



PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE MILHO

J. F. FÜHR¹, L. R. BOHN¹, A. P. DRESCH¹, S. L. ALVES Jr¹, G. M. MIBIELLI¹

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, UFFS - *Campus* Chapecó-SC
E-mail para contato: jainefuhr@gmail.com

RESUMO – O Brasil é o segundo maior produtor de etanol, contudo ainda é necessário a diversificação da matriz de produção a fim de torná-lo mais atrativo para substituição como combustível alternativo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de bioetanol como biocombustível a partir do resíduo lignocelulósico do milho. Para tanto, executou-se um pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis. Em seguida, o hidrolisado obtido foi fermentado utilizando uma cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e outra selvagem, isolada a partir de biomassa de milho em decomposição, identificada taxonomicamente como uma nova espécie do gênero *Wickerhamomyces*. A partir desses processos determinou-se um rendimento de 0,376 g etanol / g glicose, demonstrando o potencial deste processo para a produção de bioetanol.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os biocombustíveis o etanol se destaca como substituto à gasolina, visto tratar-se de uma fonte de energia natural, limpa, renovável e sustentável. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol, o qual é produzido a partir de matéria-prima sacarínea (caldo de cana), em um processo que se caracteriza pelo seu baixo custo e alto rendimento (Da Rosa, 2013). Entretanto, ainda é necessário a diversificação na matriz de produção com o intuito de torná-lo mais atrativo para substituição como combustível alternativo. Assim faz-se necessário o desenvolvimento de rotas de produção a partir de diferentes matérias-primas, como, por exemplo, a utilização de resíduos agroindustriais. Dentre os possíveis resíduos, os materiais lignocelulósicos possuem potencial suficiente para tornarem-se matéria-prima.

Uma fonte de material lignocelulósico em destaque é a biomassa proveniente da colheita do milho. No Brasil, são produzidos anualmente cerca de 90 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2018), e como toda produção agrícola, gera quantidades significativas de resíduos, podendo chegar a 2,2 toneladas de resíduo por tonelada de milho plantada.

Considerando a busca pela diversificação da matriz energética, através do desenvolvimento de processos que utilizem matérias primas alternativas, de fácil acesso e baixo custo este estudo busca oferecer uma alternativa em relação ao aproveitamento do resíduo da colheita do milho por meio da sua utilização na produção de bioetanol. Esse trabalho foi conduzido com objetivo de determinar a composição química da biomassa e o



rendimento de produção ao final das etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos açúcares fermentescíveis obtidos.

2. METODOLOGIA

A biomassa utilizada é proveniente das áreas agrícolas da zona rural do município de Palmitos-SC e corresponde ao resíduo liberado pela colheitadeira durante a colheita dos grãos de milho do híbrido AS 1666. A biomassa foi triturada em moinho de facas afim de se obter partículas menores. Em sequência a moagem, a biomassa foi caracterizada seguindo como referência o procedimento padrão NREL (Nacional Renewable Energy Laboratory) descrito por Sluiter et al (2005 a, b, c), utilizando-se apenas a fração do material que passou pela peneira de 30 mesh.

Para obtenção de açúcares fermentescíveis, realizou-se um pré-tratamento básico utilizando óxido de cálcio como agente, seguido de hidrólise enzimática. Para a etapa de pré-tratamento elaborou-se um Delineamento Experimental Fatorial Completo (DEFC 2²), com triplicada em todos os ensaios, objetivando avaliar os efeitos da temperatura de incubação (40, 55 e 70 °C) e concentração de óxido de cálcio (0,2, 0,4 e 0,6 g CaO / g biomassa seca). Para tanto, levou-se à incubação (Incubadora Shaker SOLAB SL-223) 20g de biomassa (200 rpm; 24h; 200 mL de solução de CaO; nas concentrações de CaO e temperatura de acordo com os níveis do planejamento experimental).

