

# HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO HIDROTERMICAMENTE

G. M. SILVA<sup>1</sup> e A. J. G. CRUZ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos

E-mail para contato: gislenemota@hotmail.com

**RESUMO** – O objetivo deste trabalho foi realizar o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), e em seguida, realizar ensaios de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), utilizando levedura liofilizada *Saccharomyces cerevisiae*. O BCA foi tratado em três condições: 195 °C/10 min, 195 °C/10 min com 0,021 % NaOH e 195 °C/ 10 min com 0,5 % NaOH. Depois da etapa de pré-tratamento a fração insolúvel foi separada da fração líquida por filtração e lavada com água para a remoção dos açúcares solúveis e compostos inibidores. As frações sólidas foram analisadas quimicamente. Após as caracterizações, os sólidos foram hidrolisados utilizando celulase comercial e fermentados. As SSFs foram realizadas em shaker com 10 e 15 % (m/m) de carga de sólidos a 250 rpm a 37 °C por 120 h. Os resultados mostraram que os BCAs tratados apresentaram satisfatória remoção de hemicelulose. Nas SSFs obteve-se máxima conversão em glicose de 47,7 % (ensaio com 15 % de sólidos sem deslignificação) e rendimento em etanol de 41,8 % (ensaio com 10 % de sólidos com deslignificação alcalina).

## 1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos são muito abundantes no Brasil e podem ser obtidos de vários processos agroindustriais, tais como na produção de açúcar e etanol nas usinas. Estes resíduos agroindustriais contêm grandes quantidades de açúcares fermentescíveis que podem ser hidrolisados e fermentados para a produção de etanol de segunda geração (2G) (Silva, 2011).

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é constituído basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celbiose), rígido e difícil de ser hidrolisada. A sua hidrólise completa gera a glicose (açúcar de seis carbonos fermentescível). A hemicelulose é um heteropolímero constituída principalmente do monômero xilose e com várias ramificações de manose, arabinose, galactose entre outras. A sua hidrólise é mais fácil que a da celulose, porém a fermentação da xilose (açúcar de cinco carbonos) é um pouco mais difícil. Por fim, a lignina é uma macromolécula aromática heterogênea formada por ligações éter biologicamente estáveis. Sua estrutura química é hidrofóbica e complexa. É formada por unidades de fenilpropano derivadas da polimerização oxidativa de três alcoóis precursores: trans-p-cumárico, trans conífero e trans sinapílico (Curvelo, 1992).

Várias tecnologias estão disponíveis para a conversão da biomassa em açúcares monoméricos

(Santos *et al.*, 2011). O diferencial entre as tecnologias está no catalisador utilizado na etapa de hidrólise dos polissacarídeos do material lignocelulósico (Kádár *et al.*, 2004).

As etapas de hidrólise enzimática e fermentação podem ser conduzidas simultaneamente, processo que é conhecido como Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) (Öhgren *et al.*, 2006). A SSF é um processo mais eficiente que a Sacarificação e Fermentação Separadas (SHF), pois reduz o acúmulo de açúcares que podem inibir a enzima durante a etapa de hidrólise (Brethauer e Wyman, 2010). Além disso, a combinação das etapas de hidrólise e fermentação diminui os custos do processo e reduz os riscos de contaminação (Olofsson, Bertilsson e Gunnar, 2008).

Este trabalho avaliou a etapa de pré-tratamento hidrotérmico do BCA e realizou experimentos na configuração Sacarificação e Fermentação Simultâneas.

### **1.1. Pré-tratamento hidrotérmico**

O pré-tratamento hidrotérmico tem atraído grande atenção pelo fato de usar apenas água como solvente. No pré-tratamento hidrotérmico, dependendo da condição operacional empregada (temperatura e tempo de reação), é possível obter significativa remoção da hemicelulose com retenção da celulose na biomassa e melhoramento da sua digestibilidade pela celulase (Hu *et al.*, 2011).

A água líquida abaixo do ponto crítico é favorecida para realizações de reações químicas. A constante de ionização da água aumenta com a temperatura e é cerca de três ordens de grandeza maior do que a temperatura ambiente. Além disso, a constante dielétrica da água diminui com a temperatura. A baixa constante dielétrica da água permite que a água líquida dissolva os compostos orgânicos, enquanto que uma alta constante de ionização da água promove em um meio ácido a hidrólise da biomassa, através da clivagem das ligações de éter e éster favorecendo a hidrólise da hemicelulose (Savage, 1999; Kumar e Gupta 2009 e Franck, 1998). O ácido acético formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica atuará como catalisador da reação da hidrólise da biomassa promovendo a despolimerização da hemicelulose (processo autocatalítico).

