

EFEITO DA CARGA DE SÓLIDOS E DE ENZIMAS NA HIDRÓLISE DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

R. B. SOUZA¹, B. PRATTO¹, J. D. ANGARITA², A. R. SECCHI² e A. J. G. CRUZ¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, PPGEQ-UFSCar, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

² Universidade Federal de Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química
E-mail para contato: renata.beraldo@yahoo.com.br

RESUMO – A hidrólise enzimática é a uma das principais etapas na conversão da biomassa em etanol. Este trabalho estudou o efeito da carga de sólidos e de enzimas na hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente (195 °C, 10 min, razão sól.-líq. 1:10). Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer a 50°C, 250 rpm e pH 4,8 (volume reacional de 50 mL). Dois conjuntos de experimentos foram realizados. No primeiro avaliou-se o efeito da carga de sólidos (10, 15 e 20% m/v) mantendo a carga enzimática em 10 FPU/g_{celulose}. No segundo conjunto avaliou-se o efeito da carga de enzimas (5, 10, 15, 20 e 30 FPU/g_{celulose}) mantendo a carga de sólidos em 15%. Em 72h de hidrólise as conversões de celulose obtidas foram: 51,6% (10% de sólidos), 50,9% (15% de sólidos) e 48,2% (20% de sólidos). Nos experimentos realizados com 15% de sólidos as conversões obtidas foram: 41,7% (5 FPU/g_{celulose}), 50,9% (10 FPU/g_{celulose}), 58,8% (15 FPU/g_{celulose}), 62,5% (20 FPU/g_{celulose}) e 63,2% (30 FPU/g_{celulose}). Considerou-se como melhor resultado o ensaio com 15% de sólidos e 20 FPU/g_{celulose}.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos com a crescente preocupação com a preservação ambiental juntamente com os problemas de oferta e preço de petróleo, tem-se intensificado a busca por novos combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis. Nesse contexto o etanol derivado de biomassas lignocelulósicas residuais surge como uma alternativa promissora, pois a utilização desses materiais além de apresentar facilidade pela sua disponibilidade e baixo custo, não acarretam em um aumento da área cultivada nem ocasionam aumento de preço ou diminuição da disponibilidade de alimentos.

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol gera uma grande quantidade de resíduos agrícolas dentre eles a palha. Grande parte desta biomassa é deixada no campo e poderia ser utilizada para aumentar a produção de bioetanol. Para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 280 kg de resíduos, divididos entre aproximadamente 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca (Santos *et al.*, 2012). Teoricamente cada tonelada de palha (base seca) poderia gerar cerca de 280 litros de etanol a partir da celulose.

Os materiais lignocelulósicos são complexos orgânicos de carbono cuja estrutura é principalmente representada pela interação físico-química entre a celulose (polímero linear formado por unidades de β -(1,4)-D-glucopiranosose unidas entre si por ligações inter e intra-moleculares de hidrogênio), a hemicelulose (heteropolímero altamente ramificado formado principalmente por açúcares contendo cinco átomos de carbono) e a lignina (macromolécula aromática de alta massa molar) (Ferreira-Leitão *et al.*, 2010; Santos e Gouveia, 2009). A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos envolve quatro etapas principais: pré-tratamento da biomassa (para prover a diminuição da cristalinidade da celulose e separação das três frações), hidrólise (para obtenção dos açúcares fermentescíveis), fermentação (para conversão dos açúcares em etanol) e destilação (para concentração do etanol) (Canilha *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013).

A conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis pode ser feita tanto por via ácida como por via enzimática. O uso de enzimas apresenta várias vantagens quando comparada à rota ácida. Citam-se menores custos de equipamento (pelo fato da reação ser realizada em condições mais amenas) e menor formação de subprodutos que podem trazer prejuízos na etapa de fermentação (Cara *et al.*, 2007). No entanto, o uso de enzimas ainda apresenta alto custo. Assim, o estudo da carga de sólidos e da dosagem de enzimas empregada é fator de grande importância.

Muitos fatores têm contribuído para o elevado custo da hidrólise enzimática, como os efeitos de inibição das enzimas, a acessibilidade das enzimas ao substrato e a ligação não produtiva, exigindo o uso de altas concentrações de enzimas e tornando a carga enzimática uma importante variável do processo (Leu e Zhu, 2012; Mussato *et al.*, 2008).