Finalizada a etapa de pré-tratamento, corrigiu-se o pH do meio com uma solução de Ácido Cítrico (1M), até o pH ótimo das enzimas, 5,0 - 5,5 (Novozymes, 2017). Após adicionou-se os preparados enzimáticos Cellic CTec2 (2 % -m/m em relação a biomassa seca) e Cellic HTec2 (0,5 % -m/m), ambas diluídas em tampão acetato de sódio (1:10 v/v). Os recipientes foram novamente acondicionados no agitador orbital em rotação de 200 rpm, temperatura de 50 ° C por um período de 24 h.

Ao fim da hidrólise enzimática, as amostras foram centrifugadas e filtradas em vials, utilizando filtros de nylon não estéril com poros de 0,45 µm (Milipore), para leitura dos açúcares, acetato, furfural e hidroximetilfurfural em HPLC. Os resultados foram tratados estatisticamente com o auxílio do software Statistica 5.0, $p < 0,05$. A partir da melhor condição definida no planejamento experimental de pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática, preparou-se um novo hidrolisado para a etapa de fermentação, o qual foi esterilizado através de uma filtração a vácuo utilizando filtros de nylon com poros de 0,45 µm. Posteriormente realizou-se o ajuste dos micronutrientes por meio da adição de 3,0 g/L de fosfato de potássio monobásico.

Para fermentação empregou-se uma linhagem selvagem de levedura isolada a partir da biomassa de milho em decomposição (cepa UFFS-CE-3.1.2), pertencente à coleção do Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos (GPPEM) da Universidade Federal da Fronteira Sul - *campus* Chapecó. Essa linhagem foi taxonomicamente identificada como uma nova espécie (ainda não descrita) do gênero *Wickerhamomyces* (Bazoti et al., 2017). Também se utilizou a levedura industrial PE-2, fornecida pela empresa Fermentec (Piracicaba/SP).

Ambas leveduras foram pré-crescidas seguindo a metodologia descrita por (Alves et al., 2008), em seguida as mesmas foram suspensas nos hidrolisados de forma a atingir a concentração de 10 mg de células/mL. Após retirou-se uma alíquota de 200 μ L, a qual foi centrifugada a 3500 rpm por 05 minutos, tendo seu sobrenadante armazenado a -20 ° C. O restante da cultura foi incubado a 28°C e 145 rpm. A fermentação ocorreu por um período de 30 horas, sendo que, nos intervalos apontados na Figuras 02, uma alíquota de 200 μ L foi retirada e centrifugada a 3500 rpm por 05 minutos, tendo seu sobrenadante armazenado a -20 ° C. Ao fim do período da fermentação, os sobrenadantes armazenados foram descongelados e filtrados em vials, utilizando filtros de nylon com poros de 0,45 μ m (Milipore) para quantificação dos açúcares e etanol via HPLC.

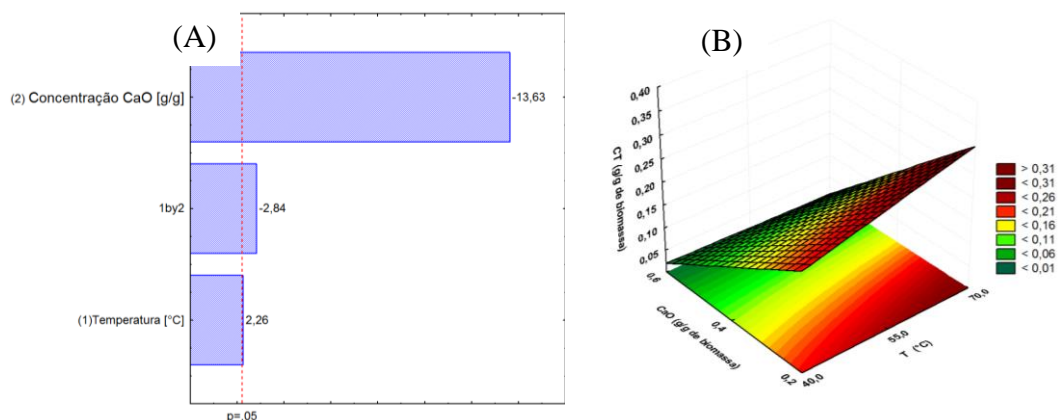
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Referente à caracterização da biomassa destacam-se as frações das estruturas de hemicelulose e celulose, as quais perfazem 57,15% (m/m) da composição química do material em questão. Tais estruturas são polissacarídeos que, ao serem hidrolisados, geram mono e dissacarídeos, que por sua vez podem ser fermentados a etanol.

