

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Associação entre Pré-Tratamentos Biológico, Ácido e Hidrotérmico da Palha de Cana-de-açúcar para a Hidrólise Enzimática

Bruno César S. Coelho¹, Edward D. Hermsilla², Leonardo V. Belo Pazutti¹, Ricardo S. S. Teixeira³, Elba P.S. Bon³, Heidi L. Schalchli², Maria Cristina Diez², Viridiana S. Ferreira-Leitão¹, Ayla Sant'Ana da Silva¹

¹Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI), Laboratório de Biocatálise, Rio de Janeiro, Brasil

²Scientific and Technological Bioresource Nucleus (BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Laboratório Bioetanol, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas as associações do pré-tratamento biológico (PTB) com pré-tratamentos ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH) e o efeito de tais associações foi comparado à eficiência dos pré-tratamentos da palha de cana-de-açúcar realizados individualmente. Todos os pré-tratamentos foram realizados com a biomassa cortada (2cm) ou moída (180 a 850 µm). A granulometria do material não influenciou no efeito dos PTH e PTA, uma vez que para o material cortado ou moído a remoção da fração hemicelulósica foi similar. Da mesma forma, a granulometria do material não apresentou efeito significativo na digestibilidade enzimática dos materiais pré-tratados. A associação do PTB com PTA e PTH, apesar de não alterar expressivamente os rendimentos finais de hidrólise, permitiu a obtenção de materiais pré-tratados com elevado conteúdo de celulose, tendo conseqüentemente aumentado a concentração de glicose final obtida na hidrólise.

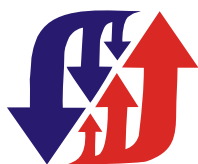
Palavras-chave: Pré-tratamento, palha de cana-de-açúcar, etanol celulósico.

INTRODUÇÃO

A produção de etanol celulósico é uma das tecnologias mais pesquisadas atualmente. A rota de transformação da biomassa em etanol é constituída das seguintes etapas: pré-tratamento da biomassa, produção de enzimas, hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, fermentação dos açúcares a etanol e destilação do produto final. Entre os obstáculos tecnocômicos para a disseminação comercial da tecnologia está a etapa de pré-tratamento, que é responsável por parte expressiva dos custos de processamento (YANG & WYMAN, 2008).

Nos últimos 30 anos, diversos métodos de pré-tratamento foram desenvolvidos, incluindo processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (ALVIRA *et al.*, 2010). No cenário atual, as plantas industriais de produção de etanol celulósico em operação em escala comercial utilizam os pré-tratamentos ácidos ou hidrotérmicos como principais técnicas de processamento da biomassa. Essas técnicas se baseiam na solubilização da hemicelulose (fração C5), resultando em um resíduo sólido composto majoritariamente por celulose e lignina (MOUTTA *et al.*, 2013). Ambos os métodos apresentam custos operacionais elevados, devido ao alto consumo de energia, à necessidade de alta temperatura, pressão, requerimento de reagentes químicos, bem como equipamentos especializados (YANG & WYMAN, 2008).

Na tentativa de reduzir os custos e riscos operacionais, diminuindo a severidade dos pré-tratamentos ácidos e hidrotérmicos, o presente trabalho estuda a associação destes com o pré-tratamento biológico. Os pré-tratamentos biológicos são interessantes por constituírem



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

uma alternativa barata com baixo impacto ambiental e baixa demanda energética já que a técnica emprega fungos que atuam em temperatura e pressão ambientes para degradação da lignina. Como pontos negativos, os processos biológicos exigem um tempo de residência longo e não possuem efetividade suficiente para serem considerados como alternativa de pré-tratamento independente (LIU *et al.*, 2016). No entanto, o problema dos longos períodos de tratamento pode ser resolvido através da aplicação dos fungos durante o armazenamento da biomassa. O armazenamento de biomassas agrícolas é em geral feito a seco, especialmente para as culturas de baixa umidade, como a palha de cana-de-açúcar. No entanto, o armazenamento a seco apresenta desvantagens, tais como elevadas perdas de matéria seca estocada ao ar livre e risco de incêndio, conforme observado na planta da empresa Granbio, em Alagoas (NOVA CANA, 2016). Em contraste, o armazenamento da biomassa úmida, com pré-tratamento biológico ocorrendo concomitante, pode ser uma alternativa para reduzir a recalcitrância da biomassa que será submetida à pré-tratamentos ácidos/hidrotérmicos, o que pode, conseqüentemente, acarretar na diminuição da severidade de tais métodos.

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar a associação do pré-tratamento biológico com pré-tratamentos ácidos e hidrotérmicos para a palha da cana-de-açúcar, objetivando a diminuição da severidade dos pré-tratamentos (tempo e temperatura).

MATERIAIS E MÉTODOS

Pré-tratamentos e caracterização química da palha *in natura* e pré-tratada

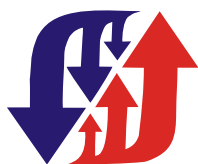
A palha de cana-de-açúcar foi cedida pelo Complexo Bioenergético Itarumã S.A. Amostras do material *in natura* foram cortadas (aproximadamente 2 cm) ou moídas em moinho de facas e peneiradas (180 a 850 μm). Primeiramente foram realizados os pré-tratamentos biológico (PTB), ácido (PTA) e hidrotérmico (PTH) da amostra de biomassa *in natura*, e posteriormente esses pré-tratamentos foram combinados da seguinte forma: biológico com ácido (PTBA) e biológico com hidrotérmico (PTBH).

O fungo *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310 foi utilizado para o PTB. O fungo foi inoculado na concentração de 10 mg de micélio/grama de biomassa em frascos previamente autoclavados contendo 5 g de palha e 25 mL de água destilada. Os cultivos foram incubados a 30°C por 20 dias, sem agitação. Após este período, a biomassa foi lavada com água destilada.

O PTA foi realizado com 2,9% (m/v) de H_2SO_4 em uma proporção de 1:4 (biomassa: H_2SO_4) a 121°C por 30 min. O PTH foi realizado em um reator Parr 4848 a 170°C, por 40 minutos, 100 rpm e 20 bar inicial em atmosfera de nitrogênio, com uma proporção de 1:10 (biomassa:água). Ao final dos processos as frações sólidas foram lavadas com água destilada. Os experimentos para determinação dos sólidos totais, umidade, cinzas, extrativos, carboidratos estruturais e lignina foram realizados conforme Sluiter e colaboradores (2008).

Hidrólise enzimática

As atividades de FPase e β -glicosidase das enzimas comerciais Celluclast 1.5 L e Novozym 188 foram determinadas conforme Ghose (1987). As hidrólises foram realizadas em frascos de 50 mL, com massa total do ensaio de 20 g, contendo 5% de biomassa, a mistura de enzimas, tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 e azida de sódio a 0,02%. A carga de FPase foi de 15 FPU/g de biomassa com relação de 1:3 de FPase/ β -glicosidase. Os ensaios foram incubados em shaker a 50°C, 200 rpm e alíquotas foram retiradas em 0, 1, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 h e analisada por HPLC para quantificação dos açúcares.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados de caracterização química da palha pré-tratada por PTB, PTH e PTA, tanto na forma cortada (C) ou moída (M). Conforme esperado, os pré-tratamentos PTH e PTA foram eficientes na remoção de hemicelulose, resultando em amostras pré-tratadas com conteúdo de hemicelulose inferior a 10%. No entanto, é interessante observar que a granulometria do material não influenciou no efeito dos PTH e PTA, uma vez que para C e M a remoção da fração hemicelulósica foi similar. O PTB teve menor impacto na alteração da composição química da palha, tendo sido observado um aumento no percentual de glucana, provavelmente devido à remoção parcial de extrativos e degradação parcial da lignina e da hemicelulose. A degradação parcial da lignina pode ser constatada visualmente através da alteração da coloração do material para tonalidades mais claras.

Tabela 1: Caracterização química da palha *in natura* e pré-tratada por PTH, PTA e PTB.

Pré-tratamento	Glucana (%)	Xilana (%)	Arabinana (%)	Galactana (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
<i>in natura</i> *	37,37 ± 1,45	22,22 ± 1,04	2,49 ± 0,15	0,78 ± 0,09	19,43 ± 2,44	0,55 ± 0,15
PTB-C	43,34 ± 0,31	22,99 ± 0,35	2,11 ± 0,14	0,48 ± 0,03	18,90 ± 0,48	0,57 ± 0,15
PTB-M	45,55 ± 0,72	22,12 ± 0,28	1,83 ± 0,20	0,44 ± 0,30	18,05 ± 0,37	0,50 ± 0,08
PTH-C	55,40 ± 0,92	7,32 ± 0,37	n.d	0,67 ± 0,05	30,38 ± 0,98	3,35 ± 0,25
PTH-M	60,91 ± 1,97	7,49 ± 0,28	n.d	0,64 ± 0,03	30,53 ± 1,92	0,60 ± 0,10
PTA-C	55,28 ± 0,39	9,15 ± 0,28	n.d	0,56 ± 0,03	30,78 ± 1,31	0,87 ± 0,10
PTA-M	56,40 ± 0,21	9,45 ± 0,32	n.d	n.d	30,12 ± 0,62	1,15 ± 0,10

* A biomassa *in natura* também contém 12,75% ± 0,78 de extrativos; n.d: não detectado

A Tabela 2 apresenta os resultados de caracterização química da palha pré-tratada por PTBH, PTBA, nas formas C ou M. Foi observado que ao se executar o PTB anteriormente aos PTH e PTA, a remoção da hemicelulose por esses métodos se torna mais eficiente, resultando em materiais com maior proporção de glucana no resíduo sólido.

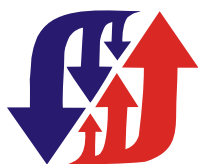
Tabela 2: Caracterização química da palha tratada por combinação de pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Glucana (%)	Xilana (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
PTBH-C	68,33 ± 2,92	4,62 ± 0,32	25,51 ± 0,99	2,09 ± 0,41
PTBH-M	63,04 ± 1,70	5,17 ± 0,21	23,85 ± 1,26	1,02 ± 0,03
PTBA-C	61,37 ± 1,48	6,04 ± 0,23	25,68 ± 2,80	0,53 ± 0,06
PTBA-M	61,62 ± 0,62	5,56 ± 0,25	26,85 ± 0,19	0,72 ± 0,29

Os açúcares arabinose e galactose não foram detectados nas amostras pré-tratadas.

Após a realização dos diferentes pré-tratamentos, foram conduzidos ensaios comparativos de hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas. A Figura 1 apresenta a concentração final de glicose após 72 h de hidrólise e o rendimento de conversão de celulose em glicose. Como observado nas caracterizações químicas, a granulometria do material não teve impacto proeminente na digestibilidade enzimática da biomassa pré-tratada, mostrando que nas condições avaliadas não é necessário moer a biomassa.

A combinação PTBA permitiu uma maior liberação de glicose e obtenção de rendimentos ligeiramente superiores em comparação ao PTA. Já a combinação PTBH,



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

permitiu uma maior liberação de glicose (devido ao maior conteúdo de glucana do material pré-tratado), porém não houve aumento dos rendimentos obtidos em comparação a PTH.

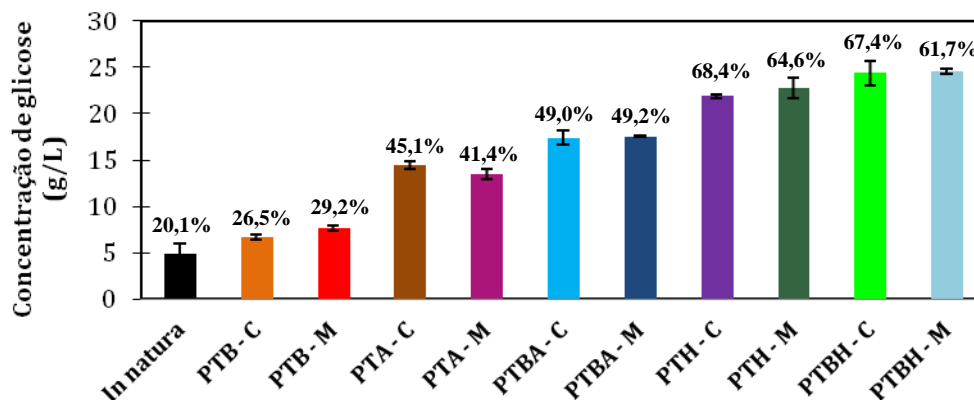


Figura 1: Concentração de glicose após 72 h de hidrólise da palha *in natura* e pré-tratada. Os números acima das barras indicam o rendimento de conversão de celulose em glicose obtido.

CONCLUSÕES

A análise comparativa dos resultados obtidos permitiu identificar que, dentro dos limites avaliados, os pré-tratamentos e a hidrólise enzimática não são afetados substancialmente pela granulometria do material de partida. O pré-tratamento mais eficiente foi o PTH, apresentando o melhor rendimento em 72 h. Apesar da combinação PTBH não resultar em aumento do rendimento de hidrólise, tal estratégia foi capaz de aumentar a disponibilidade de celulose a ser convertida. Na continuidade do trabalho, será avaliada a diminuição da severidade de PTH quando combinado a PTB, diminuindo o tempo e a temperatura de operação.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto FAPERJ-UFRO E-26/010.003091/2014.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alvira P, Tomás-pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Biores Technol* 101:4851-4861.
- Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59:257-268
- Liu S, Xu F, Ge X, Li Y. 2016. Comparison between ensilage and fungal pretreatment for storage of giant reed and subsequent methane production. *Biores Technol* 209:246-253
- Moutta RO, Silva MC, Corrales RCNR, Cerullo MAS, Ferreira-Leitao VS, Bon EPS. 2013. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected To Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. *J Microb Biochem Technol* S12:5.
- NovaCana. 2016. Terceiro e maior incêndio na GranBio atinge 90% do estoque de palha, mas empresa contesta. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/terceiro-maior-incendio-granbio-atinge-estoque-materia-prima-050116/>>. Acesso em 23 de março, 2016.
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass sugar, by-products in liquid fraction process samples. NREL Laboratory Analytical Procedures, Golden, CO.
- Yang B, Wyman CE. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod Bioref* 2:26-40.