de β -glicosidase de 25 CBU/g bagaço. Os Erlenmeyers foram encubados em shaker com rotação mantida a 100 rpm. Amostras foram retiradas durante a hidrólise e a concentração dos açúcares determinada a partir da análise cromatográfica utilizando o cromatógrafo líquido modelo Agilent 1260 Infinity Series para determinação de concentração de glicose, xilose, celobiose e arabinose.

Planejamento de experimentos

Os ensaios de pré-tratamento foram realizados variando a temperatura e concentração de peróxido, de acordo com um planejamento 2x2+ponto central, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Matriz de planejamento

Experimento	Temperatura(°C)	Peróxido(% v/v)
1	25	4
2	25	6
3	25	8
4	50	4
5	50	6
6	50	8
7	75	4
8	75	6
9	75	8
10	50	6
11	50	6
12	50	6

A resposta avaliada foi o rendimento da conversão de glucana no bagaço “in natura” em glicose obtida no final da hidrólise enzimática, calculado pela Equação 1.

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{g glicose após hidrólise}}{\text{g glucana bagaço sem pré-tratar}} \cdot 0,9 \quad (\text{Eq. 1})$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Caracterização do bagaço in natura

Com a utilização da metodologia de caracterização do bagaço usada por Rabelo (2010), foram obtidos dados de umidade, celulose, xilose, lignina solúvel, lignina Klason, extrativos e cinzas. Esses resultados são apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Dados da caracterização

Dados	Porcentagem
Umidade (%)	7,14
Celulose (%)	40,07
Xilose (%)	25,84
Lignina solúvel	1,38
Lignina Klason	20,56
Extrativos (%)	6,59
Cinzas (%)	2,20

Pode-se perceber que o bagaço in natura é majoritariamente composto por celulose.

Hidrólises enzimáticas

Com a realização das hidrólises com os bagaços pré-tratados em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (4%, 6% e 8%) e temperaturas reacionais (25°C, 50°C e 75°C), pode-se observar os perfis de glicose, xilose, celobiose e arabinose a seguir para os experimentos de 1 a 12.

