

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CARGA DE SÓLIDOS SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E COMPARAÇÃO ENTRE COMPLEXOS ENZIMÁTICOS COMERCIAIS

R. B. A. de SOUZA¹, L. J. CORRÊA¹, C. A. G. SUAREZ¹ e A. J. G. CRUZ¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, PPGEQ, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
E-mail para contato: renata.beraldo@yahoo.com.br

RESUMO – A hidrólise enzimática é uma das principais etapas na produção do etanol de segunda geração. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da carga de sólidos na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar e comparar o desempenho de dois complexos enzimáticos comerciais. A biomassa foi pré-tratada hidrotermicamente (195°C, 10 min., 1/10 sól./líq., 200 rpm). Os experimentos de hidrólise (pH 4,8, 50 °C, 72 h) foram realizados em frascos de Erlenmeyer (volume de meio reacional 50 mL). As cargas de sólido avaliadas foram 10, 15 e 20%. Dois complexos enzimáticos comerciais, denominados complexo-A e complexo-B, foram avaliados. A mesma carga enzimática foi empregada em todos os ensaios (20 FPU/g_{bagaço}). Em 72h de hidrólise as conversões de celulose foram: complexo-A: 33,5% (10% sólidos), 24,8% (15% de sólidos) e 18,1% (20% de sólidos); complexo-B: 60,7% (10% de sólidos), 61,8% (15% de sólidos) e 42,4% (20% de sólidos). O complexo-B foi mais eficiente obtendo-se maiores conversões e possibilitando trabalhar com maiores carga de sólido.

1. INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda por energia e principalmente a crescente preocupação com a emissão de gases do efeito estufa e a dependência do petróleo, tem-se aumentado o interesse pelo uso de fontes de energia limpas e renováveis.

No Brasil a cana-de-açúcar é a principal fonte de energia renovável respondendo em 2012 por 15,4% da oferta total. O etanol de cana substitui quase 40% das necessidades de gasolina do país, tornando este um combustível alternativo no Brasil e 3% da necessidade no mundo (Sugarcane, 2014; Ferreira-Leitão *et al.*, 2010). Em 2012/2013 a safra da cana-de-açúcar foi estimada em 588,5 milhões de toneladas (ÚNICA, 2014), o que gerou cerca de 82,4 milhões de toneladas de bagaço (base seca). Aproximadamente a metade desse subproduto foi utilizada na queima direta para geração de calor e energia a fim de suprir a demanda energética do processo. O restante poderia, em tese, ser utilizado para produção de etanol aumentando assim sua produção por tonelada de cana colhida (Biswas *et al.*, 2014).

Os materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, são complexos orgânicos de carbono cuja estrutura é principalmente representada pela interação físico-química entre a celulose (polímero linear formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas, unidos entre si por ligações inter e intra-moleculares de hidrogênio), hemicelulose (heteropolímero altamente ramificado formado principalmente por pentoses) e a lignina (macromolécula aromática de alto peso molecular) (Ferreira-Leitão *et al.*, 2010; Santos e Gouveia, 2009).

A conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis pode ser feita por duas rotas tecnológicas: (a) hidrólise ácida, e (b) hidrólise enzimática. A via enzimática apresenta entre outras vantagens: menor consumo de energia, uma vez que opera sob condições brandas de temperatura, pH e pressão. Além disso, essa rota é altamente específica e não forma produtos de degradação, como furfural e hidroximetilfurfural que causam efeitos indesejáveis durante a etapa de fermentação (Pereira *et al.*, 2011; Ferreira-Leitão, *et al.*, 2010).

Apesar das vantagens apresentadas pela hidrólise enzimática sua aplicação em grande escala ainda esbarra em dificuldades técnicas e econômicas. Entre as estratégias para a viabilidade desta etapa em larga escala estão o aumento da carga de substrato, diminuição da carga enzimática, redução do tempo de hidrólise e a busca por enzimas mais eficientes (Ouyang *et al.*, 2013).

