



**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSOCIADA  
À TECNOLOGIA DE MEMBRANAS NA  
OBTENÇÃO DE XAROPES DA  
BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Raul Alves de Oliveira**

**Rodrigo da Rocha Olivieri de Barros**

**Projeto Final de Curso**

**Orientadores**

**Suely Pereira Freitas, D.Sc**

**Elba Pinto da Silva Bon, Ph.D**

**Janeiro de 2010**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSOCIADA À  
TECNOLOGIA DE MEMBRANAS NA OBTENÇÃO DE  
XAROPES DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

*Raul Alves de Oliveira*

*Rodrigo da Rocha Olivieri de Barros*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Graduação em Engenharia Química.

Aprovado por:

---

Leda Maria Fortes Gottschalk, D.Sc.

---

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

---

Carla Cristina Costa Macêdo da Silva, M.Sc.

Orientado por:

---

Suely Pereira Freitas, D.Sc.

---

Elba Pinto da Silva Bon, Ph.D.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Janeiro de 2010

Oliveira, Raul Alves.

Barros, Rodrigo da Rocha Olivieri.

Hidrólise Enzimática Associada à  
Tecnologia de Membranas na Obtenção de  
Xaropes da Biomassa de Cana-de-Açúcar /  
Raul Alves de Oliveira e Rodrigo da Rocha  
Olivieri de Barros - Rio de Janeiro:  
UFRJ/EQ, 2010

xviii, 63p.; il,

(Projeto Final) – Universidade Federal de  
Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.

Orientadores: Suely Pereira Freitas e Elba  
Pinto da Silva Bon.

1.Hidrólise enzimática. 2.Cana-de-açúcar.  
3.Tecnologia de membranas. 4. Projeto Final.  
(Graduação – UFRJ/EQ). 5.Suely Pereira Freitas  
e Elba Pinto da Silva Bon. I.Título.

*Aos nossos pais e amigos pela força e  
incentivo ao longo desta jornada cheia de  
alegrias e vitórias*

*“A sabedoria não se transmite, é preciso  
que nós a descubramos, fazendo uma  
caminhada que ninguém pode fazer em  
nosso lugar e que ninguém nos pode  
evitar, porque a sabedoria é uma maneira  
de ver as coisas”*

*(Marcel Proust)*

## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a todos que contribuíram para que nós chegássemos até aqui.

Primeiramente, gostaríamos de agradecer às nossas orientadoras, Professora Suely Pereira Freitas e Professora Elba Pinto da Silva Bon por nos darem a oportunidade para a concretização deste trabalho. Obrigado pela confiança, por acreditar no nosso potencial e também pelos conselhos e críticas que nos fizeram amadurecer profissionalmente e como pessoas.

À doutora Leda Gottschalk pelo incentivo, dedicação e auxílio, sempre estando prontamente disposta a nos ajudar em todas as situações requeridas.

A toda equipe que faz parte do Laboratório de Tecnologia Enzimática, no Instituto de Química, Departamento de Bioquímica da UFRJ por nos ajudarem nos procedimentos diários e como amigos: André, Ângela, Artur, Ayla, Bárbara, Bibiano, Brunhilde, Débora, Felipe, Gabriel, Hugo, Letícia, Leonardo, Lucas, Mallú, Mariana, Maria Antonieta, Neuza, Rafael, Raquel, Ricardo, aos colegas Carlos e Fábio do Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Química da UFRJ e às alunas Eliene e Marcela do Laboratório de Processamento de Matérias-primas Vegetais da Escola de Química da UFRJ.

Aos nossos amigos de graduação, padrinhos e demais professores.

Agradecemos ainda aos nossos familiares, sobretudo pais irmãos e por nos ajudarem e nos apoiarem em todas as nossas decisões.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Graduação em Engenharia Química.

## **HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ASSOCIADA À TECNOLOGIA DE MEMBRANAS PARA A OBTENÇÃO DE XAROPES DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Raul Alves de Oliveira

Rodrigo da Rocha Olivieri de Barros

Janeiro, 2010

Orientadores: Prof.(a) Suely Pereira Freitas

Prof.(a) Elba Pinto da Silva Bon

O Brasil possui grande vantagem para a produção e comercialização de etanol de segunda geração em relação a outros países, pois existem grandes quantidades excedentes de bagaço e palha de cana, estimada em 12% e 50 %, respectivamente. O uso destes materiais permitiria aumentar a produção de etanol sem expandir a área plantada de cana. Entretanto é necessário aperfeiçoar o processo de pré-tratamento e sacarificação destes materiais para obter xaropes de glicose com altos rendimentos. Este trabalho avaliou a hidrólise do bagaço *in natura*, do bagaço tratado por moagem, do bagaço tratado termicamente com vapor e daquele tratado por explosão a vapor. Foi observado que o bagaço tratado por explosão a vapor e o bagaço moído apresentaram os maiores rendimento em glicose após 48 horas de hidrólise enzimática. As enzimas foram produzidas pelos fungos *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori*. Todos os ensaios de hidrólise foram realizados com um *pool* enzimático apresentando uma relação BGU/FPU igual a quatro, a 50°C e 200 RPM. Análises estatísticas, definiram as condições ótimas de concentração de substrato e concentração de enzima como sendo de 100 g/L e 10 FPU/g. Estas condições foram utilizadas na integração do processo de hidrólise da biomassa com a separação dos xaropes obtidos, utilizando membranas de microfiltração e ultrafiltração, e para ensaios de batelada alimentada. Estes ensaios de hidrólise foram realizados utilizando bagaço tratado termicamente com vapor, pela sua maior disponibilidade no laboratório. Avaliou-se o fator de concentração volumétrico (FCV) a fim de recuperar as enzimas e separar a o xarope de glicose formado nas primeiras 14 horas de operação. Os resultados mostraram que para um FCV igual a quatro obteve-se uma recuperação da atividade de FPase e de  $\beta$ -glicosidase de 77,9 % e 60,8 %, respectivamente. Porém, para este fator não houve separação da glicose durante a ultrafiltração. Já para um FCV igual a 11, a recuperação da atividade enzimática de FPase e  $\beta$ -glicosidase foi 22,4 % e 43,5 %, respectivamente. No entanto para este FCV obteve-se uma melhor separação da glicose. Ao utilizar as enzimas recuperadas numa segunda batelada alimentada com uma carga de enzimas de 5 FPU/g e mantendo a concentração de substrato inicial de 100g/L, somado ao bagaço da primeira batelada, gerou-se um ganho de 10 % em massa de glicose / FPU gasto para um FCV igual a 11, e um ganho de 61 % para um FCV igual a quatro.

**PALAVRAS-CHAVE:** hidrólise enzimática da biomassa, tecnologia de membranas, enzimas celulolíticas, bagaço de cana-de-açúcar, bioetanol.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	3
2.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	3
2.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
3.1. <i>Enzimas Celulolíticas e Acessórias</i> .....	4
3.1.1. Endoglicanases (EC 3.2.1.4).....	5
3.1.2. Exoglicanases (EC 3.2.1.91) .....	5
3.1.3. $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21).....	6
3.1.4. Xilanases.....	6
3.1.5. Mercado das Enzimas.....	7
3.2. <i>Cinética Enzimática</i> .....	7
3.3. <i>Estrutura da Biomassa</i> .....	9
3.3.1. Celulose .....	10
3.3.2. Hemicelulose .....	11
3.3.3. Lignina .....	12
3.4. <i>O Bagaço de cana-de-açúcar</i> .....	13
3.4.1. Pré Tratamento .....	14
3.4.2. Tratamento Térmico a Vapor .....	15
3.4.3. Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana .....	15
3.5. <i>Processos de Separação por Membranas</i> .....	17
3.5.1. Microfiltração.....	20
3.5.2. Ultrafiltração .....	21
3.5.3. Membranas associadas a biorreatores .....	21

4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4.1. <i>Microrganismos, propagação e manutenção</i> .....	22
4.2. <i>Produção de enzimas celulolíticas</i> .....	22
4.3. <i>Concentração de Enzimas celulolíticas</i> .....	24
4.4. <i>Preparo das misturas enzimáticas</i> .....	24
4.5. <i>Caracterização da Biomassa da cana Pré-Tratada</i> .....	24
4.6. <i>Ensaio enzimáticos</i> .....	25
4.6.1. <i>Atividade de endoglicanases (CMCase)</i> .....	25
4.6.2. <i>Determinação da atividade de FPase</i> .....	26
4.6.3. <i>Determinação da atividade de <math>\beta</math>-glicosidase</i> .....	26
4.6.4. <i>Determinação da atividade de xilanase</i> .....	27
4.7. <i>Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar</i> .....	28
4.7.1. <i>Dosagem da concentração de açúcares redutores totais</i> .....	28
4.7.2. <i>Dosagem da concentração de glicose</i> .....	28
4.8. <i>Análise do Substrato</i> .....	29
4.9. <i>Ensaio estatísticos</i> .....	29
4.10. <i>Integração das etapas de hidrólise e separação por membranas em escala semi-piloto</i> .....	30
4.10.1. <i>Ensaio de hidrólise em reator agitado e separação</i> .....	30
4.10.2. <i>Batelada Alimentada em escala Piloto</i> .....	33
4.10.3. <i>Limpeza das membranas</i> .....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1. <i>Caracterização do bagaço de cana pré-tratado termicamente</i> .....	35
5.2. <i>Cinéticas de conversão</i> .....	36
5.3. <i>Avaliação estatística</i> .....	37
5.4. <i>Rendimentos em glicose</i> .....	46
5.5. <i>Perfis de Filtração</i> .....	47

5.6. <i>Balanços materiais</i> .....	50
5.6.1. Batelada Alimentada .....	51
5.7. <i>Comparação dos resultados principais</i> .....	51
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Ação conjunta das endoglicanases, exoglicanases e $\beta$ -glicosidases. ....	5
Figura 3.2. Representação da estrutura da biomassa: (a) microfibrilas, (b) cadeia $\beta$ -1,4, (c) pontes de hidrogênio. ....	10
Figura 3.3. Representação da cadeia polimérica da celulose constituída de resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas $\beta$ -1,4; celobiose, a unidade fundamental da estrutura. ....	10
Figura 3.4. Esquema das regiões cristalinas e amorfas da celulose. ....	11
Figura 3.5. Composição do O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (hemicelulose de angiosperma). Os números indicam os átomos de carbono que sofreram substituição. Ac: Grupo Acetil; $\alpha$ -4-O-Me-GlcA: ácido $\alpha$ -4-O metilglicurônico. (BON <i>et al.</i> , 2008). ....	12
Figura 3.6. Estrutura da Lignina. ....	13
Figura 3.7. Alcoóis precursores majoritários da lignina. ....	13
Figura 3.8. Modo de ação do complexo celulósico. ....	16
Figura 3.10. Esquema simplificado de filtração em meios porosos. ....	18
Figura 4.1. Produção de enzimas celulolíticas em fermentador utilizando a cepa de <i>T.reesei</i> Rut C30. ....	23
Figura 4.2. Equipamento YSI 2700, utilizado para quantificação de glicose nas amostras obtidas durante os testes de hidrólise enzimática e também para a quantificação da atividade enzimática de $\beta$ -glicosidases. ....	27
Figura 4.3. Vaso de mistura com agitador do tipo turbina e volume útil de 4,5L. ....	31
Figura 4.4. Modulo de membranas utilizado durante os experimentos de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado termicamente a vapor. ....	31