O pré-tratamento hidrotérmico é tipicamente conduzido em temperaturas entre 150 a 220 °C. A depender das condições operacionais ocorre uma maior ou menor despolimerização da hemicelulose. Esse fato pode levar a maior concentração de oligossacarídeos e/ou do monômero (xilose). A recuperação desse monômero pode variar entre 88 a 98 % (Kumar *et al.*, 2011).

Valores de pH abaixo de 3 podem causar a precipitação da lignina e também catalisar a degradação da xilose. Para evitar a formação de inibidores, o pH deve ser controlado entre 4 e 7 durante a etapa de pré-tratamento. Nesta faixa de pH minimiza-se a formação de monossacarídeos e, por conseguinte, a formação de produtos de degradação. Manter o pH perto do neutro (5 a 7) evita a formação de inibidores da fermentação durante a etapa de pré-tratamento (Bobleter 1994; Hendriks e Zeeman 2009).

A intensidade do pré-tratamento hidrotérmico pode ser quantificada por um parâmetro denominado fator de severidade ( $r_0$ ). Este parâmetro foi proposto por Overend e Chornet em 1987 (Equação 1).

$$\log (r_o) = t \cdot \exp\left(\frac{T - 100}{14,75}\right) \quad (1)$$

onde:  $t$  é o tempo de residência (em minutos) e  $T$  é a temperatura (em °C).

Este fator pode ser usado para medir o efeito combinado de ambas as variáveis, tempo e temperatura, em um dado pré-tratamento.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste projeto foi cedido pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP). Neste trabalho as amostras de BCA foram peneiradas em uma malha de 3 mm.

### 2.2. Pré-tratamento do BCA

O BCA *in natura* foi pré-tratado hidrotermicamente a 195 °C/10 min com agitação de 200 rpm na proporção 1:10 (m/m). O material após o primeiro pré-tratamento foi filtrado e em seguida, deslignificado com solução de hidróxido de sódio (NaOH). As concentrações das soluções foram 0,021 % e 0,5 % de NaOH. O material tratado hidrotermicamente foi deslignificado na proporção 1:10 (m/v) em autoclave a 121 °C por 30 min. Após o tempo de reação, o BCA deslignificado com 0,021 % de NaOH foi lavado três vezes com volume de 500 mL de água deionizada ( $\pm 60$  °C). O BCA tratado com 0,5 % de NaOH foi lavado até pH 7,0. Determinou-se a umidade dos BCAs deslignificados. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos herméticos em câmara fria para posterior caracterização química (metodologia descrita por Gouveia *et al.*, 2009) e hidrólise enzimática.

### 2.3. Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)

Ensaio de SSFs foram realizados com o material tratado a 195 °C/10 min seguido de deslignificação com 0,021 % e 0,5 % de solução de NaOH. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

O inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL em *shaker* 32 °C com agitação de 200 rpm por 16 horas. O inóculo foi constituído de 5,0 g/L de extrato de levedura, 10,0 g/L de peptona, 25,0 g/L de glicose e 2,0 g/L de *Saccharomyces cerevisiae* (liofilizada PE-2). Terminado o tempo de reação, o meio foi centrifugado em tubos Falcon de 45 mL a 6.000 rpm por 10 min. Retirou-se o sobrenadante e suspendeu-se o inóculo com tampão citrato 50 mM, pH 4,8. Adicionou-se em

cada frasco 0,5 mL de inóculo com densidade ótica (DO) de 0,5. A DO foi calculada segunda Equação 2 (NREL, 2008).

$$\text{Volume total de inóculo (mL)} = \left( \frac{\text{volume de hidrolisado (mL)} \times 0,5}{\text{D.O final do inóculo}} \right) \times (\text{número de frascos hidrolisados} + 1) \quad (2)$$

O meio de fermentação foi preparado em um balão volumétrico de 250 mL. O meio foi constituído de 5,0 g/L extrato de levedura, 3,0 g/L de peptona, 2,5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 1,0 g/L de fosfato de dipotássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e 5,0 g/L de sulfato de amônio ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

As SSFs foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL em *shaker* a 250 rpm a 37 °C por 120 h na proporção de 10 e 15 % de carga de sólidos e carga enzimática de 20 FPU (Accellerase 1500)/g BCA tratado. Nos ensaios com 15 % de sólidos adicionou-se esferas metálicas para ajudar na dissolução do BCA tratado. Adicionou-se 5,0 mL de meio de fermentação, 2,5 mL de tampão citrato pH 4,8 (50 mM), 0,5 mL de inóculo de DO de 0,5 e água deionizada até massa total de 50,0 g. Alíquotas foram retiradas e filtradas em membrana de celulose 0,2 µm para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos rendimentos mássicos (R) obtidos após cada etapa de pré-tratamento. A perda de massa nas amostras que foram deslignificadas em relação à amostra que somente sofreu tratamento hidrotérmico foi de 8,7 % para o BCA hidrotérmico /0,021 % NaOH e 15,6 % para o BCA tratado hidrotérmicamente /0,5 % NaOH.