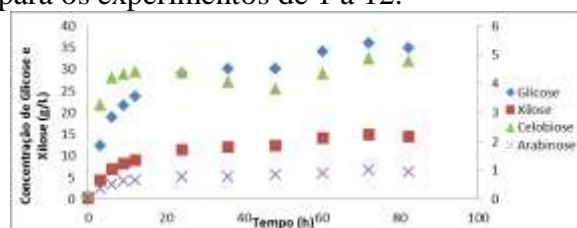


Figura 1 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 1

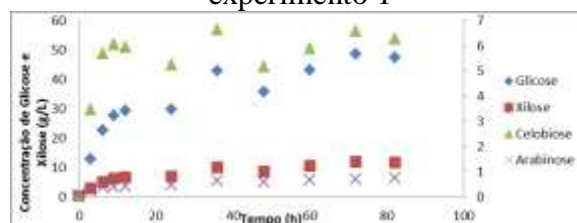


Figura 2 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 2

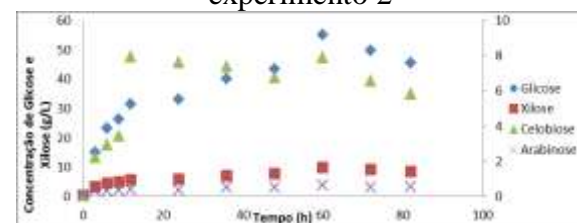


Figura 3 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 3

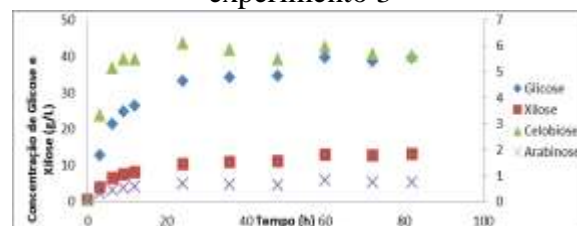


Figura 4 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 4

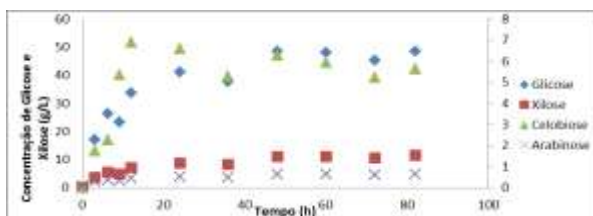


Figura 5 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 5

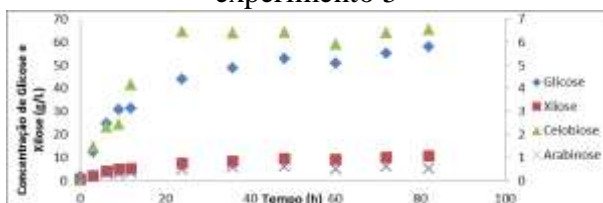


Figura 6 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 6

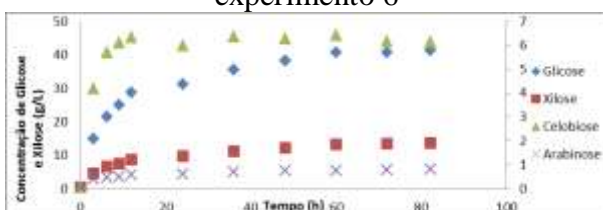


Figura 7 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 7

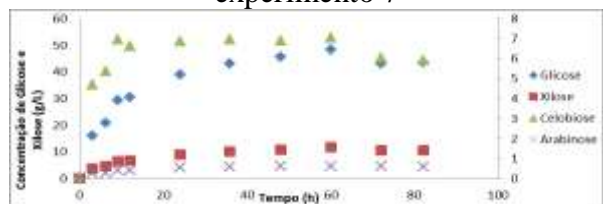


Figura 8 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 8

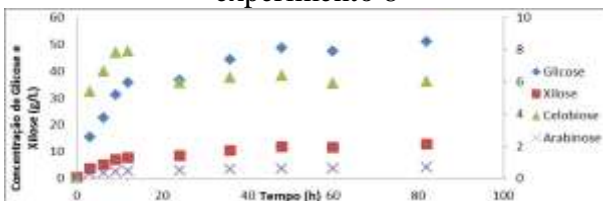


Figura 9 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 9

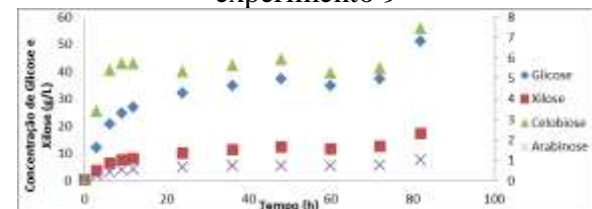


Figura 10 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 10

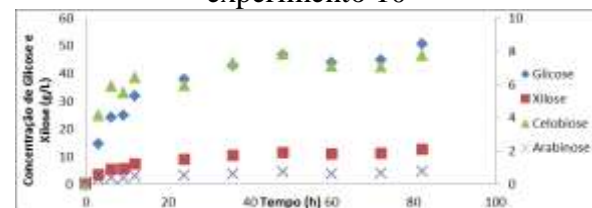


Figura 11 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 11

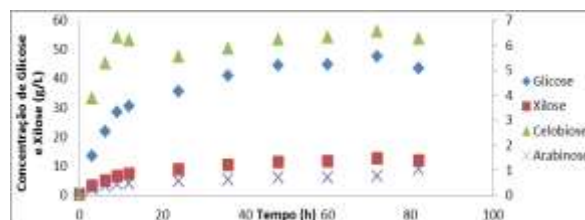


Figura 12 – Perfil de açúcares da hidrólise do experimento 12

Analisando-se os perfis de açúcares de cada experimento, observa-se que o experimento com maior concentração de glicose foi o ensaio 6 (50°C e 8%).