Figura 4.5. Estrutura de membranas do tipo fibra oca (PAM Membranas) .....	32
Figura 4.6. Fluxograma simplificado do processo de hidrólise enzimática associada à tecnologia de membranas. ....	32
Figura 5.1. Caracterização do bagaço de cana pré-tratado termicamente a vapor. ....	35
Figura 5.2. Perfil cinético de glicose gerada para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 25 g de bagaço/L e concentração de enzima variando de 5-20 FPU/g de bagaço.....	36
Figura 5.3. Perfil cinético de glicose gerada para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 10 FPU/g de bagaço e concentração de bagaço variando de 25-100 g de bagaço/L. ....	37
Figura 5.4. Gráfico de Pareto para a concentração de glicose em função da concentração de substrato( $x_1$ ), carga de enzimas( $x_2$ ) e granulometria( $x_3$ ). ....	40
Figura 5.5. Gráfico de Pareto para o rendimento em glicose em função da concentração de substrato( $x_1$ ), carga de enzimas( $x_2$ ) e granulometria( $x_3$ ). ....	41
Figura 5.6. Comparação entre os valores previstos (modelo matemático) e os valores experimentais para a concentração de glicose em 48h de ensaio.....	42
Figura 5.7. Comparação entre os valores previstos (modelo matemático) e os valores experimentais para o rendimento em glicose em 48h de ensaio.....	42
Figura 5.8. Superfícies de resposta para a concentração de glicose em função da concentração de substrato e da carga de enzimas em 48h de ensaio de hidrólise. ....	44
Figura 5.9. Superfícies de resposta para a concentração de glicose em função da concentração de substrato e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise. ....	44
Figura 5.10. Superfícies de resposta para a concentração de glicose em função da carga de enzimas e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise.....	44
Figura 5.11. Superfícies de resposta para o rendimento em glicose em função da concentração de substrato e da carga de enzimas em 48h de ensaio de hidrólise. ....	45

Figura 5.12. Superfícies de resposta para o rendimento em glicose em função da concentração de substrato e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise. ....	45
Figura 5.13. Superfícies de resposta o rendimento em glicose em função da carga de enzimas e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise. ....	46
Figura 5.14. Rendimento em glicose para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 25 g de bagaço/L e concentração de enzima variando de 5-20 FPU/g de bagaço.....	46
Figura 5.15. Rendimento em glicose para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 10 FPU/g de bagaço e concentração de bagaço variando de 25-100 g de bagaço/L.....	47
Figura 5.16. Fluxo do permeado na microfiltração para diferentes valores de pressão em regime estacionário.....	47
Figura 5.17. Fluxo do permeado na ultrafiltração para diferentes valores de pressão em regime estacionário.....	48
Figura 5.18. Fluxo do permeado na microfiltração a 1,4 bar ao longo do tempo de operação.....	49
Figura 5.19. Fluxo do permeado na ultrafiltração a 1,4 bar ao longo do tempo de operação.....	49
Figura 5.20. Ganho relativo em gramas de glicose por unidades de papel de filtro para a hidrólise enzimática do bagaço de cana tratado termicamente a vapor em processos do tipo batelada alimentada com recuperação de enzimas por UF.....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Meio de fermentação de Mandels modificado (Mandels <i>et al.</i> , 1969). ....	22
Tabela 4.2. Meio de fermentação de Breccia modificado (Breccia <i>et al.</i> , 1995). ....	24
Tabela 4.3. Matriz do planejamento estatístico para as variáveis codificadas .....	30
Tabela 4.4. Níveis selecionados para as variáveis independentes .....	30
Tabela 5.1. Ensaio de planejamento experimental com valores reais e suas respectivas respostas em termos de concentração de glicose e rendimento. ....	38
Tabela 5.2. Efeitos estimados da concentração de substrato ( $x_1$ ), carga de enzimas ( $x_2$ ) e granulometria ( $x_3$ ), bem como suas interações sobre a concentração de glicose em 48h de ensaio considerando um limite de confiabilidade de 90% ( $p < 0,10$ ). ....	39
Tabela 5.3. Efeitos estimados da concentração de substrato ( $x_1$ ), carga de enzimas ( $x_2$ ) e granulometria ( $x_3$ ), bem como suas interações sobre o rendimento em glicose em 48h de ensaio considerando um limite de confiabilidade de 90% ( $p < 0,10$ ). ....	39
Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose e para o rendimento em glicose em 48h de ensaio. ....	43
Tabela 5.5. Balanços materiais para as frações obtidas após 14h de hidrólise utilizando o módulo de separação MF/UF. ....	50
Tabela 5.6. Comparação entre batelada simples e batelada alimentada na hidrólise enzimática do bagaço de cana tratado termicamente com vapor. ....	51

## APÊNDICES

APÊNDICE A – Regeneração do fluxo do permeado através de diferentes procedimentos de limpeza das membranas.....	61
APÊNDICE B – Caracterização de diferentes materiais de origem lignocelulósica, pré-tratados ou não por diferentes metodologias (OLIVEIRA, 2009).....	62
APÊNDICE C – Perfis de rendimento em glicose na hidrólise enzimática de diferentes materiais de origem ligno-celulósica pré-tratados ou não, por diferentes metodologias (OLIVEIRA, 2009).....	63

## NOMENCLATURA

### LETRAS LATINAS

DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico	
A	Área total de filtração	$L^2$
CMCase	Atividade em carboximetilcelulose	$mol/t.L^3$
FPase	Atividade em papel de filtro	$mol/t.L^3$
CMC	Carboximetilcelulose	
$x_2$	Carga de enzimas	$mol/t.M$
CBH	Celobiohidrolases ou CMCase	$mol/t.L^3$
c	Concentração da suspensão	M/M
E	Concentração de enzima	$mol/L^3$
$x_1$	Concentração de substrato	$M/L^3$
ES	Concentração do complexo enzima-substrato	$mol/L^3$
S	Concentração de substrato	$mol/L^3$
P	Concentração de produto	$mol/L^3$
M	Concentração molar	$mol/L^3$
$x_g$	Constante Gravitacional	$L/t^2$
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	
Da	Dalton	M
$\rho$	Densidade do fluido	$M/L^3$
$\rho_s$	Densidade do sólido	$M/L^3$

$L_2$	Espessura da torta	L
$L_1$	Espessura do meio filtrante	L
g	Gramas	M
$x_3$	Granulometria	L
L	Litro	$L^3$
m	Massa	M
MF	Microfiltração	
$K_2$	Permeabilidade da torta	$1/L^2$
$K_1$	Permeabilidade do meio filtrante	$1/L^2$
D-, L-	Prefixos Enantioméricos de Substâncias Químicas	
PSM	Processos de Separação por Membranas	
$\Delta P_2$	Queda de pressão na torta	$M/L.t^2$
$\Delta P_1$	Queda de pressão no meio filtrante	$M/L.t^2$
$R_{mf}$	Resistência do meio filtrante	$L^{-1}$
RPM	Rotações por Minuto	$t^{-1}$
BGU	Unidade de $\beta$ -glicosidase	$mol/t.L^3$
UI	Unidade internacional	$mol/t.L^3$
FPU	Unidade de Papel de Filtro	$mol/t.L^3$
bar	Unidade de pressão	$M/L.t^2$
$^{\circ}C$	Unidade de temperatura celsius	T
UF	Ultrafiltração	

Q	Vazão volumétrica do filtrado	$L^3/t$
$V_m$	Velocidade Máxima de Reação	$mol/t.L^3$
J	Velocidade superficial do fluido ou fluxo	$L^3/L^2.t$
Vol., v ou V	Volume	$L^3$

### LETRAS GREGAS

$k_{-1}$	Constante cinética de dissociação de [ES]	$t^{-1}$
$k_1$	Constante cinética de formação de [ES]	$L^3/mol.t$
$k_2$	Constante cinética de formação de [P]	$t^{-1}$
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten	$mol/L^3$
$\varepsilon$	Porosidade	
$\alpha_f$	Resistividade da torta	L/M
$\alpha$ ou alpha	Significância estatística	
$\beta$	Tipo de ligação química	
$v$	Velocidade de reação	$mol/t.L^3$
$\mu$	Viscosidade do fluido	M/L.t

### GRUPOS ADIMENSIONAIS

FCV	Fator de Concentração Volumétrico	
t(n)	Nº de Graus de Liberdade para a Distribuição t	
$F_{calc}$	Valor Calculado para a Distribuição de Probabilidade F	

$F_{\text{tab}}$	Valor Tabelado para a Distribuição de Probabilidade F
$\Delta_{\text{abs}}$	Varição de Absorvância
vvm	Volume de Ar por Volume de Meio

## 1. INTRODUÇÃO

O mundo está atualmente envolvido em uma crise energética que desafia a nossa capacidade de manter padrões atuais de vida. Com a demanda acelerada por combustíveis fósseis, principalmente relacionados ao crescente desenvolvimento de países como Índia, Brasil e China concomitante a escassez dos recursos fósseis que regem as bases fundamentais dos meios de transporte atuais, energia e sistemas agrícolas estão sendo questionados. Por razões técnicas, econômicas e ambientais os biocombustíveis têm se mostrado como fontes energéticas mais viáveis do que outras fontes renováveis (como a energia solar e a energia eólica, por exemplo), que poderia servir de imediato a substituição dos produtos petrolíferos (HIRA *et al.*, 2009).

No contexto da bioenergia, a produção de biocombustíveis líquidos visa atender em particular às necessidades de transporte veicular. Para esses fins, além dos biocombustíveis, ainda não existem alternativas renováveis com maturidade tecnológica e viabilidade econômica para implantação em escala comercial.