Outra variável importante na hidrólise enzimática é a carga de sólidos. O aumento de carga de sólidos é fundamental para a produção industrial, assim é possível alcançar elevadas concentrações de açúcares o que traz economia significativa no processo como diminuição do custo operacional das etapas de hidrólise e fermentação e minimização do consumo de energia nas etapas de evaporação/destilação reduzindo assim o custo de produção (Ioelovich e Morag, 2012).

O aumento da carga de substrato, a redução da carga enzimática e do tempo de residência associados às melhorias na atividade do complexo enzimático são fatores que contribuem para a viabilidade da rota enzimática (Ouyang *et al.*, 2013). Para o processo de hidrólise enzimática ser realizado com elevada eficiência, é necessária a otimização das condições de hidrólise. Desta forma este trabalho propôs avaliar o efeito da carga de sólidos e de enzimas na hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A palha de cana-de-açúcar *in natura* utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela Usina Itapira (Catanduva, SP). O complexo enzimático Cellic®CTec2, composto por celulases, β -glicosidases e hemicelulases tem uma atividade medida em termos de unidade de papel de filtro de

203 FPU/ml (Ghose, 1987). Este complexo foi doado pela Novozymes Latin America (Araucária, PR).

2.2. Métodos

Pré-tratamento hidrotérmico: O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em reator de aço inoxidável (modelo 4532, Parr Instruments Company, Moline, Illinois, EUA). A palha de cana-de-açúcar *in-natura* previamente seca e moída foi submetida à temperatura de 195°C por 10 min na proporção 1:10 m/v (200 rpm). Ao final da reação a fração sólida foi separada por filtração e lavada com água para remoção dos componentes solubilizados. Parte da fração sólida foi reservada para a determinação da umidade e caracterização química.

Caracterização das amostras: As amostras foram caracterizadas de acordo com procedimento descrito por Gouveia *et al.* (2009).

Hidrólise enzimática: O material pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática em meio contendo tampão citrato (50 mM, pH 4,8) em um volume total de reação de 50 ml. A palha pré-tratada e o tampão foram adicionados a frascos Erlenmeyers de 250 mL e transferidos para o *shaker* (50°C e 250 rpm) onde permaneceram por 30 min para atingir o equilíbrio térmico. Após esse período, as reações de hidrólise foram iniciadas pela adição de enzimas. O efeito da carga de sólidos foi avaliado em experimentos contendo 10, 15 e 20% m/v de biomassa com 10 FPU/g_{celulose}. O efeito da carga de enzimas foi avaliado mantendo-se a carga de sólidos em 15% e variando-se a carga de enzimas em 5, 10, 15, 20 e 30 FPU/g_{celulose}.

As concentrações de açúcares foram determinadas por análises em cromatógrafo equipado com detector de índice de refração. As amostras foram diluídas e filtradas (0,45 µm) antes de serem injetadas no equipamento. Para a separação dos componentes foi utilizada a coluna Biorad Aminex HPX-87H na temperatura de 65°C, fase móvel H₂SO₄ 5,0 mM na vazão 0,6 mL/min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados da caracterização das amostras de palha (*in natura* e pré-tratada hidrotermicamente) e a perda/remoção dos componentes das amostras de palha submetidas às diferentes condições de pré-tratamento encontram-se na Tabela 1. O fator de severidade é uma medida da intensidade das condições operacionais (tempo e temperatura) empregadas durante o pré-tratamento. Esta estimativa foi proposta por Overend *et al.* (1987).

Após o pré-tratamento 85,3% da hemicelulose e 32,5% da lignina foram removidos. Uma boa remoção da hemicelulose pode contribuir para a ação das enzimas celulolíticas uma vez que essa estrutura forma uma barreira física ao redor da celulose dificultando o acesso das enzimas (Diaz *et al.*, 2010).

Tabela 1 – Caracterização da palha antes e após pré-tratamento hidrotérmico e perda/solubilização dos componentes das amostras de palha.