Quanto à obtenção de açúcares fermentescíveis, os rendimentos superiores (em torno de 0,31g Açúcares Totais- AT/L) foram obtidos nos ensaios em que a concentração de CaO segue o nível inferior (-1) do planejamento (0,2 g CaO / g biomassa). A diferença nas condições de pré-tratamento está relacionada com a variável concentração de óxido de cálcio, a qual apresentou efeito negativo significativo, conforme gráfico de Pareto (Figura 01 A). O que leva a entender que baixas concentrações na etapa de pré-tratamento são suficientes para melhorar a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise enzimática.

No que se refere à variável temperatura, não há efeito significativo em termos de rendimento glicosídico total. Quando se infere para a interação entre os dois fatores, esse apresenta como um efeito significativo negativo, ($p>0,05$), indicando que ao diminuir uma das variáveis deve-se, para aumentar o rendimento, aumentar a outra variável.

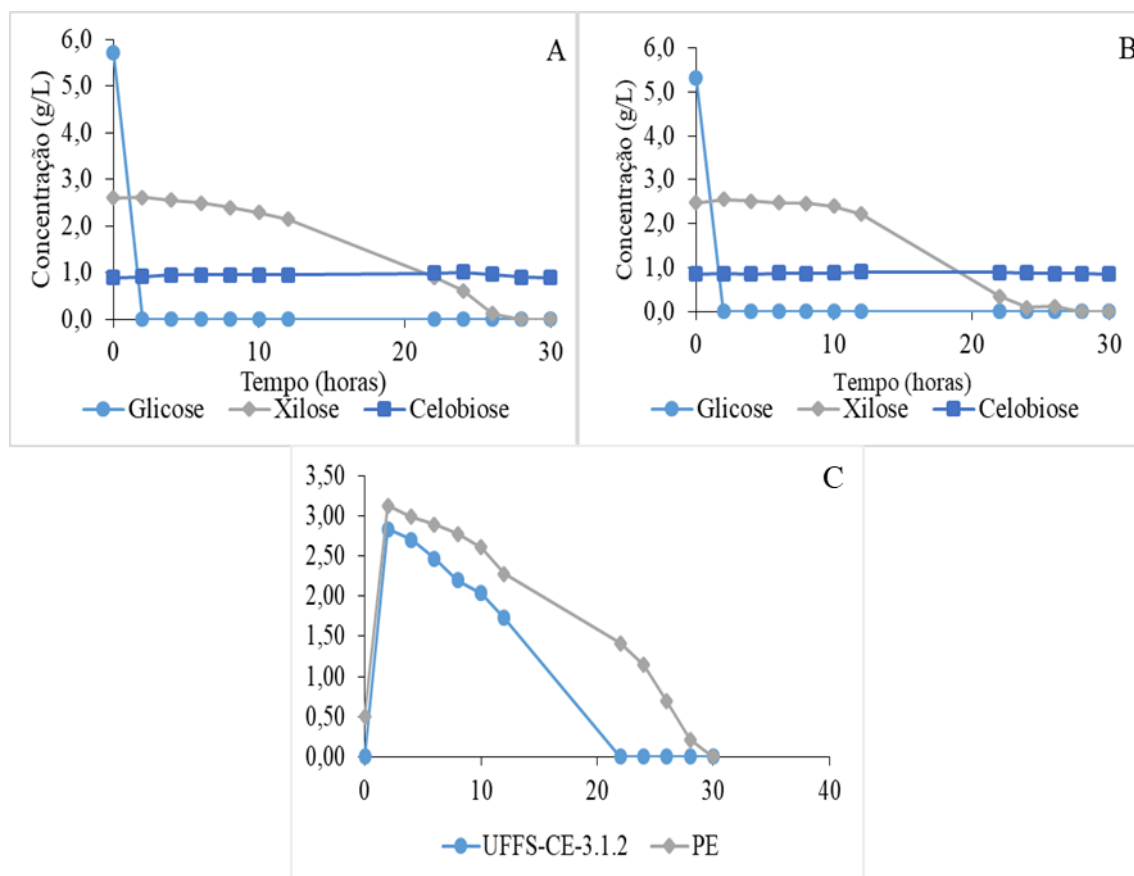
Figura 01- Análise estatística. (A) Gráfico de Pareto (B) Superfície de Resposta



O hidrolisado enzimático obtido a partir da biomassa de milho, com 12,35 g AT / L, foi submetido a fermentação utilizando duas linhagens de leveduras, em ensaios independentes.

Na Figura 02 demonstra-se o consumo dos açúcares ao longo do processo fermentativo a partir das duas cepas utilizadas, bem como a produção de etanol por fermentação em batelada.

Figura 02 - Consumo dos açúcares (A) UFFS-CE-3.1.2, (B) PE-2. (C) Produção de etanol.



Ambas linhagens apresentaram consumo total da xilose em cerca de 20 horas. A xilose foi consumida durante o processo, mas não foi fermentada a etanol, uma vez que nos tempos em que ocorrem o consumo de xilose não há produção de etanol (Figura 03). Sabe-se ainda que a levedura comercial utilizada não utilizou a xilose como fonte de carbono ou energia. Lopes et al. (2017) demonstram que a PE-2 não apresenta crescimento em xilose nem mesmo após 336 h de incubação. Em compensação, produz xilitol a partir da xilose, o que justifica o consumo desse açúcar apresentado na Figura 03 (B).

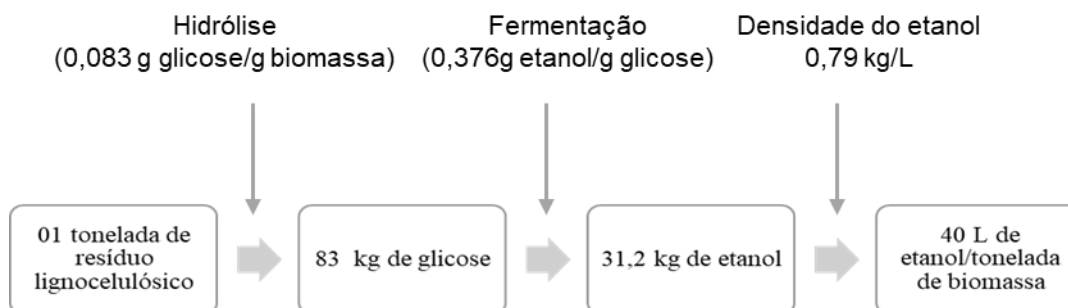
Destaca-se o consumo de xilose pela levedura UFFS-3.1.2. De acordo com Bazoti et al. (2017) a mesma consome esse açúcar e utiliza-o como fonte de energia e carbono, visto apresentar crescimento celular. Dessa forma, apresenta característica satisfatória, visto que para produção industrial de bioetanol os microrganismos devem mostrar alta atividade fermentativa para açúcares simples, como glicose e xilose (Kricka et al., 2015). Ressalta-se ainda o desempenho da mesma, o qual foi muito similar ao da levedura industrial. As cepas industriais passam por um longo processo de seleção, apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância a fatores de estresse (Lopes et al., 2016), processos que não ocorreram para a levedura selvagem.

O pico de produção de etanol ocorreu próximo das duas horas de inóculo, sendo dessa forma, proveniente da glicose, único açúcar consumido até este instante. Outro fato a ser observado é que a concentração inicial de glicose foi menor do que a concentração determinada para o hidrolisado. Tal diminuição justifica-se pelo fato de que o hidrolisado foi suplementado e as leveduras foram adicionadas, diluindo o meio. E ainda ambas leveduras consumiram esse açúcar muito rapidamente, ou seja, durante o preparo do experimento até a coleta da primeira amostra, uma parcela de glicose foi consumida.

Dado que toda a glicose foi consumida, as leveduras passam a utilizar outras substâncias contidas no meio para produção de energia. Nesse experimento após o consumo da glicose, as leveduras utilizaram o etanol produzido. Visto que ambos ensaios iniciaram com a concentração de 8,236 g/L de glicose e que se produziu, a partir desta, 2,8 g/L e 3,1 g/L de etanol para as cepas UFFS-CE-3.1.2 e PE-2, respectivamente, tem-se um rendimento de 0,34 g etanol / g glicose para a UFFS-CE-3.1.2 e 0,376 g etanol / g glicose para PE-2, sendo o rendimento teórico máximo de 0,51.

A determinação do rendimento torna-se importante para entender a viabilidade técnica e econômica do processo, bem como determinar se é possível realizar aumento na produção e quais são as etapas que podem ser desenvolvidas para atingir esse aumento. Dessa forma, utilizando os rendimentos obtidos para as etapas de obtenção de açúcares fermentescíveis e fermentação calculou-se a possível geração de bioetanol considerando a atual produção brasileira de milho.

Figura 03- Rendimento em etanol por tonelada de biomassa lignocelulósica.



Atualmente no país são produzidos cerca de 90 milhões de toneladas de grãos por ano (CONAB, 2018), o que corresponde a 198 milhões de toneladas de resíduo e um incremento teórico de 3.600 milhões de litros de etanol na produção brasileira. Ainda pensando no aumento desse rendimento, as condições de processo descritas nesse trabalho poderiam ainda ser otimizadas, aumentando o rendimento em termos de açúcares fermentescíveis obtidos ao final do processo.

Por fim, no que se refere a etapa de fermentação dos açúcares provindos de materiais lignocelulósicos, busca-se organismos que apresentem eficiência quanto à fermentação das pentoses, pois poucos microrganismos possuem a capacidade de fermentá-las a etanol. A transformação das pentoses em etanol é fundamental para atingir uma tecnologia eficiente na produção de etanol de segunda geração.

4. CONCLUSÕES

A demanda futura por etanol de alta eficiência e sustentabilidade projeta a necessidade de aumentar significativamente a produção desse combustível nos próximos anos. Esse aumento poderá ser alcançado pela introdução de novas matérias-primas, como a biomassa lignocelulósica do milho, a qual além de diversificar a matriz energética agrega valor a um resíduo agrícola, que geralmente é deixado no campo.

Considerando a atual produção de milho no Brasil e sua respectiva produção de biomassa e ainda, levando em consideração os dados de produção obtidos nesse estudo, seria possível incrementar a produção nacional em 3.600 milhões de litros de etanol. Em decorrência do incremento da produção sem necessidade de aumento da área plantada, utilizando como matéria-prima um resíduo agrícola, essa biomassa demonstra elevado potencial para produção de biocombustível, carecendo dessa forma de estudos mais aprofundados quanto ao seu aproveitamento energético em escalas maiores.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, S. L. Jr.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C., TRICHEZ, D., MILETTI, C. L.; ARAUJO, P. S. e STAMBUK, B. U. Molecular Analysis of Maltotriose Active Transport and Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Determinant Role for the AGT1 Permease. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, 2008.
- BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bioresource Technology*. v. 244, p. 582-587, 2017.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_11_14_17_49_graos_4o_l evantamento.pdf>. Acesso em 02 Mar. 2018.
- DA ROSA A. V. Biomass, in *Fundamentals of Renewable Energy Processes*, ed. da Rosa A., editor. (Oxford, UK: Elsevier Science & Technology), 533–590, 2013.
- KRICKA, W., FITZPATRICK, J., BOND, U. Challenges for the production of bioethanol from biomass using recombinant yeasts. *Adv Appl Microbiol*. 92:89-125, 2015.
- LOPES, et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian journal of microbiology*. V. 47S, p, 64-67. 2016.
- NOVOZYMES. Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. Disponível em: <<http://www.scienceplease.com/files/products/overviews/cellicctec2.pdf>>. Acesso em 14/02/2018
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J. e TEMPLETON, D. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005 a, b, c.