No processo de produção de bioetanol, a biomassa lignocelulósica é hidrolisada pela ação de enzimas celulolíticas, gerando xaropes ricos em glicose e outros açúcares fermentáveis pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para a produção de álcool combustível. Altos níveis de conversão em glicose são necessários para que a etapa de geração do álcool seja eficiente. E para a obtenção de xaropes com alto teor de glicose e rendimentos de hidrólise satisfatórios, torna-se necessária, a otimização das etapas envolvidas em todo o processo como: o pré-tratamento da biomassa, a produção de enzimas, a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica (BON *et al.*, 2008).

A hidrólise enzimática é uma das etapas mais importante na produção do bioetanol e envolve vários parâmetros que afetam o teor de açúcares produzidos e o rendimento do processo, dentre eles estão: a concentração de substrato e a granulometria do substrato, a carga de enzimas, dentre outros. Esses xaropes podem contribuir de forma importante para aumentar a produção de etanol sem a necessidade de aumento da área plantada de cana-de-açúcar. (REVISTA BRASILEIRA DE BIOENERGIA, 2009)

Outra etapa crucial da produção de etanol de segunda geração é a produção das enzimas hidrolíticas. Por razões econômicas, estas devem ser produzidas na própria

planta para minimizar os custos de transporte, estabilização e armazenamento, podendo ou não passar por uma etapa de concentração caso haja necessidade. Diversos trabalhos utilizam o processo de ultrafiltração para concentrar estas enzimas (ROSEIRO *et al.*, 1993; TAKAC, *et al.*, 2000; GOTTSCHALK, 2002; KRSTIC *et al.*, 2007 e LI *et al.*, 2006).

O crescente aumento do mercado de membranas no país associado aos avanços em pesquisas tecnológicas nesta área incentiva ao uso da tecnologia de membranas em processos de separação e/ou concentração (HABERT, *et al.* 2006).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Geral**

Aumentar o rendimento do processo de hidrólise enzimática da biomassa através da otimização de parâmetros da etapa de sacarificação da biomassa e do reaproveitamento das enzimas envolvidas neste processo.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito do pré-tratamento do bagaço no rendimento de hidrólise, em conjunto com a variação da carga de enzima, concentração e granulometria do bagaço.

Separação/recuperação dos biocatalisadores, integrando o processo de separação por membranas à hidrólise enzimática, utilizando um módulo de ultrafiltração, com a finalidade de reduzir a demanda por carga de enzimas.

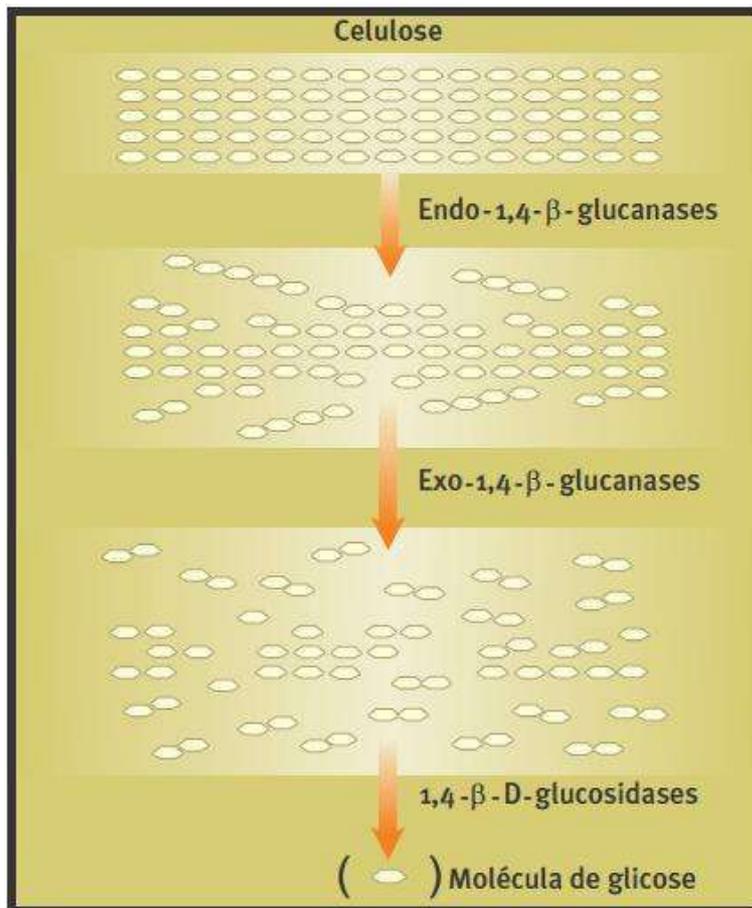
### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Enzimas Celulolíticas e Acessórias

As enzimas celulolíticas, também conhecidas como celulases, reconhecem as ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 e as hidrolisam, o que mostra seletividade em relação a outros diferentes sítios do substrato. Dependendo do seu sítio de ação, as celulases são classificadas em três grupos: exoglicanases/celobiohidrolases (CBH) (1,4-  $\beta$ -D-glicano-celobiohidrolase, EC. 3.2.1.91), endoglicanases (1,4- $\beta$ -D-glicano-4-glicano-hidrolase, EC 3.3.1.4), e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) (GHOSH & GHOSH, 1993).

A atuação das enzimas celulolíticas é iniciada por meio da ação conjunta de três grupos de enzimas denominadas celulases: (1) as endo-1,4- $\beta$ -glicanases, que quebram a longa molécula de celulose, ao acaso, em variados fragmentos; (2) as exo-1,4- $\beta$ -glicanases, que dividem os fragmentos em pedaços ainda menores; e (3) as 1,4- $\beta$ -D-glicosidases, que degradam tais pedaços, liberando moléculas simples de glicose (figura 3.1). Já a hemicelulose, por ter estrutura química diferente, requer um conjunto de enzimas mais complexo (as hemicelulases) para sua degradação. Tais enzimas incluem xilanases, que rompem ligações entre moléculas de xilose; mananases, que quebram ligações entre moléculas de manose; glucuronidases, que rompem ligações entre ácidos urônicos e moléculas de açúcares (como xilose e manose), dentre outras.

No entanto, na determinação da atividade celulolítica de preparações brutas não é possível separar as atividades de endo- e exoglicanases, sendo as preparações caracterizadas de acordo com os substratos utilizados para a quantificação da atividade enzimática. Por exemplo, se na reação enzimática utiliza-se como substrato o papel de filtro, diz-se que a dosagem feita é de atividade FPase (*Filter paper activity*). O mesmo se aplica quando a carboximetilcelulose (CMC) é usada como substrato. Neste caso, trata-se da atividade de CMCase (GHOSE, 1987).



**Figura 3.1. Ação conjunta das endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidases.**

### 3.1.1. Endoglicanases (EC 3.2.1.4)

As endoglicanases são hidrolases que clivam a celulose em suas regiões internas, liberando oligossacarídeos. Em virtude da forte coesão molecular entre as cadeias celulósicas, estas proteínas têm baixa atividade em fibras com alto teor de cristalinidade, pois têm seus acessos aos sítios-alvo espacialmente dificultados (COUGHLAN, 1990). A retirada de oligossacarídeos por estas enzimas cria um sinergismo de grande importância com as CBHs, pois gera novos terminais na cadeia celulósica (WITHERS, 2001).

### 3.1.2. Exoglicanases (EC 3.2.1.91)

As celobiohidrolases são enzimas que agem progressivamente sobre a cadeia de celulose, iniciando a digestão a partir dos terminais redutores ou não-redutores deste polissacarídeo. Esta é a única classe enzimática capaz de hidrolisar o polímero em sua forma cristalina e é a maior responsável pela liberação de celo-oligossacarídeos (oligossacarídeos compostos de glicose  $\beta$ -1,4) da fibra celulósica (COUGHLAN, 1990).

### 3.1.3. $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21)

As  $\beta$ -glicosidases são hidrolases responsáveis pela quebra dos celooligosacarídeos solúveis produzidos pelas outras enzimas do complexo celulolítico (celulases). Tendo em vista que seu substrato é solúvel em água, muitos microrganismos não apresentam excreção destas enzimas, frequentemente exibindo-as ancoradas às suas membranas plasmáticas (KUBICEK, 1981).

Durante o processo de hidrólise da celulose, as  $\beta$ -glicosidases têm o importante papel de diminuir a repressão da atividade enzimática das celulases causada pelo acúmulo de celobiose. Em altas concentrações, este produto acarreta uma diminuição significativa na eficiência de hidrólise e, portanto, é de vital importância que as cargas enzimáticas produtoras (celulases) e consumidoras ( $\beta$ -glicosidases) de celobiose sejam equilibradas. Em razão disso a concentração de biomassa no processo possui influência em sua eficiência, já que o aumento da concentração de celulose provocará um aumento da concentração de seus produtos, repressores do sistema (PHILIPPIDIS, SMITH & WYMAN, 1993).

### 3.1.4. Xilanases

As xilanases são as hemicelulases mais pesquisadas. Estas enzimas são responsáveis em clivar as cadeias de xilose em oligossacarídeos, causando um aumento da superfície passível de digestão da fibra de celulose adjacente e diminuindo a ligação desta à lignina. Dependendo do pré-tratamento utilizado na biomassa, o emprego destas enzimas, em conjunto com as celulases durante a hidrólise enzimática, resulta em aumento na eficiência deste processo (SELIG *et al.*, 2008).

As xilanas são polissacarídeos não-celulósicos mais comuns em angiospermas. Localizam-se principalmente na parede celular secundária, formando uma interface entre a lignina e os outros polissacarídeos. Existem evidências de que xilana e resíduos fenólicos de lignina estejam unidos por ligações covalentes e de que pontes de hidrogênio e forças de van der Waals unem este polissacarídeo à cadeia de celulose (FERREIRA FILHO, 1994). Xilanases são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por fungos e bactérias, que podem ser empregadas em indústrias de papel como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft. Tais enzimas atuam principalmente na xilana insolúvel, após o cozimento, na superfície das fibras da polpa,

hidrolisando este polissacarídeo e proporcionando maior permeabilidade à estrutura das mesmas.

### 3.1.5. Mercado das Enzimas

Atualmente, o número de enzimas identificadas e integrantes da lista da Comissão Internacional de Enzimas (E. C.) é de cerca de 3.000. Contudo, somente um pequeno número destas enzimas, cerca de 60, têm aplicação industrial e são utilizadas em quantidade apreciáveis. Devido às limitações legais (particularmente na indústria alimentícia) e, principalmente, aos altos custos de produção envolvidos (especialmente nos casos de enzimas intracelulares), o mercado mundial de enzimas está limitado a um volume relativamente pequeno (COELHO *et al.*, 2008).

Em 1998, as vendas mundiais de enzimas acumularam mais de US\$ 1,5 bilhões, com uma taxa anual de crescimento variando de 2% na indústria de couros a 15% na produção de papel e 25% em ração animal; e em 1999, a taxa anual média de crescimento do mercado foi de 6,5%, sendo que, atualmente esta taxa se mantém numa faixa de 4 a 5% (*ibid.*).

Atualmente a demanda global de enzimas é conduzida pelo crescimento robusto e continuado em biocatalisadores para o setor farmacêutico e de química fina, além da rápida expansão na produção do bioetanol a partir de grãos e matéria prima celulósica (LANDIM, 2009).

O mercado está distribuído principalmente em enzimas utilizadas em detergentes (37%), têxteis (12%), amido (11%), panificação (8%) e ração animal (6%), que aproximadamente 10% do mercado total de enzimas são produzidos para uso interno (COELHO *et al.*, 2008).

## 3.2. Cinética Enzimática

A cinética enzimática estuda a velocidade de uma reação em presença de uma molécula de enzima. Os principais fatores que podem influenciar a velocidade de reação enzimática são: concentração e granulometria do substrato, temperatura, pH do meio e presença de ativadores ou inibidores. Em geral, na maior parte dos estudos cinéticos não é necessário utilizar equipamentos sofisticados ou formas purificadas de enzimas, sendo os protocolos relativamente acessíveis (BON *et al.*, 2008).

Os primeiros estudos sobre cinética enzimática foram realizados em 1902, por Brown, e complementados por Henri em 1903, onde se incluiu nos cálculos do modelo a formação de um complexo intermediário formado pela enzima (COELHO *et al.*, 2008).

Na teoria do equilíbrio rápido, Michaelis-Menten, assume-se o estabelecimento de um equilíbrio entre E, S e ES, o que implica que as velocidades de formação de ES, a partir de E e S e da decomposição em E e S, são muito maiores que a velocidade de decomposição de ES em E e P (*ibid*):



Para estabelecer a cinética enzimática, as seguintes hipóteses devem ser consideradas:

- A enzima se combina rápido e reversivelmente com o substrato S para formar o complexo ES;
- A etapa limitante da reação é o desdobramento de ES em E+P ( $k_2 \ll k_{-1}$ ). Após atingir rapidamente o equilíbrio, a concentração de ES define a velocidade da reação;
- A enzima participa da reação em quantidades catalíticas ( $[E]_t \ll [S]_t$ ).

A partir destas restrições o modelo cinético pode ser representado pela equação 3.2:

$$\frac{dP}{dt} = v = k_2[ES] \quad [Eq. 3.2]$$

Considerando que a concentração total de enzima ( $[E]_t$ ) é conhecida (equação 3.3, onde [E] representa a concentração de enzima livre), parte-se então para a equação de velocidade em função de variáveis conhecidas.

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad [Eq. 3.3]$$

Considerando que a velocidade de formação e a velocidade de degradação do complexo [ES] são iguais, tem-se a equação 3.4:

$$k_1[E][S] = k_1([E]_t - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad [Eq. 3.4]$$

Rearranjando a equação 3.4, tem-se que:

$$k_1[E]_t[S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$k_1[E]_t[S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES]$$

Explicitando o termo [ES], chega-se a equação 3.5:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_t[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} = \frac{[E]_t[S]}{[S] + \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}} \quad [Eq. 3.5]$$

Definindo  $K_m$ , como a constante de Michaelis-menten, tem-se as equações 3.6 e 3.7

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad [Eq. 3.6]$$

$$[ES] = \frac{[E]_t[S]}{[S] + K_m} \quad [Eq. 3.7]$$

Multiplicando a equação 3.7 por  $k_2$ , tem-se a equação 3.8, onde:

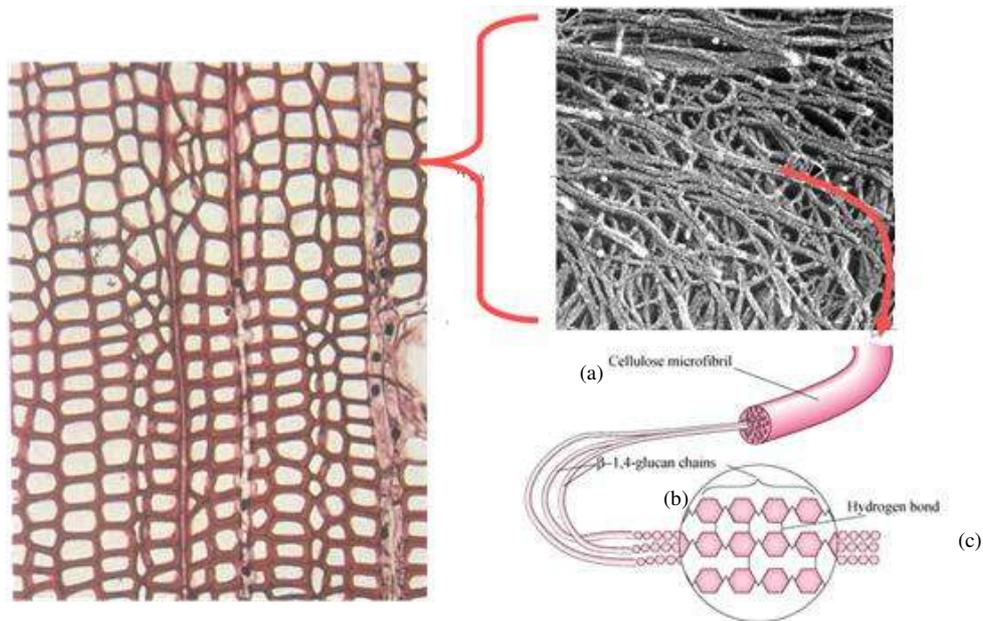
$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_t[S]}{[S] + K_m} \quad [Eq. 3.8]$$

Por definição,  $V_m$  é a velocidade máxima de reação, i.e,  $V = V_m$  se  $[E] = [E]_t$ , ou seja,  $k_2[E]_t$ . Chegando finalmente a equação de Michaelis-Menten, expressa pela equação 3.9:

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad [Eq. 3.9]$$

### 3.3. Estrutura da Biomassa

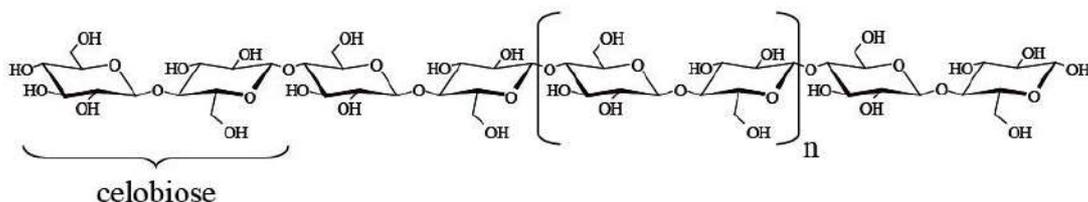
A estrutura lignocelulósica refere-se à parte do vegetal que forma sua parede celular, composta por estruturas fibrosas, constituídas basicamente por polissacarídeos (40 a 60% de celulose e 20 a 40% de hemicelulose), associados a uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas, a lignina (15 a 25%). Esses materiais, em geral, possuem em sua composição cerca de 65 a 75% de polissacarídeos (em base seca) que contêm em suas unidades monoméricas valiosos glicídios (açúcares) (PEREIRA JR., 2006).



**Figura 3.2. Representação da estrutura da biomassa: (a) microfibrilas, (b) cadeia  $\beta$ -1,4, (c) pontes de hidrogênio.**

### 3.3.1. Celulose

A celulose é um polímero linear, que contém até 15.000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Estas cadeias individuais estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, são rígidas e em forma de microfibrilas, uma estrutura altamente ordenada que se associam formando as fibrilas de celulose (figura 3.3.). As fibrilas apresentam regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas regiões amorfas. Estas características conferem à molécula elevada resistência à hidrólise ácida e enzimática (BON *et al.*,2008).



**Figura 3.3. Representação da cadeia polimérica da celulose constituída de resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4; celobiose, a unidade fundamental da estrutura.**

A estrutura da celulose não é uniforme, apresentando regiões altamente cristalinas e outras menos organizadas, as regiões amorfas (ATALLA, 1993) (figuras

3.3 e 3.4). Em virtude de tal complexidade, a solubilização enzimática eficiente dos substratos celulósicos requer a presença de diferentes enzimas atuando de forma sinérgica. Adicionalmente, a dificuldade em degradar completamente a estrutura da celulose nativa, presente na biomassa, está relacionada à sua interação com outros polímeros da parede celular dos vegetais, como a hemicelulose, a lignina e a pectina.



**Figura 3.4. Esquema das regiões cristalinas e amorfas da celulose.**

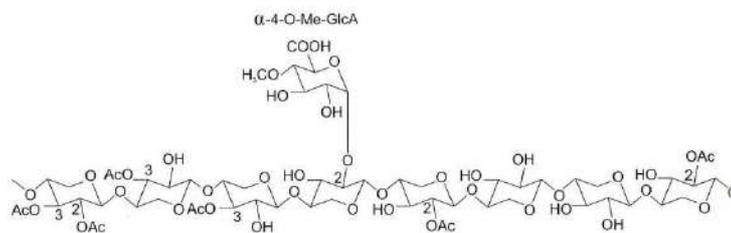
### 3.3.2. Hemicelulose

Em contraste com a celulose, que é cristalina, forte e resistente à hidrólise, a hemicelulose tem uma estrutura aleatória amorfa, com pouca força. É facilmente hidrolisada com ácido ou base diluídos. Trata-se de um grupo misto de polissacarídeos não celulósicos lineares e/ou ramificado que compreende dois grandes grupos: os pentosanos e os hexosanos (TAVARES *et. al.*, 2006).

Esta macromolécula contém, ainda, substituintes, como grupamentos acetila, L-arabinofuranola, ácido D-glicurônico e ácido 4-O-metilglicurônico, na cadeia principal ou nas ramificações. A variedade de ligações e de ramificações assim como a presença de diferentes unidades monoméricas contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações. Este polissacarídeo estabelece a ligação entre a celulose e a lignina (BON *et al.*, 2008).

As hemiceluloses (xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas) são polissacarídeos de baixa massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas. Consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como D-xilose e L-arabinose, e Aldohexoses, como D-glicose, D-manose e D-galactose. Contém, também, acetatos e substituintes como, L-arabinofuranosila, ácido D-glicurônico, ácido D-galacturônico e

ácido  $\beta$ -D-4-O-metilglicurônico, na cadeia principal ou nas ramificações. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações. Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, e é, portanto, mais suscetíveis à hidrólise química sob condições mais brandas. A hemicelulose está intimamente associada à celulose na estrutura da parede celular e estabelece a ligação entre a celulose e a lignina. A hemicelulose, que constitui o segundo grupo de polissacarídeo mais abundante da biosfera, é decomposta por um conjunto amplo de microrganismos, em particular fungos filamentosos e actinomicetos (ibid). Na figura 3.5 é apresentada a estrutura de hemicelulose de angiosperma.



**Figura 3.5. Composição do O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (hemicelulose de angiosperma). Os números indicam os átomos de carbono que sofreram substituição. Ac: Grupo Acetil;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA: ácido  $\alpha$ -4-O metilglicurônico. (BON *et al.*, 2008).**

### 3.3.3. Lignina

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. A lignina é o terceiro componente fundamental da madeira, ocorrendo entre 15 e 35% de seu peso. Assim como a celulose, também é uma macromolécula, mas difere desta porque é predominantemente um composto aromático, e porque é altamente irregular em sua constituição e estrutura molecular. Trata-se de um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, ocorrendo em vegetais e tecidos vasculares. Sabe-se que a lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microrganismos. Vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não são lignificados (FENGEL & WEGENER, 1984).

A lignina apresenta um caráter hidrofóbico que inibe a absorção de água e o inchamento das fibras (TAVARES *et al.*, 2006).

A lignina é uma rede tridimensional constituída de dimetoxiladas (siringil), monometoxiladas (guaiacil) e não-metoxiladas (*p*-hidróxifenil). Unidades de fenilpropanóides derivadas de seus alcoóis *p*-hidroxiciamil correspondentes (ÖNNERUD *et al.*, 2002) (figuras 3.6 e 3.7). A proporção desses componentes varia de acordo com os grupos taxonômicos vegetais, por exemplo, as gimnospermas apresentam lignina rica em guaiacil (ALVES *et al.*, 2009), enquanto as gramíneas possuem uma distribuição mais equilibrada dos três tipos de fenilpropanóides (HE & TERASHIMA, 1990).

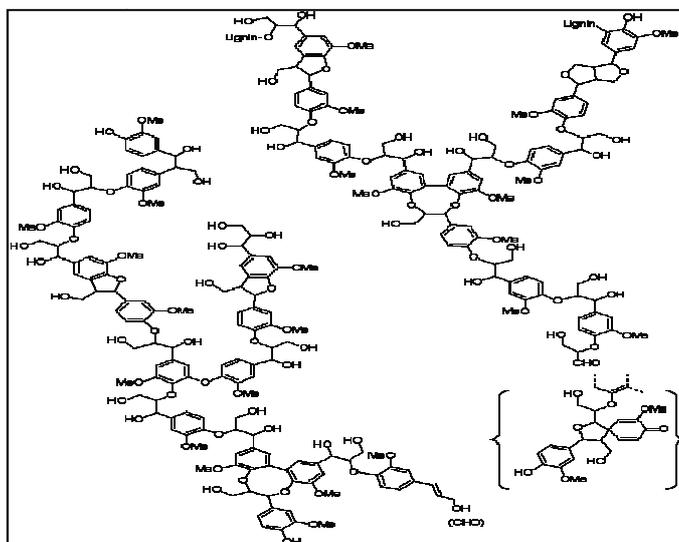


Figura 3.6. Estrutura da Lignina.

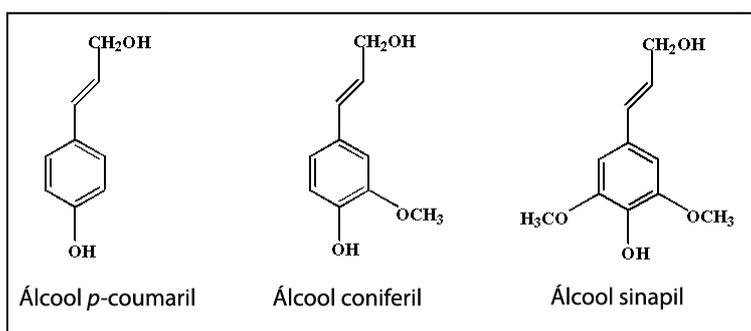


Figura 3.7. Alcoóis precursores majoritários da lignina.

### 3.4. O Bagaço de cana-de-açúcar

O esgotamento progressivo das reservas mundiais de petróleo está impulsionando uma nova “corrida do ouro”; a busca de combustíveis renováveis e economicamente viáveis. Adicionalmente a queima de combustíveis fósseis é

responsável pelo acúmulo de CO<sub>2</sub>, um dos gases responsáveis pelo efeito estufa. O uso de fontes alternativas de energia, produzidas a partir de matérias-primas renováveis, como a biomassa, vem transformando-se em alvo prioritário no nível internacional por permitir o desenvolvimento mais sustentável, diminuindo assim, o acúmulo de gases responsáveis pelo aquecimento global; o CO<sub>2</sub> proveniente da queima dos bicompostíveis é reciclado no processo de fotossíntese para a biosfera (LIN e TANAKA, 2006).

O Brasil possui uma posição privilegiada em relação à produção de etanol de segunda geração (biomassa da cana - bagaço e palha) devido à extensão de área agrícola disponível, clima favorável, água em abundância e por sua vasta experiência na produção e uso do etanol de cana-de-açúcar (primeira geração).

A expansão do cultivo da cana, motivada pela crescente demanda por etanol acarretará um aumento proporcional do bagaço excedente. Adicionalmente a queima da palha esta atualmente proibida, devendo ser banida gradativamente no estado de São Paulo em um prazo de 30 anos (Lei 11.241 e Decreto 47.700, de março de 2003).

#### 3.4.1. Pré Tratamento

A caracterização dos compostos poliméricos majoritários da biomassa constitui uma difícil tarefa experimental que, muitas vezes, exige a utilização de mais de um tipo de metodologia analítica, quer puramente química (como em métodos de extração seletiva para preparação de alfa-celulose e holocelulose), quer cromatográfica ou espectroscópica. Por outro lado, o grau de associação molecular entre eles dificulta a utilização destes materiais como matérias-primas para processos químicos e biotecnológicos, razão pela qual há a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento que amenize a interação entre os principais componentes da fitobiomassa e os torne susceptíveis à conversão em (bio) combustíveis e/ou insumos para a indústria química (RAMOS, 2003; GÁMEZ *et al.*, 2006).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Tais técnicas são baseadas em processos mecânicos, físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes. Dos vários processos descritos na literatura, os mais comuns são baseados no emprego de álcali, hidrólise ácida, explosão a vapor, água quente, fluido supercrítico, amônia líquida

(*Ammonia Fibre Explosion* ou AFEX) e hidróxido de sódio, todos com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa (GÁMEZ *et al.*, 2006).

#### 3.4.2. Tratamento Térmico a Vapor

Os materiais lignocelulósicos, quando submetidos a altas pressões de vapor por um determinado período de tempo, sofrem um processo que é comumente descrito como auto-hidrólise (EXCOFFIER *et al.*, 1991). Estas reações ocorrem em temperaturas superiores à temperatura de amolecimento da lignina e das hemiceluloses. Ao longo do processo, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e em partes quebradas, de forma que, no momento da descompressão, o material é desfibrado e reduzido a partículas menores. Isto explica o aumento da susceptibilidade do material ao ataque de enzimas e reagentes químicos.

Durante o processo de pré-tratamento a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, mas as hemiceluloses são as mais susceptíveis a este tipo de reação. Sob a ação da temperatura e da pressão do vapor, os grupamentos acetil presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e o ácido liberado no meio catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses que são facilmente removidas por extração aquosa. A fração insolúvel em água contém celulose e lignina parcialmente modificada, sendo que a maior parte desta lignina pode ser removida por extração com álcali, etanol ou dioxano.

O efeito do tratamento térmico a vapor sobre a organização estrutural da celulose aumenta sua área superficial e, como consequência, sua susceptibilidade à hidrólise ácida e/ou enzimática (IMTHURM *et al.*, 2000). Este tratamento é comumente aplicado para produção de ração animal.

#### 3.4.3. Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana

Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários tipos de microrganismos são capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto

amorfa, em açúcares solúveis de baixa massa molar como a glicose e a celobiose (MARTINS, 2005).

Estas enzimas, que coletivamente apresentam especificidade para as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, são necessárias para a solubilização completa da celulose, mesmo das regiões cristalinas, exigindo sinergismo na sua forma de atuar. Tradicionalmente, dependendo do seu sítio de ação na celulose, elas têm sido divididas em dois grupos; as endoglicanases e as exoglicanases / celobio-hidrolases. As endoglicanases (1,4- $\beta$ -D-glican-4-glicano-hidrolase, EC 3.3.1.4) hidrolisam randomicamente regiões internas na molécula da celulose, tendo mais afinidade pelas regiões amorfas, produzindo celo-oligossacarídeos com diversos graus de polimerização, que serão atacados pelas enzimas celobio-hidrolases. Da sua ação, que envolve o consumo de uma molécula da água, resulta um novo terminal redutor e um novo terminal não redutor (BON *et al.*, 2008). A figura 3.8 esquematiza a atuação dessas enzimas sobre a celulose.

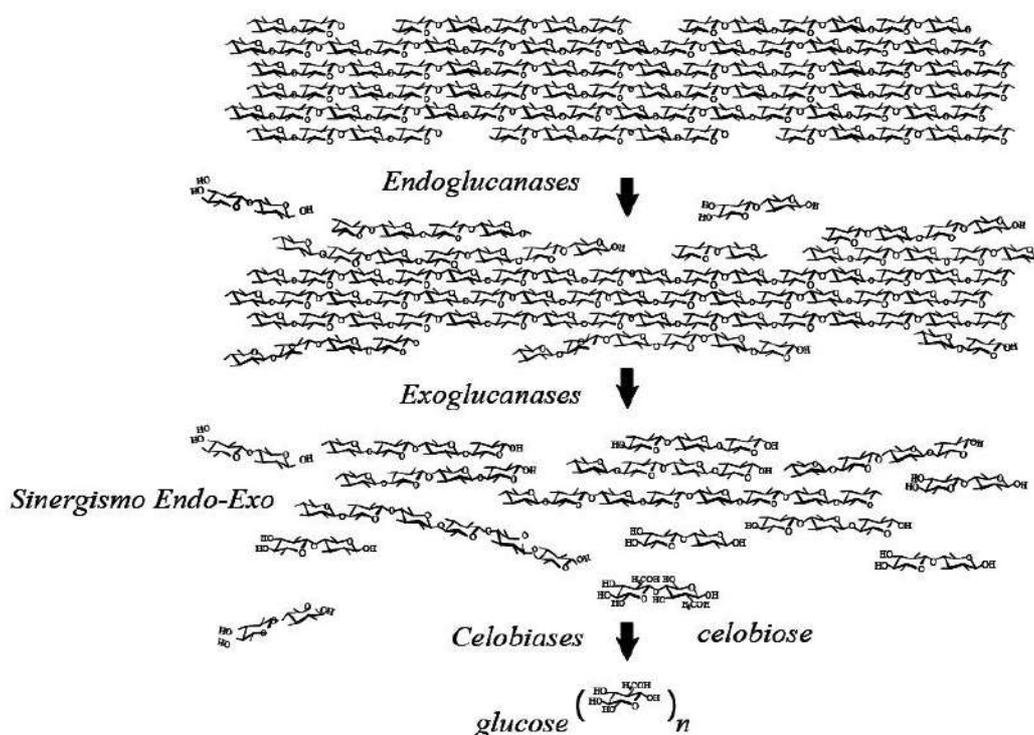


Figura 3.8. Modo de ação do complexo celulósico.

Completando a degradação da celulose à glicose, a celobiose, dissacarídeo solúvel em água, e potente inibidor de muitas celulasas, é hidrolisada em duas

moléculas de glicose pela enzima celobiase ( $\beta$ -glicosidase, EC 3.2.1.21). O nível de atividade da celobiase nas preparações de celulases é crítico, não apenas para evitar a inibição das celulases, como também para finalizar a degradação completa da celulose em glicose, fundamental para a produção de etanol de biomassa. É também conhecido que a celobiase sofre inibição pelo seu produto de hidrólise, a glicose. (ibid).

Para a realização dos testes de hidrólise enzimática é necessário ter um *pool* enzimático capaz de hidrolisar efetivamente a complexa estrutura da biomassa (JACOBSEN, 2000). Dentre todas as enzimas celulolíticas, as  $\beta$ -glicosidases desempenham um papel fundamental no processo de hidrólise, pois são elas, as responsáveis pela etapa final, ou seja, a geração de glicose.

### **3.5. Processos de Separação por Membranas**

De uma maneira geral, uma membrana pode ser definida como uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases (HABERT *et al.*, 2006).

Os processos de microfiltração e ultrafiltração são alguns dos processos de separação com membranas (PSM) de maior importância comercial no mundo, movimentando um mercado estimado em US\$ 2 bilhões, crescendo a 8% por ano, em membranas e equipamentos. O início da utilização comercial destes processos data cerca de 30 anos atrás. A microfiltração teve origem na Alemanha pouco antes da 1ª Guerra Mundial utilizada em laboratórios em escala reduzida. A ultrafiltração começou a ser empregada após este período, também na Alemanha, mas a sua utilização comercial em larga escala só iniciou na década de 1960 nos EUA, para concentração de macromoléculas (ZEMAN e ZYDNEY, 1996).

A figura 3.9 apresenta um diagrama esquemático dos processos de separação com membranas que utilizam o gradiente de pressão como força motriz.

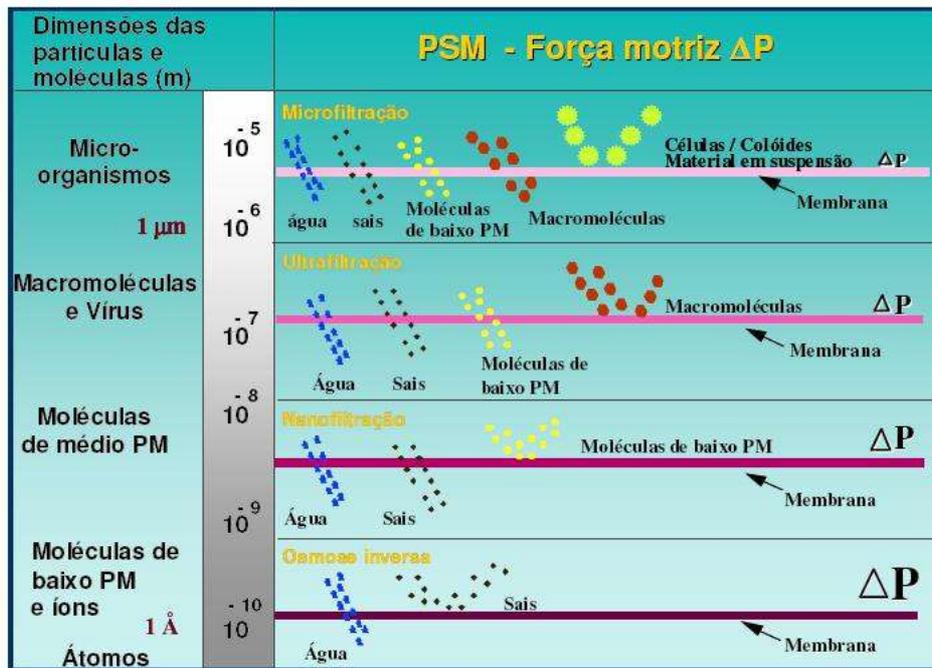


Figura 3.9. Principais características dos processos que utilizam diferença de pressão como força motriz (HABERT *et al.*, 2006).

A denominada “teoria científica da filtração” foi desenvolvida nos últimos 50 anos pelas escolas ilustres de Frank M. Tiller (Universidade de Houston, Estados Unidos) e Mompei Shirato (Universidade de Nagoya, Japão), esta teoria leva à “teoria simplificada”, base para o projeto e análise do desempenho de filtros (MASSARANI, 2002). A figura 3.10 representa um esquema simplificado de filtração em meios porosos.

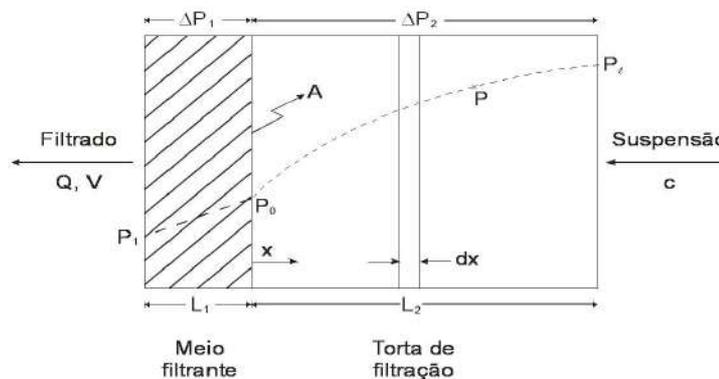


Figura 3.10. Esquema simplificado de filtração em meios porosos

O escoamento unidirecional segundo a lei de Darcy para um fluido newtoniano incompressível é descrito pela equação 3.10.

$$J = \frac{k}{\mu} \Delta P \quad [Eq. 3.10]$$

Onde  $\Delta P$ , representa a queda de pressão total definida pela soma da queda de pressão no meio filtrante ( $\Delta P_1$ ) com a queda de pressão da torta de filtração ( $\Delta P_2$ ), definidos pela equação 3.11:

$$\begin{aligned} \Delta P = \Delta P_1 + \Delta P_2 &= \frac{\mu J L_1}{K_1} + \frac{\mu J}{K_2} * \frac{m}{\rho_s(1 - \varepsilon)A} \\ &= \left( \frac{L_1}{K_1} + \frac{1}{K_2 \rho_s(1 - \varepsilon)} * \frac{m}{A} \right) \mu J \end{aligned} \quad [Eq. 3.11]$$

Sabendo que a massa de líquido na torta é muito menor que a massa de filtrado,  $m$ , pode ser definido aproximadamente pela equação 3.12:

$$m \approx \rho * c * V \quad [Eq. 3.12]$$

Definindo a resistividade da torta ( $\alpha_f$ ) e a resistência do meio filtrante ( $R_{mf}$ ), através das equações 3.13 e 3.14, temos:

$$\alpha_f = \frac{1}{K_2 \rho_s(1 - \varepsilon)} \quad [Eq. 3.13]$$

$$R_{mf} = \frac{L_1}{K_1} \quad [Eq. 3.14]$$

Substituindo as equações 3.12, 3.13 e 3.14 na equação 3.11, pode-se chegar facilmente à equação 3.15:

$$\Delta P = \left( R_{mf} + \frac{\alpha_f \rho c V}{A} \right) \mu J \quad [Eq. 3.15]$$

Pela definição de velocidade superficial do fluido ( $J$ ), podem-se escrever as equações 3.16 e 3.17:

$$J = \frac{Q}{A} = \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta P}{\left( R_{mf} + \frac{\alpha_f \rho c V}{A} \right) \mu} \quad [Eq. 3.16]$$

$$\frac{dt}{dV} = \frac{\mu}{A \Delta P} \left( R_{mf} + \frac{\alpha_f \rho c V}{A} \right) \quad [Eq. 3.17]$$

Integrando-se a equação 3.17 à pressão constante, tem-se a equação 3.18, que representa a equação geral de filtração em meios porosos à pressão constante com formação de torta.

$$\frac{t}{V} = \frac{\mu}{A\Delta P} \left( \frac{\alpha_f \rho c V}{2A} + R_{mf} \right) \quad [Eq. 3.18]$$

Para processos de filtração onde não há formação de torta o termo referente a queda de pressão na torta pode ser desprezado da equação 3.18, chegando finalmente a equação 3.19:

$$\frac{t}{V} = \frac{\mu R_{mf}}{A\Delta P} \quad [Eq. 3.19]$$

Processos de associação com membranas em reatores têm como vantagem a possibilidade de reutilização das enzimas e menor inibição da reação de hidrólise pelos produtos formados, pois os mesmos são retirados continuamente do reator (CARMINATTI, 2001; MOURA *et al*, 2007).

Uma das principais limitações dos processos de separação por membranas porosas é a queda contínua do fluxo permeado com o tempo indicando a polarização de concentração e bloqueio de poros (HABERT, 2006). Em estudo visando à recuperação de enzimas, este fenômeno foi também observado por Gottschalk e colaboradores (2008), onde o aumento da pressão aplicada à membrana resultou em maiores perdas de fluxo permeado.

A eficiência de limpeza dos módulos contendo membranas porosas é fundamental para viabilizar técnica e economicamente o processo de separação. A limpeza pode ser conduzida por métodos físicos (limpeza hidráulica ou com ar comprimido), por métodos químicos (ácida ou básica) ou enzimáticos (CASSANO *et al.*, 2003). A recuperação do fluxo depende de vários fatores associados ao meio e ao modo de operação e devem ser estudados simultaneamente (BLANPAIN-AVET *et al*, 2009).

### 3.5.1. Microfiltração

É o processo de separação com membranas mais próxima da filtração clássica entre 0,1 e 10  $\mu\text{m}$  (100 e 10.000 nm), sendo, portanto indicado para a retenção de

materiais em suspensão e emulsão. Como as membranas de microfiltração são relativamente abertas, as pressões empregadas como força motriz para o transporte são pequenas, dificilmente ultrapassando 3 bar. Na microfiltração o solvente e todo material solúvel permeia a membrana. Apenas o material em suspensão é retido (HABERT *et al.*, 2006).

### 3.5.2. Ultrafiltração

É um processo de separação por membranas, utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de ultrafiltração apresentam poros na faixa entre 1 a 100 nm, portanto mais fechadas do que as membranas de microfiltração: soluções contendo solutos numa ampla faixa de massa molar ( $10^3$  -  $10^6$  Dalton) podem ser tratadas por este processo. Como os poros das membranas de ultrafiltração são menores, uma força motriz maior é necessária para obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. Por este motivo as diferenças de pressão através da membrana variam na faixa de 2 a 10 bar (HABERT *et al.*, 2006).

### 3.5.3. Membranas associadas a biorreatores

A aplicação dos processos de separação com membranas associados aos processos bioquímicos, nos chamados biorreatores associados à membrana, é comumente utilizados no tratamento de efluentes (VIANA, 2004). No entanto, não foi encontrado na literatura trabalhos envolvendo membranas associadas a reatores de hidrólise da biomassa visando a produção de etanol.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismos, propagação e manutenção

Foram utilizadas cepas de duas espécies de fungos filamentosos para a produção das enzimas celulolíticas: *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus awamori*.

Os microrganismos liofilizados em ampolas foram hidratados e plaqueados através de cultivo em placas de Petri contendo meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*). Em seguida foram obtidas suspensões de esporos de ambos através da adição de solução salina (0,90% m/v) e raspagem das placas esporuladas após 7 dias de crescimento a 28°C. As suspensões obtidas foram centrifugadas e preservadas em solução de glicerol a 20 % m/v a - 4°C.

### 4.2. Produção de enzimas celulolíticas

A produção das enzimas celulolíticas se deu por meio de fermentações submersas em biorreatores utilizando as suspensões de esporos previamente preparadas e meios de cultura adequados para cada microrganismos (MANDELS, 1969).

Para o preparo do pré-inóculo foi utilizado 1% v/v da suspensão de esporos no meio de fermentação, contidos em frascos Erlenmeyers de 500 - 1000mL. O cultivo foi mantido em shaker incubador à 30°C e 200 RPM por um período 2 dias. Após este período 10% do pré-inóculo foi acrescido ao meio de fermentação presente no biorreator Sartorius Biostat B plus com volume útil de 2L previamente esterilizado. Para o *T.reesei* Rut C30 foi utilizado o meio Mandels modificado (tabela 4.1) e a fermentação foi conduzida durante 4 dias a 30°C, 200 RPM, pH 5,0 e 0,5 vvm. Já para o *A. awamori* foi utilizado o meio Breccia modificado (tabela 4.2) e a fermentação foi conduzida por 7 dias a 30°C, 200 RPM, pH 7,0 e 0,5 vvm.

Após o tempo de fermentação, os sobrenadantes enzimáticos foram separados do micélio por centrifugação, utilizando-se uma centrífuga de bancada Beckman & Coulter Allegra a 7°C e 2568 g, seguida de filtração a vácuo através de membranas de fibra de vidro MN-GF-2.

**Tabela 4.1. Meio de fermentação de Mandels modificado (Mandels *et al.*, 1969).**

Componentes	Concentração
Uréia	3,0 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,0 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
$\text{CaCl}_2$	0,3 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	20 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,6 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,4 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg/L
Milhocina	0,6% (v/v)
Extrato de Levedura	0,6% (p/v)
Lactose	3,0% (p/v)



**Figura 4.1. Produção de enzimas celulolíticas em fermentador utilizando a cepa de *T.reesei* Rut C30.**

**Tabela 4.2. Meio de fermentação de Breccia modificado (Breccia *et al.*, 1995).**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
NaNO <sub>3</sub>	1,2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,05 g/L
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	20 mg/L
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,6 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,4 mg/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 mg/L
Extrato de Levedura	1,2% (p/v)
Farelo de trigo	3,0% (p/v)

### **4.3. Concentração de Enzimas celulolíticas**

Os sobrenadantes enzimáticos foram concentrados através de um módulo de ultrafiltração de bancada que utiliza membranas de poliétersulfona com corte de 30 kDa e área útil de filtração de 0,093 m<sup>2</sup> sob pressão de 1 bar.

### **4.4. Preparo das misturas enzimáticas**

Para garantir a eficiência da hidrólise, as misturas enzimáticas foram preparadas de modo a manter uma relação fixa entre as exoglicanases e as  $\beta$ -glicosidases (FPU:BGU). As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam moléculas de dissacarídeos em monossacarídeos, garantindo assim, um bom rendimento em glicose durante todo o processo. Para o preparo das misturas enzimáticas fixou-se a relação FPU:BGU igual a 1:3, a fim de restringir o acúmulo de celobiose durante os ensaios de hidrólise. Esta relação foi adotada tendo como base resultados reportados por PEREIRA (2008). Segundo este autor, a relação FPU:BGU igual a 1:1 apresenta acúmulo de celobiose no final da hidrólise, indicando que há uma carência de  $\beta$ -glicosidases no meio. Já as relações 1:3 e 1:5 apresentam rendimentos de glicose similares e ausência de acúmulo de celobiose ao final do processo de hidrólise enzimática.

### **4.5. Caracterização da Biomassa da cana Pré-Tratada**

A caracterização da biomassa foi realizada através de ensaios de hidrólise ácida para garantir a completa hidrólise da hemicelulose e da celulose presente no material.

Este procedimento foi realizado com base no protocolo de determinação de carboidratos e lignina na biomassa utilizado no NREL - *National Renewable Energy Laboratory*, E.U.A (SLUITER *et al.*, 2008)

#### 4.6. Ensaio enzimáticos

Tanto para os sobrenadantes das fermentações quanto para as frações retiradas durante as etapas do processo de hidrólise enzimática, foram realizados os ensaios de determinação das atividades de CMCCase, FPase,  $\beta$ -glicosidases e xilanase. Todos estes ensaios foram realizados em duplicatas. Uma unidade de atividade enzimática é definida pela produção de um  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto durante o ensaio enzimático.

##### 4.6.1. Atividade de endoglicanases (CMCase)

A atividade de endoglicanases foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação de carboximetilcelulose (CMC).

O meio reacional foi formado por 0,5 mL de uma solução de CMC 4% m/v em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e 0,5 mL do sobrenadante das fermentações (diluído em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8, quando necessário). A mistura reacional é incubada a 50° C, durante 10 minutos, sob agitação. Ao final da reação, alíquota de 0,5 mL é retirada, e imediatamente é adicionada em um tubo contendo 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática (MILLER, 1959). Pela equação 4.1, pode-se calcular a atividade de CMCCase:

$$[Enzima] = \frac{\Delta abs * Fator * \left(\frac{\mu mol}{mL}\right) * Vol.reacional(mL) * diluição}{tempo(min.) * Vol.sobrenadante(mL)} \quad [Eq. 4.1]$$

\* Fator obtido através da curva padrão de glicose

#### 4.6.2. Determinação da atividade de FPase

A atividade de FPase foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro.

O meio reacional é formado por 0,5mL do sobrenadante da fermentação (diluído em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8, quando necessário), 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1,0cm X 6,0cm (aproximadamente 50 mg). A mistura reacional é incubada a 50° C, durante 60 minutos, sob agitação. A reação é interrompida pela adição de 0,5 mL da mistura reacional a um tubo contendo 0,5 mL de DNS. A determinação da concentração de açúcares redutores é realizada em seguida e a atividade pode ser calculada através da equação 4.2:

$$[Enzima] = \frac{\Delta abs * Fator * \left(\frac{\mu mol}{mL}\right) * Vol.reacional(mL) * diluição}{tempo(min.) * Vol.sobrenadante(mL)} \quad [Eq. 4.2]$$

\* Fator obtido através da curva padrão de glicose

#### 4.6.3. Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). O ensaio se baseia na determinação da concentração de glicose liberada quando a enzima hidrolisa celobiose.

O meio reacional é formado por 0,5 mL de sobrenadante (diluído em tampão citrato de sódio pH 4.8, 50mM quando necessário) e 0,5 mL de solução do substrato (celobiose 15mM em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4.8). A mistura reacional é incubada a 50°C por 30 minutos, sob agitação. A reação é terminada por imersão dos tubos em água fervente por 5 minutos para a inativação da enzima.

A determinação da concentração de glicose foi medida utilizando equipamento YSI – 2700 (figura 4.2).



**Figura 4.2. Equipamento YSI 2700, utilizado para quantificação de glicose nas amostras obtidas durante os testes de hidrólise enzimática e também para a quantificação da atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidases.**

O cálculo da atividade de  $\beta$ -glicosidase pode ser obtido pela seguinte equação 4.3:

$$\begin{aligned}
 & [Enzima] \\
 & = \frac{\Delta[glicose] \left(\frac{g}{L}\right) * Fator \left(\frac{\mu mol * L}{mL * g}\right) * Vol.reacional(mL) * diluição}{tempo(min.) * Vol.sobrenadante(mL)} \quad [Eq. 4.3]
 \end{aligned}$$

#### 4.6.4. Determinação da atividade de xilanase

O ensaio de atividade enzimática para xilanase foi realizado conforme metodologia já descrita na literatura (FILHO *et al.*, 1993; CARDOSO E FILHO, 2003). Para a preparação do substrato 1g de xilana de aveia (“oat spelts”) tratada com 20 mL de NaOH 1,0 M por 1 hora sob agitação e após esse período foram adicionados, sob agitação, 20 mL de HCl 1,0 M. A solução homogeneizada foi completada a 100 mL com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, ao final a solução foi homogeneizada por uma hora e centrifugada por 20 minutos para a remoção de xilana insolúvel (FILHO *et al.*, 1993).