O aumento da carga de substrato é importante a fim de se obter concentrações mais elevadas de açúcares no hidrolisado (Wang *et al.*, 2012; Puri *et al.*, 2013). Esse fator é importante para se obter na etapa de fermentação vinhos com maior teor de etanol, o que reduz o consumo de energia na etapa de destilação (Modenbach e Nokes, 2013).

No entanto, a utilização de altas concentrações de sólidos leva a uma diminuição da conversão do substrato. Esse efeito pode ser explicado por fatores como, dificuldade em se homogeneizar a mistura, inibição da enzima com o aumento da concentração de glicose, problemas de transferência de massa, diminuição da disponibilidade de água, ligação irreversível da enzima ao substrato incluindo a ligação não produtiva com a lignina e desnaturação da enzima (Puri *et al.*, 2013).

Dentro deste contexto o objetivo nesse trabalho foi avaliar o efeito da carga de sólidos na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e comparar a eficiência entre dois complexos enzimáticos comerciais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Para a avaliação do efeito da carga de sólidos sobre a hidrólise enzimática foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* cedido pela Usina Iracema (Iracemópolis, SP).

Dois complexos enzimáticos comerciais, denominados complexo-A e complexo-B, foram avaliados nos experimentos.

2.2. Métodos

Caracterização das amostras: As amostras de bagaço *in-natura* e pré-tratada foram caracterizadas quimicamente de acordo com procedimento descrito por Gouveia *et al.*, (2009).

Pré-tratamento hidrotérmico: O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em reator de aço inoxidável (modelo 4532, Parr Instruments Company, Moline, Illinois, EUA). A amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in-natura* foi previamente peneirada para separar as partículas grosseiras em peneira de 10 mesh. Em seguida foi submetida à temperatura de 195°C por 10 min e 200 rpm. Ao final da reação a fração sólida foi separada por filtração e lavada com água para remoção dos componentes solubilizados.

Hidrólise enzimática: A hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foi realizada em meio contendo tampão citrato (50 mM, pH 4,8) em um volume total de reação de 50 ml. As cargas de sólido avaliadas foram: 10, 15 e 20%. O bagaço pré-tratado e o tampão foram adicionados a frascos de Erlenmeyers de 250 mL e transferidos para o *shaker* (250 rpm, 50°C), por 30 min até atingir o equilíbrio térmico. Após esse período, as reações de hidrólise foram iniciadas pela adição de enzima (complexos enzimáticos comerciais A e B). A mesma carga enzimática foi empregada em todos os ensaios (20 FPU/g_{bagaco}). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para quantificação dos açúcares em solução as amostras foram diluídas, filtradas (filtros de 0,45 µm) e em seguida analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a separação foi utilizada a coluna Biorad Aminex HPX-87H na temperatura de 65°C, fase móvel H₂SO₄ 5 mM na vazão 0,6 mL/min e detector de índice de refração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a caracterização química das amostras de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) antes e após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico.

Tabela 1 – Caracterização química do BCA antes e após pré-tratamento

Componente (%)	<i>In natura</i> **	Pré-Tratamento-195°C / 10 min	Perda/Remoção
Celulose	42,4	61,2	12,8
Hemicelulose	24,4	5,9	85,4
Lignina	24,9	31,0	24,8
Cinzas	2,1	1,2	65,5
Extrativos	5,5	-	-
Total	99,3	99,3	-
Rendimento mássico*	-	60,4	-

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

** Fonte: Silva (2011)

Após o pré-tratamento 85,4% da hemicelulose e 24,8% da lignina foram removidos. O pré-tratamento hidrotérmico é caracterizado por apresentar solubilização de grande parte da hemicelulose (Petersen *et al.*, 2009; Alvira *et al.*; 2010), com pouca perda/remoção de celulose e lignina. 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).

Os perfis de concentração de glicose em função do tempo de hidrólise para as cargas de sólidos e os complexos enzimáticos avaliados são apresentados na Figura 1.

