



II CONEPETRO

II CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE
PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
IV WORKSHOP DE ENGENHARIA DE PETRÓLEO

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO CELULÓSICO DO CAPIM COLONIÃO (*Panicum maximum*)

Ronaldo da Silva Maciel¹; Jefferson Flávio Reis²; Tarcísio Wunsch Júnior³; Monique Virões
Barbosa dos Santos⁴; Cristian Jacques Bolner de Lima⁵

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso / Campus Cáceres - Prof. Olegário Baldo -
ronaldo.silva.maciel@hotmail.com

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso / Campus Cáceres - Prof. Olegário Baldo -
jeff.reis@hotmail.com

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso / Campus Cáceres - Prof. Olegário Baldo -
tawuju@hotmail.com

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso / Campus Cáceres - Prof. Olegário Baldo -
monique.viraes@cas.ifmt.edu.br

⁵ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso / Campus Cáceres - Prof. Olegário Baldo -
cristian.lima@cas.ifmt.edu.br

RESUMO

O bioetanol vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento são conduzidos nos Estados Unidos e na Europa, basicamente em escalas experimentais de produção, mas seu sucesso poderá transformar o bioetanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, aproveitando a alta disponibilidade de resíduos orgânicos de diversas fontes. Nesse sentido, este projeto teve como objetivo desenvolver novas tecnologias para a obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos, que envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis para posterior fermentação e produção do bioetanol. A matéria prima utilizada, conhecida como capim colonião (*Panicum maximum*), foi coletada em terrenos baldios localizados na região de Cáceres – MT. Após processamento das amostras, os maiores resultados encontrados, em frascos agitados, para a produção de etanol foi de 24,5 g/L, a partir do capim colonião pré-tratado, utilizando carga enzimática de 30 FPU/g, relação sólido:líquido de 3:10 (g:mL) e 53 g/L de glicose inicial, a 30°C e 100 rpm.

Palavras chave: Bioenergia, Biocombustível, Hidrólise, Fermentação, *Panicum maximum*.

www.conepetro.com
.br

(83) 3322.3222

contato@conepetro.com.br

1. INTRODUÇÃO

O sistema energético é fortemente dependente de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), pois cerca de 80% do consumo mundial de energia se originam dessas fontes [GOLDEMBERG, 2008]. São combustíveis que permitem a existência dos meios de transporte rápidos e eficientes que temos hoje, bem como boa parte das atividades industriais. Acreditam-se, através de estudos e suposições que eles não vão durar mais do que algumas décadas: como combustíveis fósseis, as suas reservas são finitas, a segurança de abastecimento é problemática para os muitos países que os importam e o seu uso é a principal fonte dos gases que estão provocando mudanças climáticas e o aquecimento global. A procura por alternativas a energia fóssil, assim como, as disputas pelas últimas reservas fósseis, são estratégias de sobrevivência econômica. Nada mais racional do que produzi-los com base em matéria orgânica renovável (biomassa), da qual, no passado distante, os combustíveis fósseis foram produzidos pela natureza [ROSA, 2010]. Uma das opções é o bioetanol, um excelente substituto para a gasolina, o principal combustível usado em automóveis no mundo.

É neste cenário que pesquisadores em todo mundo buscam por alternativas energéticas que sejam capazes de atender a

demanda mundial investindo em pesquisas e produção de fontes alternativas de energia [ROSA, 2010], como a produção de etanol a partir da biomassa vegetal. A busca por combustíveis alternativos levou alguns países a optar por biocombustíveis devido principalmente a esse recente interesse na energia da biomassa, o que gerou combustíveis líquidos tais como o etanol produzido pela fermentação de açúcares (etanol de primeira geração) extraído, principalmente, da cana-de-açúcar, do milho, da beterraba, entre outras fontes [PEREIRA FILHO, 2012]. Outra via para a produção de etanol é pela hidrólise de biomassa celulósica com geração de glicose, a qual pode ser fermentada produzindo etanol (etanol de segunda geração). O Brasil ocupa posição de destaque em um mundo em que a segurança energética e a sustentabilidade ganharam grande importância graças à grande biodiversidade encontrada, onde se encontram uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais.

Sabe-se, que a tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção de etanol é considerada como uma ótima alternativa para atender à demanda mundial por combustíveis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver novas alternativas de produção de álcool combustível a partir de biomassa

celulósica de capim colônia (*Panicum maximum*).

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura comercial, linhagem PE34 (*Saccharomyces cerevisiae*, variedade *cerevisiae*), gentilmente, cedido pela Cooperativa Agrícola dos Produtores de Cana de Rio Branco (COPERB)/Mato Grosso. A cepa cedida, estava na forma liofilizada.

2.2. Reativação e Conservação das Leveduras

Adicionou-se 1 g da levedura comercial liofilizada em Erlenmeyer de 50 mL com 20 mL de volume de meio crescimento, descrito na Tabela 1 do item 2.4.4, a 30 °C, 100 rpm (incubadora rotativa) por 12 horas. Após este período, 1mL da levedura contida no Erlenmeyer, foi assepticamente transferida para o centro de cinco placa de Petri contendo meio sólido YEPD (2% glicose, 1% peptona, 1% Extrato de levedura e 2% de ágar), procedendo-se à semeadura com os espalhadores. As placas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 72 horas.

Uma colônia representativa da levedura foi semeada em tubo de ensaio contendo meio sólido inclinado YEPD e após

crescimento em estufa (30 °C durante 24 horas) foram mantidas a 4 °C, fazendo-se transferências quinzenais.

2.3. Capim colônia

O capim colônia foi coletado em terrenos baldios localizados na região de Cáceres – MT, demonstrados na Figura 1. Esta biomassa de composição lignocelulósica foi inicialmente secada a 60 °C em estufa ventilada por 12 horas. Em seguida, a mesma foi triturada e acondicionada em sistemas herméticos para posterior uso.



Figura 1: Capim Colônia em terreno baldio.

2.4. Pré-tratamento do capim colônia

2.4.1. Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido foi realizado para desorganizar a matriz lignocelulósica e remover a fração hemicelulósica. As condições para a realização do pré-tratamento

ácido foram as preconizada por Betancur e Pereira [2010], e detalhadas a seguir: concentração de H_2SO_4 , 1,09% (v/v); relação sólido-líquido 1:2,8 (g/ml); temperatura de 121 °C e tempo de exposição de 27 minutos em autoclave. A hemicelulose (fase aquosa) foi separada através de um procedimento de filtração simples do meio pré-tratado sendo a fase sólida denominada de celulignina, em função da sua composição majoritária em celulose e lignina. O hidrolisado, licor resultante deste processo (hemicelulose), foi descartado, uma vez, que a xilose (pentose) obtida, não tinha como ser fermentada pela levedura *Sacharomycea Cerevisiae*.

2.4.2. Pré-tratamento básico

Este pré-tratamento alcalino se faz necessário para aumentar a acessibilidade das enzimas às fibras celulósicas [BARCELOS et al., 2012]. Dessa forma, a celulignina foi submetida à deslignificação com uso de solução de NaOH a 4% (m/v), conforme a Tabela 2 do item 2.4, e submetida a tratamento térmico (121°C por 30 minutos) em autoclave. Posteriormente, sequências de lavagens com água destilada foram feitas, para a remoção da alcalinidade e extração da lignina residual, até que a água descartada fosse clara.

2.4.3. Pré-hidrólise enzimática

Após os pré-tratamentos químicos com ácido e base diluídos, foi realizada a etapa de pré-hidrólise enzimática, na qual a celulose pôde ser convertida a açúcares fermentáveis. Dessa forma, a celulignina pré-tratado alcalinamente e lavada com água destilada foi submetida à hidrólise enzimática, com uso de um preparado celulásico comercial (celulase a partir de *Aspergillus Niger*, Sigma Aldrich, USA) que continha atividade de 100 FPU/mL.

Os experimentos foram desenvolvidos utilizando diferentes valores de cargas enzimáticas e a relação sólido:líquido do capim pré-tratado (g:mL), conforme a Tabela 2 do item 2.4. A temperatura foi mantida em 50 °C, durante 12 horas para o capim colônio.

2.4.4. Pré-Inoculo e inoculo: composição do meio e condições de cultivo

A Tabela 1, apresenta a composição do meio de cultivo, adaptado de Neto et al. [2005], o qual foi utilizado no preparo do pré-inoculo e do inoculo para os ensaios de fermentação com as leveduras *Saccharomyce Cerevisiae*.

Tabela 1: Meio de crescimento utilizado para a levedura *Saccharomyce Cerevisiae*.

Nutrientes	Concentração (g/L)
Glicose	20
Extrato de levedura	2,5
$(NH_4) SO_4$	1,0
KH_2PO_4	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5

Os meios de cultura foram autoclavados por 15 minutos, a temperatura de 120°C. Além disso, toda a vidraria utilizada nos experimentos também foi esterilizada em autoclave durante 20 minutos, em seguida submetida a secagem em estufa.

O pré-inoculo foi preparado em Erlenmeyers de 50 mL, com 20 mL de volume de meio de crescimento, acrescentando uma suspensão de 2 mL de água destilada no meio sólido YEPD cultivado com a levedura. Os meios foram incubados a 30 °C por 4 horas, a 150 rpm.

2.5. Produção de etanol a partir do capim colônia pré-tratado

A fração sólida residual dos pré-tratamentos do capim colônia triturada possui um alto conteúdo de celulose, que pode ser utilizada para a obtenção de etanol por fermentação mediante técnicas que possibilitem o aproveitamento de glicose contida nos resíduos. Entre as técnicas que poderiam ser avaliadas, encontram-se a hidrólise enzimática, a qual foi utilizada.

Após 12 horas de pré-hidrólise enzimática do capim colônia triturado, a cinética do processo fermentativo foi avaliada em frascos de Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio de fermentação e 20 mL de pré-inoculo (item 2.4.4), que apresentava a mesma composição do meio de

propagação, com exceção da adição de glicose, que foi substituída pelo pré-hidrolisado da celulose, rico neste açúcar. A fermentação ocorreu por aproximadamente 48 horas, na temperatura de 30 °C, velocidade de agitação de 100 rpm, com amostragens a cada 4 horas. O crescimento celular, o consumo de substrato e a formação de produto foram acompanhados. Os parâmetros analisados foram a relação sólido: líquido (celulignina pré tratada alcalinamente) e carga enzimática, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Relação sólido:líquido (g:mL) e carga enzimática (FPU/g) para avaliar o crescimento celular, consumo de substrato e a produção de etanol durante processo fermentativo utilizando o capim colônia.

Experimentos	Condições	
	S:L (g/mL)	CE (FPU/g)
1	2:10	25
2	2:10	30
3	3:10	25
4	3:10	30

Onde: S:L: relação sólido:líquido, CE: carga enzimática.

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. Quantificação de microrganismos

O meio contendo a massa celular, após centrifugação em micro centrífuga a 3.000 rpm, foi separado da massa celular. O sedimentado foi posteriormente ressuspensionado



em água destilada e as células quantificadas pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm.

2.6.2. Determinação de etanol e açúcares

A análise do etanol formado foi realizada utilizando-se o método espectrofotométrico baseado na oxidação do etanol a ácido acético através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro. A determinação de glicose, a partir do meio hidrolisado, foi através do método do ácido dinitrosalicílico [MILLER 1959].

2.6.3. Produtividade

A produtividade da produção de etanol, durante os experimentos de fermentação, foi calculada pela Equação 1:

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f}$$

[1]

Q_P : Taxa de produtividade [g/(L.h)]; P_f : Concentração do produto (g/L) no tempo t_f de reação; P_0 : Concentração do produto (g/L) no início da reação; t_f : Tempo de fermentação em (horas).

2.6.4. Rendimento

O cálculo do rendimento de substrato em produto foi efetuado, utilizando-se a Equação 2.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad [2]$$

$Y_{P/S}$: Fator de rendimento do produto (g/g); P_f : Concentração de produto ao final da reação (g/L); P_0 : Concentração de produto no início da reação (g/L); S_f : Concentração de substrato ao final da reação (g/L); S_0 : Concentração de substrato no início da reação (g/L).

2.6.5. Eficiência de Fermentação

A eficiência de fermentação alcoólica (E_f) pode ser obtida pelo rendimento de glicose em etanol sobre o rendimento máximo (0,511), conforme mostrado pela Equação 3.

$$E_f(\%) = \frac{\left[\frac{(Etanol_{final} - Etanol_{inicial})}{(Glicose_{final} - Glicose_{inicial})} * 100 \right]}{0,511} \quad [3]$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados dos processos fermentativos

Visando-se definir uma condição que resultasse em elevadas concentrações de etanol a partir do processo fermentativo realizado em Shaker, realizaram-se 04 experimentos (Tabela 3), variando-se a carga

enzimática e relação sólido:líquido do capim colônião pré-tratado (g:mL), assim como as respectivas respostas (biomassa, açúcar redutor e produção de etanol).

Tabela 3: Experimentos fermentativos, avaliando as variáveis relação sólido: líquido e a carga enzimática, bem como as respostas concentração celular, consumo de glicose e produção de etanol a partir do capim colônião.

Ex	Condições		Respostas		
	S:L	CE	B	Ar	Et
1	2:10	25	2,8	40	15,5
2	2:10	30	2,4	35	17,8
3	3:10	25	3,1	50	19,5
4	3:10	30	3,2	53	24,5

Onde: Ex (experimentos); S:L (relação sólido:líquido em g/mL), CE (carga enzimática em FPU/g), B (biomassa em g/L); Ar (açúcar redutor em g/L) Et (etanol em g/L).

Os ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita na seção 2.5, com um tempo de pré-hidrólise enzimática de 12 h.

Na sequência, adicionou-se meio de cultivo, descrito no item 2.3.4, com exceção da glicose. Após o pré-tratamento enzimático, verificou-se que o experimento 04, utilizando 30 FPU/g e relação sólido: líquido de 3:10 (g:mL), atingiu cerca de 53 g/L de glicose e 24,5 g/L de etanol em 48 horas de fermentação, ou seja, a maior concentração de etanol foi obtida para a mais elevada relação sólido: líquido e carga enzimática.

Assim, a relação sólido: líquido e a carga enzimática, possivelmente, são fatores essenciais para a maior produção de etanol, uma vez que o aumento no teor de sólidos associado ao aumento da carga enzimática resultou em um aumento nas concentrações de etanol.

O aumento da relação sólido: líquido associada ao aumento da carga enzimática fez com que a eficiência de hidrólise fosse maior e, conseqüentemente, gerou uma maior concentração inicial de glicose disponível no meio, pois de acordo com Barcelos et al. [2012], o pré-tratamento alcalino é extremamente importante para aumentar a acessibilidade das enzimas às fibras celulósicas [BARCELOS et al., 2012].

Kim et al. [2008] analisaram o processo de fermentação, e da mesma maneira, observaram que a eficiência de fermentação depende da concentração inicial de glicose produzida durante a hidrólise enzimática.

Na Figura 2, observa-se, o perfil cinético do processo de hidrólise enzimática de celulose a partir de capim colônião pré-tratado em frascos agitados, utilizando a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, nas seguintes condições operacionais (melhores resultados experimentais obtidos): relação sólido líquido 3:10 (g:mL), 30 FPU/g.

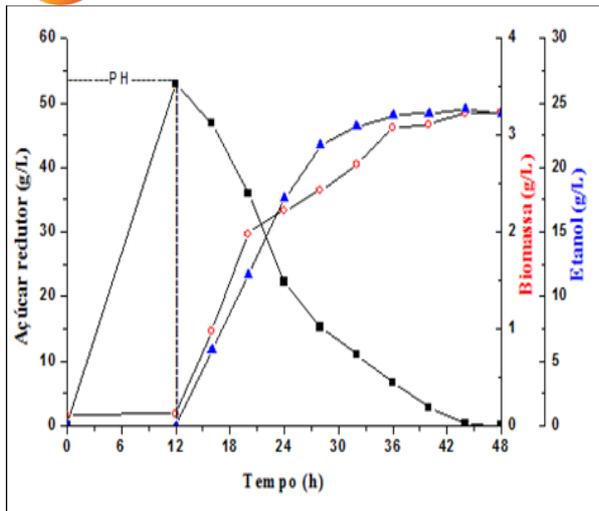


Figura 2: Perfil cinético do processo de hidrólise enzimática de celulose e fermentação em frascos agitados a partir de capim colônio pré-tratado, utilizando a levedura *Sacharomyces cerevisiae*, na melhor condição estudada: relação sólido líquido de 3:10 (g:mL) e carga enzimática de 30 FPU/g. P.H.= pré-hidrólise enzimática.

Nota-se, no experimento acima, realizado em frascos agitados, que a concentração inicial de glicose, 53 g/L, foi convertida em uma concentração final de 24,5 g/L de etanol no período de 48 horas de fermentação, sem controle pH, na temperatura de 30°C e agitação orbital de 100 rpm. De acordo com Cazetta et al. [2007], o tempo de fermentação é um fator decisivo na fermentação, pois a concentração de etanol pode aumentar em até 60% de 24 para 48 h.

Vale ressaltar que a maior produtividade volumétrica obtida neste processo foi de 0,77 g/L.h, com um tempo de fermentação de aproximadamente 28 horas. Já o rendimento atingido no final do processo foi de 46,2%

(muito próximo do valor teórico que é de 51,1%), atingindo uma eficiência no processo fermentativo de 90,4%.

O presente estudo apresentou os melhores resultados de produção de etanol de lignocelulósicos pela *Saccharomyces cerevisiae*, atingindo a concentração de etanol de 24,5 g/L, valor distante ao obtido por Vásquez [2007], que atingiu 70 g/L de etanol a partir de processo SSF de bagaço de cana sob condições semelhantes, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

As maiores diferenças entre os resultados obtidos no presente estudo, quando comparados com Vásquez [2007], provavelmente, está associado a composição do meio, no qual foram utilizados meios de fermentação com tampão-citrato e na temperatura de fermentação em torno de 37°C, respectivamente, o que possibilitou uma hidrólise mais eficiente no experimento com a levedura, pois a temperatura se mantinha mais próxima da ótima para a atividade de celulasas (50°C), além da presença do tampão possibilitar uma maior estabilidade do pH.

4. CONCLUSÕES

As melhores condições experimentais apontadas pelas hidrólises enzimáticas realizadas foram: relação sólido: líquido de 3:10 (g:mL) e carga enzimática de 30 FPU/g.



II CONEPETRO

II CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE
PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
IV WORKSHOP DE ENGENHARIA DE PETRÓLEO

As concentrações máximas atingidas foram de 53 g/L de glicose inicial, 24,5 g/L de etanol e produtividade volumétrica de 0,77 g/L.h, com um tempo de fermentação de aproximadamente 28 horas, na temperatura de 30°C e velocidade de agitação de 100 rpm, em frascos agitados (sem controle de pH).

O rendimento obtido no final do processo foi de 46,2%, atingindo uma eficiência no processo fermentativo de 90,4%.

Verificou-se que o aumento da carga enzimática, nos testes fermentativos, aumentou a produção de etanol.

5. AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos vão para o Programa Institucional de Iniciação ao Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI/CNPq) e para o Programa de Iniciação Científica da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Mato Grosso (FAPEMAT), pelo suporte financeiro.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA, N. *The Essentialness of Delignification on Enzymatic Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse Cellulignin for Second Generation Ethanol Production*. Waste and Biomass Valorization, v. 3, p. 255-260, 2012.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA, Jr. N. *Sugarcane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pre-treatment optimization*. Electronic Journal of Biotechnology, 2010.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. *Fermentation of molasses by Zymomonas mobilis: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production*. Bioresource Technology, v. 98, p. 2824-2828, 2007.

GOLDEMBERG, J. *Em Bioenergia no Estado de São Paulo*. NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. *Imprensa Oficial do Estado de São Paulo*. São Paulo, 2008, p. 110.

KIM, H. M, KANG, I. S, WANG, B, LEE, J. Y., *Interannual variations of the boreal summer intraseasonal variability predicted by ten atmosphere-ocean coupled models*. Clim Dyn, v. 30, p. 485–496, 2008.

MILLER, G. L. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Anal. Chem., v.31, p. 426–428, 1959.

NETO, D. C.; BUZATO, J. B.; PEDRINE, M. A.; CELLIGOI, C.; OLIVEIRA, M. R. *Otimização da produção de etanol por Zymomonas mobilis na fermentação do*

melaço de cana-de-açúcar. Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 26, n. 1, p. 17-22, 2005.

PEREIRA FILHO, I. A.; PARRELLA, R. A. C.; MOEREIRA, J. A. A.; MAY, A., SOUZA, V. F.; CRUZ, J. C. *Avaliação de cultivares de sorgo sacarino [Shorgum bicolor (L.) Moench] em diferentes densidades de semeadura visando à obtenção de etanol*. Congresso Nacional de Milho e Sorgo, p. 29, 2012.

ROSA, C. T. In: *Biodiesel e inclusão social, a questão da geração de renda para agricultura familiar a partir da produção sustentável de oleagenosas*, 2010, p. 10. Tese de graduação, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC.

VÁSQUEZ, M. P. In: *Desenvolvimento de processo de hidrolise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar*, 2007, p. 154. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ.