O experimento que apresenta maior concentração de glicose é considerado o mais interessante do ponto de vista da fermentação devido ao fato de que posteriormente esse bagaço pré-tratado e hidrolisado irá passar pelo processo de fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, quanto maior a concentração de glicose no início da fermentação, maior será a concentração de álcool no final do processo. Obtendo-se o objetivo do experimento que é encontrar a condição de maior produção de etanol advindo diretamente do bagaço de cana-de-açúcar in natura.

Rendimento

O cálculo do rendimento foi realizado a partir da Equação 1. Os resultados foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados do rendimento em glicose

Experimento	Rendimento (%)
1	51.67
2	62.47
3	63.59
4	55.76
5	63.87
6	72.57
7	56.61
8	53.84
9	57.15
10	51.54
11	55.99
12	60.97

Com base nos dados da Tabela 2, pode-se desenhar a superfície de resposta do rendimento global (Figura 13) e a curva de contorno (Figura 14) dessa superfície no Software Statistica 7.0.

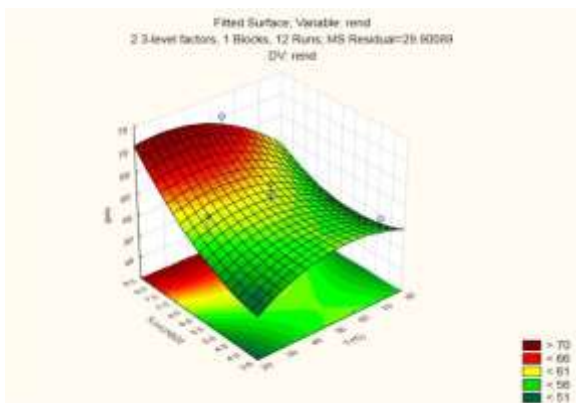


Figura 13 – Superfície de resposta do rendimento global com 90% de confiança

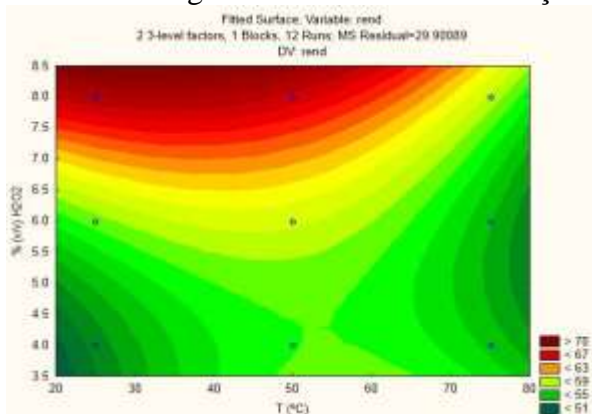


Figura 14 – Curva de contorno da superfície de resposta do rendimento global

Através dos dados de rendimento apresentados, pode-se observar que o experimento com maior rendimento global é o experimento 6 (50°C e 8%), já que o mesmo apresentou valor de 72,57%.

Sabe-se que não é desejável ter apenas uma alta concentração de glicose, mas é importante obter também um alto rendimento global, pois o mais relevante parâmetro do pré-tratamento é a conversão de glucana em glicose, já que a partir disso pode-se mensurar a eficácia do método.

Com o aumento da carga de sólidos, é possível notar que o processo já se torna mais rentável, pois diminui bastante a quantidade de peróxido necessária para o pré-tratamento de uma determinada quantidade de bagaço, o que implica em menores custos.

Efeito da temperatura no rendimento

As condições de temperatura estudadas no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foram 25°C, 50°C e 75°C.

De acordo com a análise dos efeitos realizada no Software Statística 7.0, a temperatura não apresentou resposta no

rendimento, pois não houve um controle muito efetivo de temperatura do meio reacional, já que foi feito em Erlenmeyer, enquanto poderia ter sido utilizado um reator encamisado com um maior controle de temperatura. Além disso, a reação de pré-tratamento é exotérmica e isso dificulta o controle inicial de temperatura do meio.