Tabela 1. Rendimentos mássicos (R) obtidos na etapa de pré-tratamento.

Condições de pré-tratamentos	R (%)
195 °C/10 min	63,4
195 °C/10 min /0,021 % de NaOH	57,9
195 °C/10 min /0,5 % de NaOH	53,5

$$R = \text{massa final (g)} / \text{massa inicial (g)}$$

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos nas caracterizações químicas das amostras de BCA sem deslignificação e com deslignificação de 0,021 e 0,5 % de solução de NaOH.

Tabela 2. Caracterização química das amostras de BCA (*in natura* e pré-tratadas).

Componentes (%)	<i>In natura</i>	195 °C/10 min	195 °C/10 min com 0,021 % NaOH	195 °C/10 min com 0,5 % NaOH
Celulose	40,8 ± 1,6	55,7 ± 0,8	58,7 ± 2,2	60,5 ± 0,5
Hemicelulose	24,5 ± 0,8	6,3 ± 0,1	3,6 ± 0,5	6,3 ± 1,0
Lignina solúvel	5,5 ± 1,3	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,2	5,2 ± 0,7
Lignina insolúvel	17,7 ± 1,5	27,4 ± 2,2	26,7 ± 0,5	17,9 ± 0,2
Cinzas	5,4 ± 1,1	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	5,1 ± 0,2
Extrativos	5,7 ± 0,4	-	-	-
Total	99,6	96,6	95,9	96,6

A partir dos resultados apresentados (Tabela 1) observa-se que o aumento da concentração de NaOH causa maior remoção de lignina, aumentando o teor de celulose na amostra de BCA pré-tratada. No entanto, o aumento na concentração de NaOH promove maior perda de biomassa. A remoção de hemicelulose foi satisfatória para todos os BCAs deslignificados (83,7% para hidrotérmico, 91,4 % para hidrotérmico/0,021 % de NaOH e 86,1 % para hidrotérmico com 0,5 % de NaOH). O teor de lignina insolúvel foi reduzido quase pela metade (45,8 %) para o BCA hidrotérmico /0,5 % NaOH. A perda de celulose foi de 16,7 % e 20,6 %, respectivamente, para BCA hidrotérmico /0,021 % e hidrotérmico /0,5 % de NaOH.

A produção de etanol a partir da biomassa requer a conversão da celulose em glicose e, em seguida, a fermentação do açúcar a etanol (Hu *et al.*, 2011). Neste trabalho, os ensaios de SSFs foram realizados em *shaker* a 37 °C com agitação de 250 rpm por 120 h com cargas de sólidos de 10 e 15 % de BCA seco. A concentração de etanol foi acompanhada ao longo do tempo, como mostra a Figura 1. O melhor rendimento em etanol foi para 10 % de BCA com 0,021 % de NaOH cerca de 41,8 % em 48 h de SSF. As condições de 10 e 15 % de BCA sem deslignificação os rendimentos foram de 36,6 (em 96 h) e 39,5 % (em 96 h), respectivamente, Tabela 3.

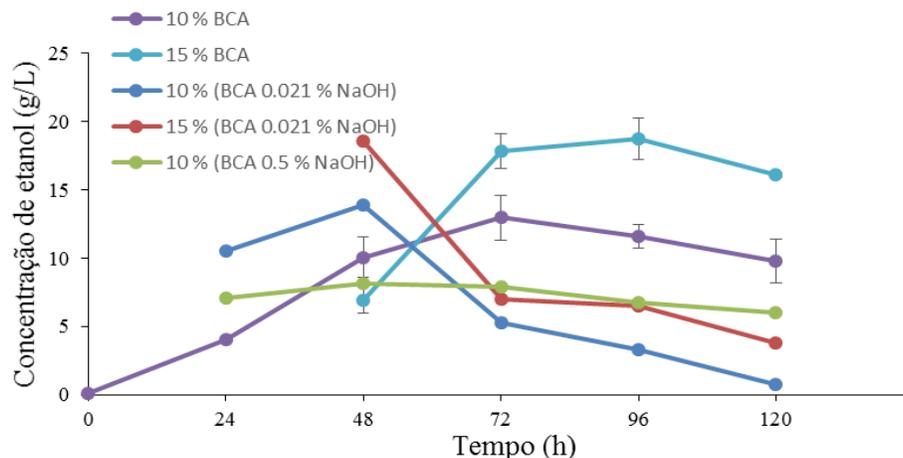


Figura 1. Gráfico da concentração de etanol ao longo dos experimentos SSFs.