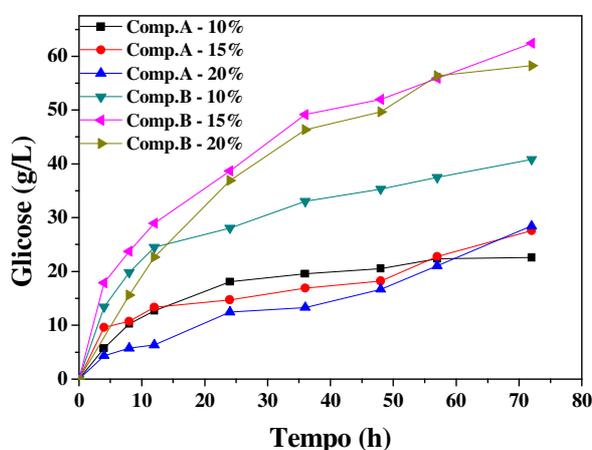


Figura 1- Concentração de glicose em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (10%, 15% e 20%) utilizando os complexos enzimáticos A e B.

Observou-se durante a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado um perfil típico da concentração de glicose. Há um rápido aumento da concentração de glicose no início do processo até 10 horas de reação. A influência da carga de sólidos na velocidade inicial de hidrólise é observada para os dois complexos enzimáticos avaliados. Os experimentos realizados com 15% de carga de sólidos apresentaram maiores velocidades iniciais de reação (observado pelo rápido aumento da concentração de glicose nas primeiras 10 h de reação) para os dois complexos enzimáticos.

Foram obtidas para as cargas de sólido de 10%, 15% e 25% as concentrações finais de glicose de 22,6, 27,6, 28,5 g/L (complexo enzimático-A) e 40,9, 62,4 e 58,2 g/L (complexo enzimático B). Comportamento semelhante foi observado por López-Linares *et al.* (2014) em experimentos com palha de colza e por Ramachandriya *et al.* (2013) em experimentos utilizando como substrato redcedar oriental (espécie de coníferas).

A Figura 2 ilustra a conversão de celulose em glicose ao longo de 72 horas de hidrólise. Observa-se a redução da conversão com o aumento da carga de sólidos. Esse comportamento foi observado por vários autores (López-Linares *et al.*, 2014; Kristensen, *et al.*, 2009; Ramachandriya, *et al.*, 2013 e Cara *et al.*, 2007).

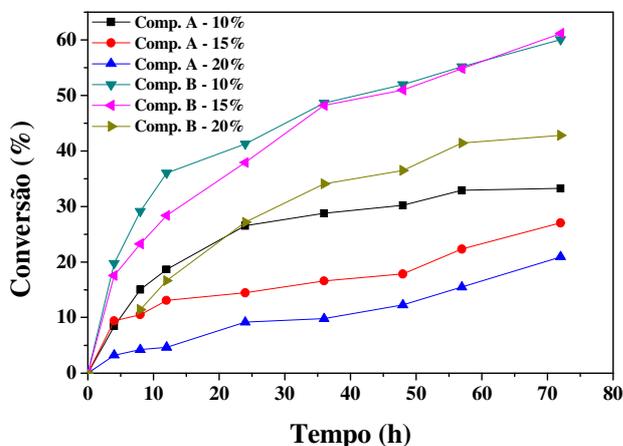


Figura 2- Conversão de celulose em glicose em função do tempo para diferentes cargas de sólidos (10%, 15% e 20%) utilizando os complexos enzimáticos A e B.

O aumento da carga de sólidos de 10 para 20% (m/v) levou a uma redução na conversão enzimática de 37 e 29% para os complexos enzimáticos A e B, respectivamente. Vários fatores podem contribuir para redução da capacidade de conversão pela enzima. Citam-se, entre eles, a inibição da enzima pelos produtos formados (glicose e celobiose), as alterações no substrato e as limitações de transferência de massa (Manazares *et al.*, 2011). Ramachandriya *et al.* (2013) observaram que a adição de esferas ao meio reacional melhorou a mistura possibilitando o aumento da conversão em experimentos com alta carga de sólidos.

O efeito da carga de sólidos na conversão (em 72 horas) é apresentado na Figura 3.

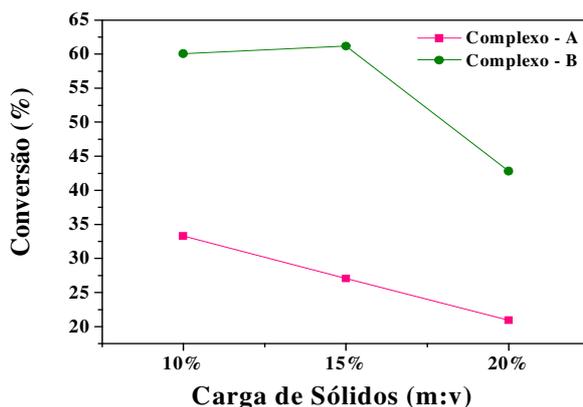


Figura 3- Conversão da celulose em glicose em função da carga de sólido (10%, 15% e 20%) para os complexos enzimáticos A e B.

Observa-se também uma maior eficiência do complexo enzimático-B em relação ao complexo-A. Essa maior eficiência pode ser explicada pelo fato de alguns complexos enzimáticos estarem sendo

complementados com enzimas oxidantes. Verificou-se que essas enzimas são capazes de clivar ligações β -glicosídicas fornecendo novos pontos de entrada para as enzimas hidrolíticas (Cannella *et al.*, 2012).

4. CONCLUSÃO

Os resultados experimentais mostraram que o aumento da carga de sólidos ocasionou um aumento da concentração final de glicose. No entanto observou-se uma redução da conversão da celulose em glicose durante a hidrólise do bagaço com o aumento da carga de sólidos. Desta forma, como a concentração de glicose ao final da etapa hidrólise é importante (de forma a possibilitar a obtenção de vinhos com maiores teores alcoólicos) deve-se encontrar um equilíbrio entre a carga de sólidos e a conversão durante a etapa de hidrólise. Neste trabalho, nas condições avaliadas, o experimento realizado com 15% sólidos foi o que resultou na melhor condição. O complexo enzimático-B mostrou desempenho superior ao complexo enzimático-A, permitindo que se trabalhe com carga de sólidos de 15%.

5. Agradecimentos

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- BISWAS, R.; UELLEND AHL, H.; AHRING B. K. Wet explosion pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenerg.*, v. 61, p. 104-113, 2014.
- CANNELLA, D.; HSIEH, C.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Production and effects of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocelluloses at high dry matter content. *Biotechnol Biofuels*, 5:25, 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.
- 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.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; 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.

- KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol Biofuels*. 2:11, 2009.
- 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.
- MANZANARES, P.; NEGRO, J. M.; OLIVA, J. M.; SAÉZ, F.; BALLESTEROS, I.; CARA, C.; CASTRO, E.; RUIZ, E. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 86, p. 881-887, 2011.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenerg.*, v. 56, p. 526-544, 2013.
- 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.
- PEREIRA, L. T. C.; PEREIRA, L. T. C.; TEIXEIRA, R. S. S.; BOM, E. P. S.; FREITAS, S. P. Sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis: rheological data as criteria for impeller selection. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, p. 901-907, 2011.
- PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. *Biomass and Bioenerg.*, v. 33, p. 834-840, 2009.
- PURI, J. D.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Improving the performance of enzyme in hydrolysis of high solid paper pulp derived from MSW. *Biotechnol Biofuels*, 6:107, 2013.
- 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.
- SILVA, G. M. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol. 2011. 125 f. (Dissertação), Universidade Federal de São Carlo – UFSCar, São Carlos, 2011.
- SUGARCANE.ORG – Brazil’ Diverse Energy- Matrix. Disponível em: <<http://sugarcane.org/the-brazilian-experience/brazils-diverse-energy-matrix>> Acesso em: 20/04/2014.
- ÚNICA – Histórico de Produção e Moagem- Por Safra. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>> Acesso em: 20/04/2014.
- WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solidsloading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Appl Energy*, v. 99, p. 23-31, 2012.