Componente	<i>In natura</i> (g/100 g _{palha})	Pré-Tratamento-195°C / 10 min (g/100 g _{palha})	Perda/remoção (%)
Celulose	36,7	31,9	13,1
Hemicelulose	29,9	4,40	85,3
Lignina	19,7	13,3	32,5
Cinzas	6,2	2,6	58,1
Extrativos	6,2	-	
Fator de severidade ** (-)	-	3,60	

* Rendimento mássico = $(m_{\text{final amostra após pré-tratamento (BS)}} / m_{\text{inicial amostra (BS)}}) \times 100 = 51,8\%$

** Estimando segundo Overend *et al.* (1987)

Os perfis de concentração de glicose e conversão em função do tempo de hidrólise para as três cargas de sólidos avaliadas são apresentados na Figura 1(a) e (b) respectivamente.

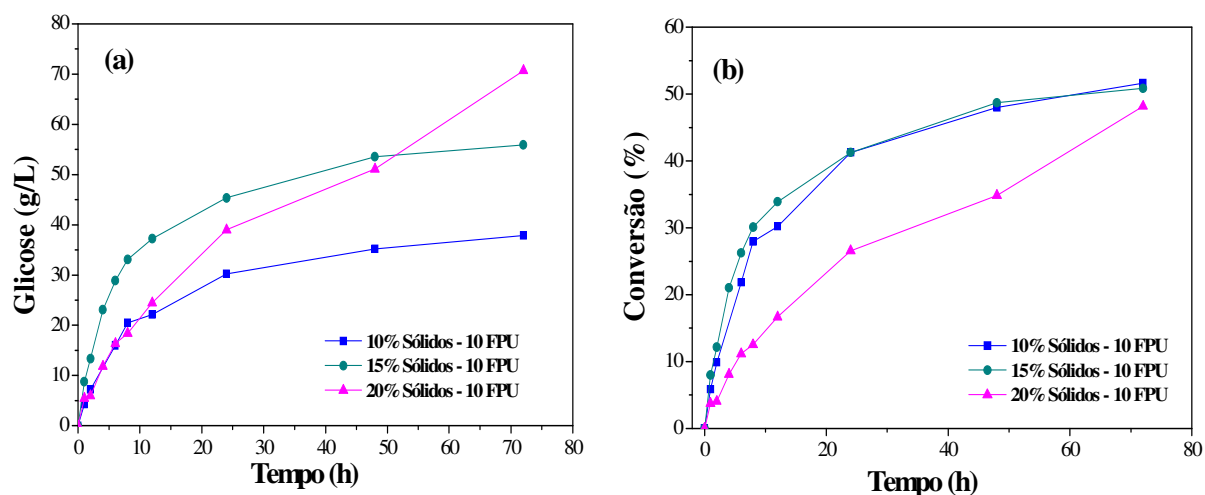


Figura 1 – Perfil de concentração de glicose em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas de sólidos de 10, 15 e 20% de sólidos e carga enzimática de 10 FPU/g_{celulose}.

O ensaio realizado com 10% de sólidos resultou em uma concentração de glicose de 37,9 g/L (em 72 h), com conversão de celulose de 51,6%. Quando a carga de sólidos foi aumentada para 20%, a concentração de glicose atingiu 70,7 g/L (em 72 h), cerca de 86,7% maior que a obtida com 10% de sólidos, porém a conversão nesta condição foi de 48,2%. Para a carga de sólidos de 15% obteve-se 55,9 g/L de glicose (em 72 h), conversão de 50,9%. Pode-se observar pelos resultados que o aumento na carga de sólidos ocasiona um aumento na concentração final de glicose demonstrando um comportamento aproximadamente linear entra a carga de sólidos e a concentração de glicose final,

como observado por López-Linares *et al.* (2014) com palha de colza. Segundo Ramachandriya *et al.* (2013), é importante operar em concentrações altas de sólidos a fim de se obter altas concentrações de etanol na fermentação, reduzindo assim o consumo de energia na destilação.

A partir dos resultados obtidos decidiu-se avaliar o efeito da carga de enzimas em experimentos empregando 15% de carga de sólidos, em função da maior conversão de celulose obtida.

Na Figura 2 são mostrados respectivamente os resultados de concentração de glicose e conversão durante a hidrólise com diferentes cargas enzimáticas. Os resultados obtidos demonstram que o aumento da carga de enzimas promoveu uma maior liberação de glicose e melhor eficiência na conversão da celulose, no entanto cargas enzimáticas acima de 20 FPU/g_{celulose} não apresentaram uma melhora na conversão e na concentração de glicose liberada. Resultados semelhantes foram obtidos por Chen *et al.* (2007) utilizando como substrato sabugo de milho, Caspeta *et al.* (2014) com bagaço de agave e por Mesa *et al.* (2010) que durante a hidrólise do bagaço de cana a variação das cargas de enzimas de 15 e 25 FPU/g_{celulose} não apresentaram diferença significativa na concentração de glicose liberada no final do ensaio.

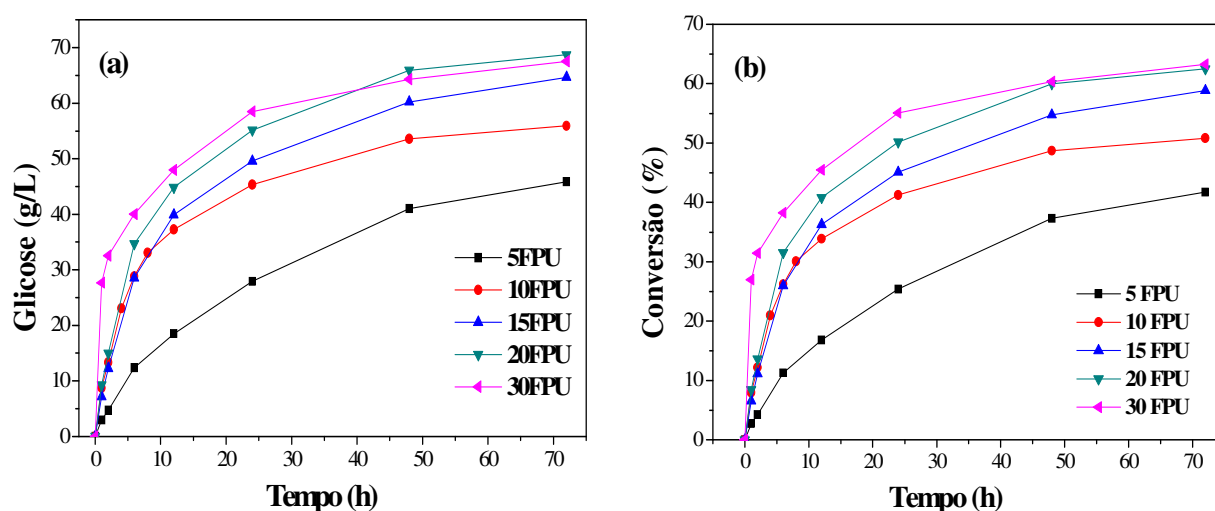


Figura 2 – Perfil de concentração de glicose em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas enzimáticas de 5, 10, 15, 20 e 30 FPU/g_{celulose} e carga de sólidos de 15%.

O aumento da carga de enzimas de 20 para 30 FPU/g_{celulose} apresentou um aumento na velocidade inicial da hidrólise. Contudo, esse fator não compensa o uso dessa carga visto que após 72h as conversões obtidas nos dois experimentos foram muito próximas (62,5% e 63,2% de conversão para os experimentos com 20 e 30 FPU/g_{celulose} respectivamente). O custo do complexo enzimático contribui significativamente para o custo total do processo de conversão da biomassa, desta forma a dosagem da enzima deve ser minimizada (Chen *et al.*, 2007).

A Figura 3 apresenta a conversão de celulose em função da carga de enzimas em 72h. Observa-se o aumento da conversão com o aumento da carga de enzimas até 20 FPU/g_{celulose}. Uma possível explicação para esse efeito da redução da taxa de aumento da conversão com o aumento da carga de enzimas é a inibição das enzimas pela elevada concentração de glicose (cerca de 68 g/L), segundo Mussato *et al.* (2008).