Apesar de apresentar pouca interferência, o ponto de máximo rendimento foi aproximadamente na temperatura de 50°C. Esse fato pode ser explicado, pois a temperaturas superiores a essa, a glicose liberada sofre degradação devido à relativa alta temperatura. Já a temperaturas inferiores, o possível motivo pelo qual temos um rendimento menor é devido à quantidade de hemicelulose desprendida ser menor do que a temperaturas mais altas como mencionado em Garcia (2009). Um maior desprendimento de hemicelulose seria interessante, pois o mesmo funciona como barreira para o ataque das enzimas celulase e β -glicosidase a celulose. Assim, como mais hemicelulose é desprendida, maior seria o ataque das enzimas à celulose.

Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio no rendimento

As condições de concentração de peróxido de hidrogênio alcalino estudadas no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foram 4%, 6% e 8%.

De acordo com o Software Statística 7.0 e sua quantificação do efeito da variável concentração no rendimento, a variação da concentração de peróxido de hidrogênio alcalino surte efeitos significativos no rendimento.

Pode-se observar que para baixas concentrações, o rendimento global é baixo, pois ocorre apenas um pequeno desprendimento de lignina do bagaço, impossibilitando o ataque da enzima celulase na celulose que fica protegida pela lignina. Já em concentrações mais elevadas de peróxido ocorre uma maior solubilização da lignina, assim gerando um maior ataque pelas enzimas, possibilitando uma maior concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática e um maior rendimento global.

CONCLUSÃO

Com a utilização das técnicas de planejamento de experimentos (planejamento fatorial 2x2+ponto central variando a temperatura e a concentração de peróxido durante o pré-tratamento) determinou-se as condições ótimas para pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino com 15% de sólidos para hidrólise realizada com 10% de sólidos e carga enzimática de 15 FPU/g bagaço de celulase e 25 CBU/g bagaço de β -glicosidase.

Com aumento da carga de sólidos no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, o rendimento global e a concentração final de glicose ao final da hidrólise enzimática foram altas, mostrando que foi possível aumentar a carga de sólidos e mantendo-se um rendimento alto para o processo. Com base nisso, observa-se que o processo pode se tornar mais rentável, já que se reduz a quantidade necessária de peróxido de hidrogênio para tratar uma determinada quantidade de bagaço.

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, conclui-se que a maior concentração de glicose apresentada após a hidrólise enzimática foi para o experimento 6, que obteve uma concentração de glicose de 55,15 g/L.

Também se pode observar que o maior rendimento em glicose foi do experimento 6, que obteve um rendimento global de 72,57%. Este rendimento é um pouco abaixo aos encontrados por outros autores, devido a falta de controle de temperatura e a reação de pré-tratamento e hidrólise ser realizado no shaker ao invés de ser no reator encamisado.

Nota-se que a temperatura não apresentou efeito significativo no rendimento do pré-tratamento, porém a concentração de peróxido de hidrogênio utilizado apresentou efeito significativo. .

REFERÊNCIAS

GARCIA, D.R. (2009), “Determinação de Dados Cinéticos do Pré-Tratamento de Bagaço de Cana-de-Açúcar com Peróxido de Hidrogênio Alcalino e da Hidrólise Enzimática

Posterior”, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (dissertação de mestrado), 6-56 p.

HODGE, D.B., KARIM, M.N., SCHELL, D.J., MCMILLIAN, J.D. (2009), Model-Based Fed-Batch for High Solids Enzymatic Cellulose Hydrolysis. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 152, 88-107p.

RABELO, S.C. (2007), “Avaliação de Desempenho do Pré-Tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-Açúcar”, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (dissertação de mestrado), 15-63 p.

RABELO, S.C. (2010), “Avaliação e Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração”, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (tese de doutorado), 13-30, 32-35, 47-50, 93-108p.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro.