



Produção de Etanol a partir da forrageira *Brachiaria Brizantha cv. Marandu*.

Felipe Brandão de Paiva Carvalho¹, Thályta Fraga Pacheco¹, Dasciana de Sousa Rodrigues¹, Silvia Belém Gonçalves¹, Marcelo Ayres Carvalho², Cristina Maria Monteiro Machado¹

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroenergia

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Cerrados

Parque Estação Biológica – PqEB s/n° - 70770-901 Brasília – DF - E-mail: felipe.carvalho@embrapa.br

RESUMO

O desenvolvimento de um processo de produção de etanol lignocelulósico competitivo industrialmente é necessário para a substituição de combustíveis fósseis, os quais causam muitos problemas ambientais. Neste trabalho, a produção de etanol a partir de Brachiaria Brizantha cv. Marandu foi investigada. Esta biomassa foi submetida a um pré-tratamento com soluções do tipo Organosolv (etanol:água) com catalisador ácido (H_2SO_4), seguido de hidrólise enzimática. O hidrolisado atingiu concentração de glicose de 26g/L. A este meio foi adicionado complemento em açúcar e a mistura foi mantida sob fermentação durante 4,5 horas. Sinais de inibição não se mostraram significativos, e houve uma produção de etanol de aproximadamente 27g/L para 60g/L de glicose consumida, demonstrando um grande potencial para a produção de etanol a partir da forrageira.

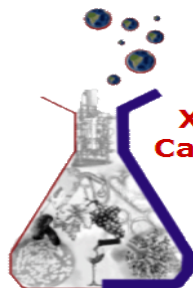
Palavras-chave: Etanol lignocelulósico, fermentação alcoólica, pré-tratamento, organosolv

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, cada vez mais atenção tem sido dedicada às práticas ditas “verdes”, com o objetivo de mitigar as emissões de gases causadores do efeito estufa, bem como evitar o aumento dos níveis de poluição mundial. Dentro desse contexto, a utilização cada vez maior de combustíveis provenientes de biomassa (por assim dizer, renováveis) vem com o objetivo de substituir, mesmo que em parte, a utilização dos combustíveis derivados do petróleo.

O etanol produzido de cana-de-açúcar é o principal combustível de biomassa na matriz energética brasileira. Apesar de consolidada a produção, a cana-de-açúcar, principalmente por sua produtividade e rendimento em produção do combustível, ainda apresenta limitações como o aumento dos preços e a falta de disponibilidade no período da entressafra (PACHECO, 2011).

O etanol produzido a partir de matérias-primas lignocelulósicas não apresenta os problemas relativos à sazonalidade e não compete com a produção de alimentos, podendo ser



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

produzido a partir de resíduos de produção ou biomassa de plantas inteiras, como forrageiras e capins (JURADO *et al.*, 2009; NIGAM e SINGH, 2011). Por outro lado, o desenvolvimento da tecnologia apresenta dificuldades que ainda inviabilizam sua utilização em escala de produção competitiva, apesar dos esforços das instituições de pesquisa (MARGEOT *et al.*, 2009).

A estrutura intrincada do material celulósico, representada pela hemicelulose, lignina e a própria celulose, dificulta a ação de agentes físicos, químicos e biológicos na liberação dos açúcares fermentescíveis (SILVA *et al.*, 2009). A composição da matéria-prima pode ser o diferencial para a viabilidade da tecnologia, quando consideradas as hipóteses de redução dos níveis de lignina e hemicelulose e conseqüente maleabilidade da estrutura, que facilitariam a conversão de celulose em glicose.

O melhoramento das forrageiras do gênero *Brachiaria* visando à produção de combustíveis pode ser uma alternativa interessante para a viabilização de um processo competitivo de produção de etanol lignocelulósico. Suas características vantajosas, como a baixa porcentagem de lignina em sua composição e o distanciamento da tradicional disputa alimento-energia (CARVALHO *et al.*, 2009), vêm reforçar a idéia de que o melhoramento voltado ao desenvolvimento de uma matéria-prima energética pode ser decisivo na consolidação da tecnologia de segunda geração tanto para o mercado interno (em regiões não produtoras de cana-de-açúcar) quanto para o mercado externo.

O pré-tratamento da biomassa é uma etapa fundamental para o máximo aproveitamento na produção de etanol. As tecnologias testadas, como os pré-tratamentos com solução ácida diluída, organosolv, solução básica e explosão à vapor, promovem a liberação de produtos de degradação da matéria-prima que inibem as etapas biológicas subsequentes (quer sejam enzimáticas ou fermentativas). Dentre os principais inibidores, estão os ácidos fracos, furfurais (provenientes da degradação de açúcares) e compostos aromáticos (JING, ZHANG e BAO, 2009).

O processo organosolv, utilizado na indústria de papel e celulose, tem sido adaptado para o pré-tratamento de biomassas para a produção de etanol e utiliza uma solução contendo um solvente orgânico, geralmente etanol, responsável pela solubilização de parte da lignina e aumento do acesso à celulose para a etapa enzimática. Este pré-tratamento pode ser realizado na presença de catalisadores ácidos ou básicos, os quais aumentam a eficácia no fracionamento da biomassa (SOARES e ROSSEL, 2011).

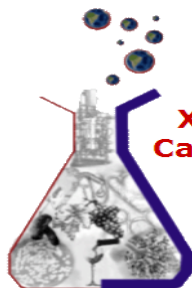
Neste trabalho, *BrachiariaBrizantha cv. Marandu*, foi submetida a pré-tratamento organosolv com catalisador ácido e o material pré-tratado foi hidrolisado enzimaticamente para posterior produção de etanol utilizando leveduras comerciais. Vale ressaltar que esta é uma abordagem nova para a produção de etanol celulósico, visto que não foram encontrados relatos na literatura para aplicação de *BrachiariaBrizantha cv. Marandu* para a produção de etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Os principais materiais utilizados neste trabalho foram: *Bachiariabrizantha cv. Marandu* (produzidas nos campos da Embrapa Cerrados), Celulases (cedidas pela Novozymes), levedura CAT-1 (cedida pela Usina Jalles Machado).

Pré-tratamento



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

Amostras de *Bachiariabrizantha cv. Marandu*, foram secas a 70°C durante 48 horas. Em seguida o material foi moído utilizando moinho de facas (granulometria máxima de 2mm).

O material seco e moído foi pré-tratado com solução de ácido sulfúrico 1,5 % v/v. Foram utilizados 7,5 mL de solução para cada grama de biomassa (peso seco) e a amostra foi mantida por 30 minutos em autoclave a 121 °C. Estas condições foram previamente estabelecidas através planejamento experimental 2³ com três (3) réplicas no ponto central.

Após a reação, a amostra foi filtrada e a fração líquida (contendo a hemicelulose) foi armazenada a 4°C. A fração sólida, contendo a celulignina parcialmente hidrolisada, foi submetida a duas lavagens com água destilada, para a retirada de inibidores e neutralização. Uma parte da fração sólida foi utilizada para determinação de umidade em estufa de secagem, a 92°C.

Hidrólise Enzimática

Antes de realizar a hidrólise da biomassa, condições ótimas para a atividade enzimática foram estabelecidas utilizando o método de Ghose (1987), variando-se o pH e a temperatura.

Para a etapa de hidrólise enzimática da celulignina foi utilizado um extrato enzimático comercial (Novozymes, 200 FPU/mL), composto de celobiase, exo e endo-glucanases. Para cada grama de biomassa (peso seco) foram adicionados 20 FPU. O sólido proveniente da etapa de filtragem foi novamente diluído em água destilada (na proporção 1:10, em base seca), seu pH ajustado para 5,0 (utilizando solução de hidróxido de sódio). Após acréscimo do extrato enzimático, a hidrólise foi realizada em erlenmeyers de 250mL, durante 18 horas, em agitador (shaker rotativo) de bancada, a uma temperatura de 55 °C e sob agitação constante de 200rpm.

O material hidrolisado foi centrifugado e a fração líquida foi armazenada a 4°C. O material seco, as frações de hemicelulose (proveniente do pré-tratamento) e a celulose hidrolisada (sobrenadante da hidrólise enzimática) foram analisados utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Gouveia *et al.*(2009), e adaptada para a análise de frações líquidas. As amostras foram diluídas e clarificadas em cartuchos C18, em seguida foram analisadas utilizando coluna aminex HPX 87 H e detector de índice de refração.

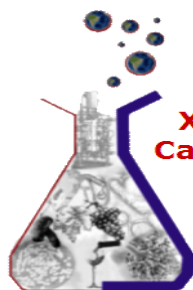
Fermentação

Para a fermentação foi utilizada a levedura comercial CAT-1, na concentração inicial de 15g/L em base seca. As fermentações foram conduzidas em diferentes concentrações de glicose, realizando-se os devidos ajustes em cada meio. Amostragens periódicas foram realizadas para acompanhamento do consumo de glicose, produção de etanol e concentração celular por método espectrofotométrico que relaciona absorvância com concentração celular em base seca, no comprimento de onda de 650nm.

Fermentações comparativas utilizando um meio sintético com a mesma concentração de glicose da forrageira pré-tratada e o próprio meio pré-tratado com e sem suplementação de nutrientes (0,25g/L de MgCl₂, 1g/L de KH₂PO₄ e 0,5g/L de (NH₄)₂PO₄) foram realizadas para avaliação do efeito inibitório do tratamento sobre essa etapa.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Caracterização da enzima



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

O estabelecimento das condições de pH e temperatura ótimos para a hidrólise enzimática é fundamental para garantir a máxima formação de produto com a menor quantidade de enzima possível, reduzindo assim custos do processo.

Os gráficos da Figura 1(a,b) apresentam o perfil de atividade das celulases utilizadas neste trabalho em função do pH e da temperatura.

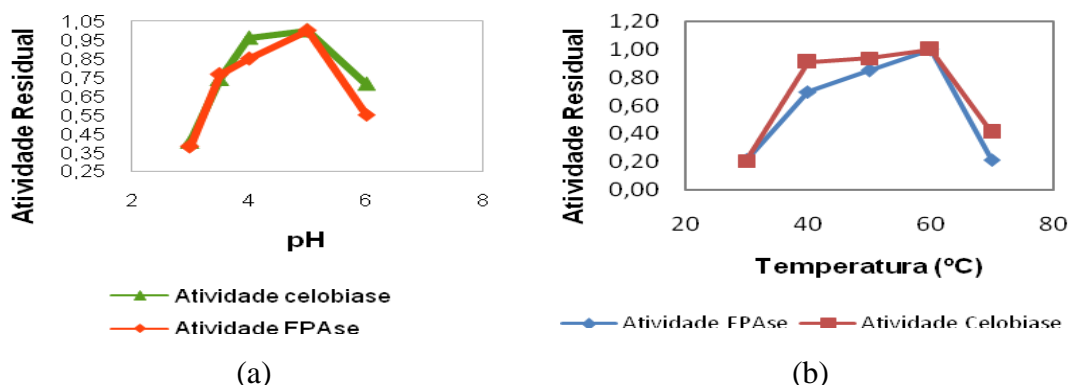


Figura 1 – Perfil da atividade enzimática em função do pH (a) e da temperatura (b).

Os dados da Figura 1(b) indicam a temperatura ótima de 60°C tanto para a mistura de enzimas (atividade FPase), quanto para atividade de beta-glicosidase (atividade celobiase). Experimentos de inativação térmica nessa temperatura indicam que quase toda atividade catalítica é perdida num intervalo de 1 hora (dados não mostrados). Portanto neste trabalho foi utilizada a temperatura de 55 °C para a hidrólise de biomassa.

Na Figura 1 (a) pode ser observado que o pH ótimo para as celulases é 5,0. Este valor foi utilizado em todos os experimentos de hidrólise.

Hidrólise da Biomassa

Os dados parciais da composição dessa braquiária foram: Lignina insolúvel (17,00%); Lignina Solúvel (0,85%); Cinzas (2,36%); Celobiose(4,40%); Glicose (32,60%), Xilose (22,20%); Arabinose (2,41%), Ácido Acético (2,06%)

Os dados indicam que o baixo conteúdo de lignina e elevado conteúdo de celobiose (glicose) apontam a braquiária como uma fonte promissora para produção de etanol. Estes dados também permitirão, para trabalhos futuros, a estimativa de rendimentos de etanol em função do teor de glicose na biomassa.

Neste trabalho foi possível atingir concentrações de aproximadamente 26 g/L de glicose a partir de uma solução de 100 g/L de biomassa pré-tratada, a qual contém aproximadamente 50 g/L em celulose. Vale ressaltar que essa hidrólise foi realizada somente em água como solvente, o que do ponto de vista industrial é muito interessante, pois não é utilizado sal, e consequentemente há redução de custo e não há geração de resíduos salinos.

Fermentação

A concentração de 26 g/L em glicose, obtida da hidrólise de braquiária, não é suficiente para a produção de etanol, pois a destilação torna-se economicamente inviável. Com o objetivo de investigar o efeito do meio (biomassa pré-tratada e hidrolisada enzimaticamente), ao hidrolisado obtido foi acrescentada glicose até se atingir concentração de 60 g/L e ensaios de fermentação foram realizados.

A Figura 2 apresenta as curvas de crescimento celular, consumo de glicose e produção de etanol durante o processo fermentativo.

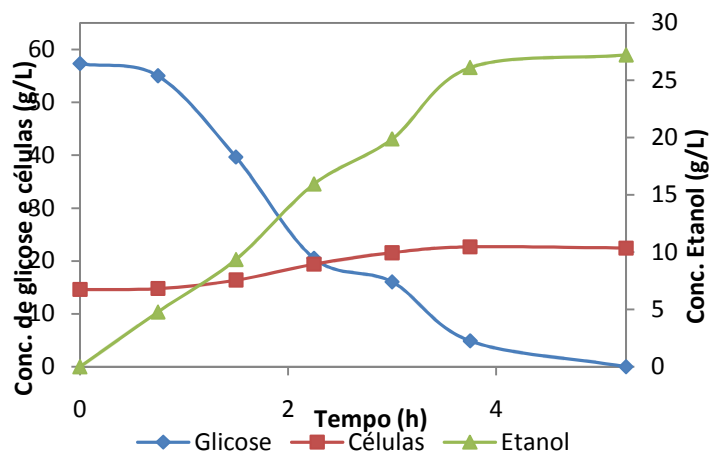


Figura 2 – Perfil de acompanhamento da fermentação, com o consumo de glicose, concentração celular e produção de etanol em função do tempo.

A fermentação teve a duração aproximada de 5 horas com uma fase Lag curta, o que mostra uma adaptação bem rápida dos microrganismos ao meio hidrolisado. A concentração final de etanol foi 27g/L.

A Figura 3 mostra o perfil de consumo de glicose e crescimento celular das fermentações comparativas utilizando o meio rico e os hidrolisados suplementado e não-suplementado com sais. É possível observar que não há variação significativa entre as velocidades de consumo de glicose entre os três meios, sugerindo que o hidrolisado, mesmo não suplementado, apresenta composição rica e adequada para a fermentação. Esses fatores contradizem a expectativa de que uma quantidade significativa de inibidores tivesse sido formada e desempenhasse um papel relevante na perda de eficiência do processo fermentativo (JING, ZHANG e BAO, 2009).

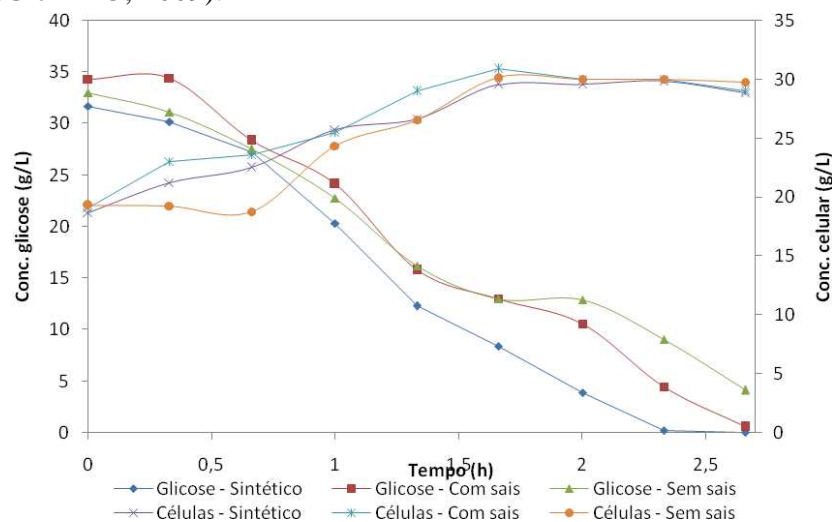
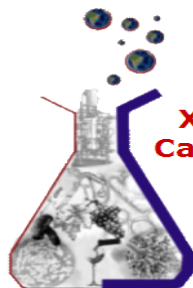


Figura 3– Perfil de acompanhamento de três diferentes fermentações (meio rico sintético, meio hidrolisado com suplementação de sais e sem suplementação) quanto ao consumo de glicose e viabilidade celular.

CONCLUSÕES



**XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011**

INAFERM 2011

O tratamento Organosolv utilizado nesse trabalho apresentou resultados satisfatórios, principalmente no que diz respeito à não inibição das etapas enzimática e fermentativa.

A etapa fermentativa apresentou resultados animadores, pois não houve inibição significativa do processo como um todo. Mesmo quando comparada diretamente com uma fermentação em meio rico sintético ou com o hidrolisado suplementado, a fermentação somente do hidrolisado apresentou velocidade semelhante de consumo de açúcares e crescimento celular.

O tempo total de fermentação a presença de uma tênue fase lag de crescimento e um aumento na concentração celular evidenciam uma adaptação rápida e eficiente do microrganismo ao meio hidrolisado, sem que haja inibição significativa por parte dos resíduos da quebra da hemicelulose e lignina. A concentração final de etanol, de 27g/L, para 60 g/L de glicose consumida, com um rendimento final de 88% do máximo teórico, demonstra que a utilização de forrageiras é promissora para produção de etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carvalho, D M.G.; Zervoudakis, J. T.; Cabal, L.S.; Paula, N. F.; Moraes, E.H.B.K.; Oliveira, A.A.; Koscheck, J.F.W. (2009). Fontes de energia em suplementos múltiplos para recria de bovinos em pastejo no período da seca: desempenho e análise econômica. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, n.3, p 760 – 733.

Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, Vol. 59, No. 2, pp. 257—268, 1987

Gouveia, R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. M. (2009). Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 32, n. 6.

Jing, X.; Zhang, X.; Bao, J. (2009) Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. *ApplBiochemBiotechnol*, n159, p. 696–707.

Jurado, M.; Prieto, A.; Martínez-Alcalá, A.; Martínez, A. T.; Martínez, M. J. (2009). Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6378 – 6384.

Margeot, A.; Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M.; Slade, R.; Monot, F. (2009). New Improvements for Lignocellulosic Ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 372 – 380.

Moreira, G.R.; Saliba, E.O.S.; Maurício, R.M.; Sousa, L.F.; Figueiredo, M.P.; Gonçalves, L.C.; Rodriguez, N.M. (2009). Avaliação da *Brachiariabrizantha* cv. marandu em sistemas silvipastoris. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol.61, n.3, pp. 706-713. ISSN 0102-0935.

Nigam, P.S.; Singh, A. 2011 Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, n 37, p. 52 – 68.

Pacheco, T. F. (2011) *Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?* Brasília (DF): Embrapa Agroenergia 6p. Circular Técnica 04 ISSN 2177-4420.

Silva, R.; Haraguchi, S. K.; Muniz, E. C.; Rubira, A. F. (2009). Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Quím. Nova*, vol.32, n.3, pp. 661-671. ISSN 0100-4042.

Soares, P. A.; Rossell, C.E.V. *Conversão da Celulose pela Tecnologia Organosolv*, São Paulo: NAIPPE/USP, vol. 3, 29p.