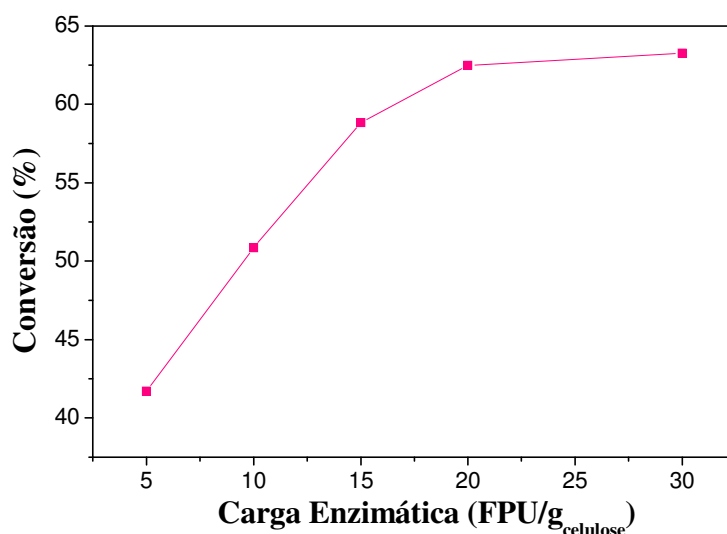


Figura 3 – Conversão da celulose em função da carga de enzimas empregada na hidrólise (em 72 h).

4. CONCLUSÃO

Com relação à carga de enzimas o aumento desta variável promove uma maior liberação de glicose e eficiência de conversão. No entanto para valores acima de 20 FPU/g_{celulose} não houve ganhos consideráveis na conversão. A fim de se obter altas concentrações de glicose ao final da etapa de hidrólise, para que se obtenham concentrações mais elevadas de etanol na etapa de fermentação, deve-se encontrar uma boa relação entre a carga de sólidos e de enzimas a ser utilizada. Desta forma, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que a melhor condição experimental foi obtida para o experimento que utilizou 15% de carga de sólidos e 20 FPU/g_{celulose} de carga enzimática.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e ao Programa de Recursos Humanos da Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis (PRH 44-ANP), pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J Biomed Biotechnol*, v. 2012, 15p, 2012.
- CARA, C.; MOYA, M.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; GONZÁLEZ, A.; RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1003-1009, 2007.
- CASPETA, L.; CARO-BERMÚDEZ, M. A.; PONCE-NOYOLA, T.; MARTINEZ, A. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energ*, v. 113, p. 277-286, 2014.
- CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *Int Biodeter biodegr*, v. 59, p. 85-89, 2007
- DÍAZ, M. J.; CARA, C.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CASTRO, E. Hydrothermal pretreatment of rapeseed straw. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 2428-2435, 2010.
- FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BOM, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. *Waste Biomass Valor*, v. 1, p. 65-76, 2010.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Quím. Nova*, v.32, p.1500-1503, 2009.
- IOELOVICH, M.; MORAG, E. High-solids hydrolysis. *BioResources*, v. 7(4), p. 4672-4682, 2012.
- LEU, S.; ZHU, J. Y. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: Our recent understanding. *Bioenerg. Res.*, v. 6(2), p. 405-415, 2013.
- LÓPEZ-LINARES, J. C.; ROMERO, I.; CARA, C.; RUIZ, E.; MOYA, M.; CASTRO, E. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. *Fuel*, v. 122, p. 112-118, 2014.
- MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; CARA, C.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; MUSSATTO, S. I. An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. *J Chem Technol Biot*, v. 85, p. 1092-1098, 2010.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Cellulose*, v. 15, p. 711-721, 2008.
- OUYANG, J.; BAOTIAN, L.; ZHANG, M.; ZHENG, Z.; YU, HENG. Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. *Bioresour. Technol.*, v. 146, p. 288-293, 2013.

- OVEREND, R.P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J. A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., A*, v. 321(1561): 523-536, 1987.
- RAMACHANDRIYA, K. D.; WILKINS, M.; ATIYEH, H. K.; DUNFORD, N. T.; HIZIROGLU, S. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfate pretreated Eastern redcedar. *Bioresource Technol*, v. 147, p. 168-176, 2013.
- SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. *Rev Bras de Produtos Agroindustriais*, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quím. Nova*, v. 35, p. 1004-1010, 2012
- SANTOS F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CALDAS, C. S.; SOARES, E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Quim. Nova*, v.37, 56-62, 2013.
- SILVA, V.F.N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. 2009. 116 f. (Dissertação), Escola de Engenharia de Lorena - USP, Lorena, 2009.