Tabela 3. Parâmetros obtidos nos ensaios de SSFs.

Condições das SSFs	$C_G$ (g/L)	$C_{G(SSF)}$ (%)	$C_E$ (g/L)	$R_E$ (%)
10 % (195 °C/10 min)	61,9	37,9	31,6	36,6
15 % (195 °C/10 min)	92,9	47,7	47,5	39,5
10 % (195 °C/10 min /0,021 % NaOH)	65,2	42,7	33,3	41,8
15 % (195 °C/10 min /0,021 % NaOH)	98,0	22,0	50,1	13,1
10 % (195 °C/10 min /0,5 % NaOH)	67,3	24,4	34,4	23,7

$C_G$ : Conversão teórica total da celulose em glicose.

$C_{G(SSF)}$ : Conversão da celulose em glicose obtida na SSF.

$C_E$ : Concentração teórica total de glicose a etanol.

$R_E$ : Rendimento em etanol global (conversão teórica total da glicose em etanol).

Os resultados mostraram que a máxima conversão de celulose em glicose (47,7 % em 48 h) foi obtida na condição com 15 % de BCA sem deslignificação. A condição com 15 % de BCA deslignificado com 0,021 % apresentou o menor rendimento (22,0 %). Uma possível causa seria a contaminação do BCA. Utilizando 10 % de sólidos a melhor conversão foi para a condição com 0,021 % de NaOH (42,7 %).

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação com solução de NaOH aumentou o teor de celulose no BCA, porém diminuiu o rendimento do pré-tratamento. O teor de lignina também foi reduzido com o aumento da concentração de NaOH no pré-tratamento. Nos ensaios de SSFs a deslignificação não foi tão significativa, pois com 15 % de BCA sem deslignificar obteve-se maior conversão em glicose (47,7 %) quando comparado com 15 % de BCA deslignificado com 0,021 % de NaOH (22,0 %). Na produção de etanol os rendimentos para 10 % BCA sem deslignificação foi de 36,6 %. Quando o material foi deslignificado com 0,021 % obteve-se uma melhora no rendimento, alcançando o valor de 41,8 %.

## 5. Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS

- BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym Sci.*, v. 19, p. 797-841, 1994.
- BRETHAUER, S.; WYMAN, C.; E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 4862-4874, 2010.
- FRANCK, E. U. Fluids at high pressures and temperatures. *Pure Appl. Chem.*, v. 59, n. 1, p. 25-34, 1987.
- CURVELLO, A. A. S. Processos de deslignificação organossolve. Instituto de Química de São Carlos, USP, 1992, 110p. (Tese)
- GOUVEIA, E.; R.; NASCIMENTO, R.; T.; SOUTO-MAIOR, A.; M. Validação de metodologia para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. *Quím. Nov.*, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.
- HENDRIKS, A.; T.; W.; M.; ZEEMAN, G. Pretreatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, v. 10, p 100, 2009.
- HU, Z.; RAGAUSKAS, A.; J. Hydrothermal pretreatment of switchgrass. *Ind. Eng. Chem.*, v. 50, p. 4225-4230, 2011.
- KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crop. Prod.*, v. 20, p. 103-110, 2004.
- KUMAR, S.; GUPTA, R.; B. Biocrude production from switchgrass using subcritical water. *Energy and Fuels*, v. 23, p. 5151-9, 2009.

- LIU, C.; WYMAN, C.; E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.*, V. 42, p. 5409-16, 2003.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; GUNNAR, L. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuel.*, 1:7, p. 1-14, 2008.
- ÖHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.; F.; GALBE, M.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Scienc. Direct.*, v. 126, p. 488-498, 2006.
- OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosic by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, v. 321, p. 523-536, 1987.
- ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *Journ. superc. Fluid.*, v. 47, p. 54-63, 2008.
- 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 a produção de etanol. *Quím. Nov.*, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, J.; R.; A.; LUCENA, M.; S.; GUSMÃO, N.; B.; GOUVEIA, E.; R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. *Ind. Crop. Prod.*, v. 36, p. 584-588, 2012.
- SAVAGE, P. E. Organic chemical reactions in supercritical water. *Chem.l Rev.*, v. 99, p. 603-21, 1999.
- SILVA, G. M. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 104 p., 2011.