Para a medida de atividade enzimática, 100  $\mu$ L da solução de xilana tratada foram adicionados a 50  $\mu$ L da preparação enzimática. Após um período de incubação, a 50°C por 30 minutos, a concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando xilose como padrão.

Uma unidade de atividade enzimática (1 UI) corresponderá à liberação de 1  $\mu$ mol de produto por minuto, em condições de velocidade inicial. Os ensaios para

determinação da atividade enzimática foram realizados em triplicata. A concentração da enzima, na preparação enzimática, foi calculada pela equação 4.4 a seguir:

$$[Enzima] = \frac{\Delta abs * Fator * \left(\frac{\mu mol}{mL}\right) * Vol.reacional(mL) * diluição}{tempo(min.) * Vol.sobrenadante(mL)} \quad [Eq. 4.4]$$

\* Fator obtido através da curva padrão de xilose

#### **4.7. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**

Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos em frascos de 250 mL contendo 25 g/L de material lignocelulósico e 100 mL de volume reacional. As cargas enzimáticas utilizadas foram de 5-20 FPU/g de material e a relação FPU:BGU utilizada foi de 1:3. Todos os ensaios ocorreram em shaker incubador a 50°C. Foram retiradas amostras nos tempos relativos a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 e 48h para todos os ensaios.

As amostras retiradas foram aquecidas em banho-maria a 100°C por 5 min. Para inativar as enzimas e em seguida foram centrifugadas a fim de separar o sobrenadante para a quantificação de glicose e açúcares redutores totais.

##### **4.7.1. Dosagem da concentração de açúcares redutores totais**

A concentração de açúcares redutores foi determinada de acordo com MILLER (1959). Neste método, os tubos contendo 0,5 mL da mistura reacional e 0,5 mL de DNS são aquecidos a 100°C durante 5 minutos. Logo após, a mistura é diluída com 6,5mL de água destilada. A leitura é realizada em espectrofotômetro a 540nm. As absorbâncias obtidas são transformadas em concentração de açúcares redutores através de uma curva padrão de glicose.

##### **4.7.2. Dosagem da concentração de glicose**

A dosagem da concentração de glicose é feita através do analisador bioquímico YSI 2700. Trata-se de um biosensor comercial que funciona com uma membrana específica para quantificação de glicose. Esta contém uma enzima imobilizada que catalisa a reação e transmite o sinal do produto gerado para um transdutor que por sua vez converte o sinal em um sinal elétrico. Em seguida, o sinal elétrico é amplificado e

processado, fornecendo assim, o valor da concentração de glicose na amostra. A faixa de leitura do equipamento é de 0 – 9 g/L de glicose.

Para este tipo de quantificação são necessários 10µL da amostra previamente diluída para a faixa de leitura do aparelho e a resposta é fornecida em gramas por litro em aproximadamente 30 segundos.

#### **4.8. Análise do Substrato**

A quantificação de celulose e hemicelulose foram estimadas pelo teor de açúcares liberados na hidrólise ácida do material, sendo estes açúcares quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando padrões como: glicose, xilose, arabinose, galactose, manose e celobiose. Já a lignina foi quantificada em duas etapas. A lignina solúvel que obtida por espectrofotometria e a lignina insolúvel obtida pelo peso seco do material, após o ataque ácido (SLUITER *et al.*, 2008).

#### **4.9. Ensaio estatísticos**

O planejamento fatorial composto central foi utilizado como ferramenta estatística com objetivo de selecionar as condições ótimas para os ensaios de hidrólise. Este planejamento consiste em avaliar os pontos do planejamento fatorial acrescidos dos pontos axiais e das replicatas no ponto central. As principais variáveis independentes selecionadas foram: concentração de biomassa, concentração de enzimas e granulometria do substrato (tabelas 4.3 e 4.4).

A fim de estudar a variável granulometria neste planejamento experimental, o bagaço previamente tratado com vapor, foi submetido a duas etapas de moagem: sendo a primeira, realizada pela passagem do material em um moinho de facas contínuo da marca Marconi, modelo MA 048. Já a segunda etapa de moagem foi efetuada em dois ciclos de 10 minutos, cada em batelada, com o uso do moinho de facas IKA, modelo A11 basic. A determinação do tamanho de partícula de cada fração foi feita através do uso de peneiras.

Para estimar o erro puro desta abordagem foram utilizados três ensaios no ponto central. Os dados experimentais foram analisados com auxílio do software STATISTICA 7.0 (Statsoft, U.S.A).

**Tabela 4.3. Matriz do planejamento estatístico para as variáveis codificadas**

Ensaio	Conc. de Substrato	Conc. de Enzima	Granulometria
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1,68	0	0
13	1,68	0	0
14	0	-1,68	0
15	0	1,68	0
16	0	0	-1
17	0	0	1

**Tabela 4.4. Níveis selecionados para as variáveis independentes**

Variável	Código	Nível inferior	Nível intermediário	Nível superior
Concentração do substrato	$x_1$	50 g/L	75 g/L	100 g/L
Concentração de enzima	$x_2$	5 FPU/g	10 FPU/g	15 FPU/g
Granulometria	$x_3$	0,5 mm	1,0 mm	Integral

#### **4.10. Integração das etapas de hidrólise e separação por membranas em escala semi-piloto**

##### **4.10.1. Ensaios de hidrólise em reator agitado e separação**

Os ensaios de hidrólise enzimática em escala semi-piloto foram conduzidos em um vaso de mistura com agitador do tipo turbina e volume útil de 4,5 L (figura 4.3) nas condições favoráveis ao rendimento de hidrólise, com base nos resultados obtidos através dos ensaios estatísticos do planejamento experimental.



**Figura 4.3. Vaso de mistura com agitador do tipo turbina e volume útil de 4,5L.**

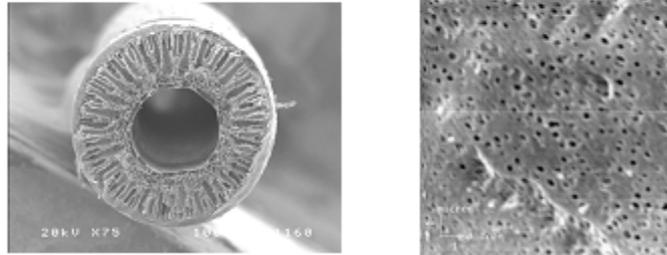
Após 14h de ensaio, a suspensão hidrolisada foi processada em um Sistema de Microfiltração/Ultrafiltração montado em suporte do tipo “skid” contendo medidores analógicos de vazão e pressão (PAM Membranas) com o objetivo de fracionar os açúcares gerados durante a hidrólise e recuperar as enzimas utilizadas na etapa inicial (figura 4.4).



**Figura 4.4. Módulo de membranas utilizado durante os experimentos de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado termicamente a vapor.**

Neste sistema de Microfiltração/Ultrafiltração, foram utilizadas membranas de fibra oca de polietérsulfona (figura 4.5) com tamanho de poro médio igual a  $0,2 \mu\text{m}$  no módulo de microfiltração e diâmetro de corte de 30 kDa no módulo de ultrafiltração,

ambas com área nominal de filtração igual a 0,1 m<sup>2</sup>. Os processos de filtração ocorreram em temperatura ambiente e em pressões variando na faixa de 0,4 a 1,8 bar.

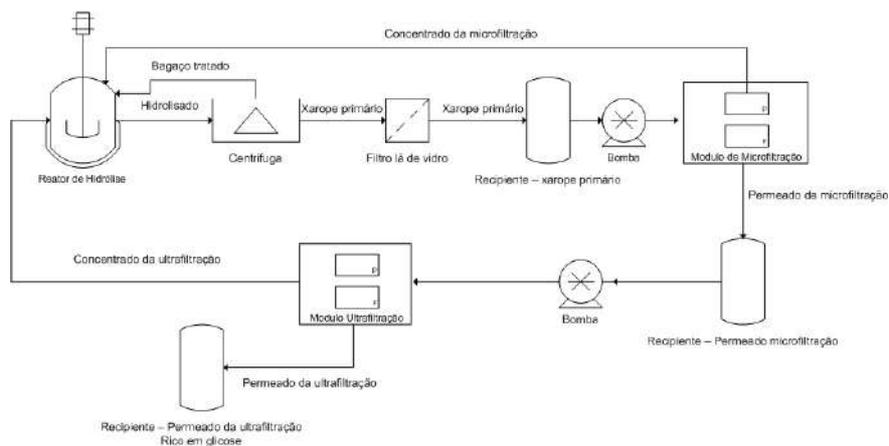


**Figura 4.5. Estrutura de membranas do tipo fibra oca (PAM Membranas)**

Para todos os ensaios foi utilizado bagaço de cana sem nenhum tipo de moagem prévia, a concentração inicial de bagaço foi de 100 g/L e a carga de enzimas inicial foi de 10 FPU/g. Para esta abordagem, a eficiência de separação foi analisada variando-se o fator de concentração volumétrico, FCV, conforme definido na equação 4.5.

$$FCV = \frac{Vol.alimentação}{Vol.alimentação - Vol.permeado} \quad [Eq. 4.5]$$

A figura 4.6 apresenta o fluxograma simplificado do processo integrado de hidrólise e separação dos açúcares com recuperação das enzimas.



**Figura 4.6. Fluxograma simplificado do processo de hidrólise enzimática associada à tecnologia de membranas.**

Durante a separação das frações no módulo de filtração, foram avaliados, a pressão ótima de operação e também os perfis de fluxo ao longo do tempo de operação na microfiltração e na ultrafiltração.

#### 4.10.2. Batelada Alimentada em escala Piloto

Os retidos da microfiltração e da ultrafiltração, separados após as 14h iniciais de hidrólise, foram completados com bagaço de cana e enzimas. Em seguida o experimento de hidrólise prosseguiu por mais 24h. Ao final do processo foram avaliados a concentração e o rendimento em glicose e comparados com a hidrólise em batelada simples.

#### 4.10.3. Limpeza das membranas

A limpeza das membranas de microfiltração e ultrafiltração se deu em duas etapas:

- Lavagem hidráulica;
- Lavagem combinada (NaOH + Cloro + Ácido cítrico – 45°C);

A primeira etapa consiste na permeação de água microfiltrada no sistema, seguida de retrolavagem e lavagem pela carcaça, no tempo de 20 minutos para cada etapa, e a permeabilidade foi medida na pressão de 1 bar.

Já a segunda etapa consiste na utilização de agentes químicos para a limpeza, como: NaOH ( $10^{-4}$  M), Ácido cítrico (0,1 g/L) e cloro (0,5 g/L). Inicialmente a solução aquosa de NaOH a 45°C foi permeada no sistema durante 1 hora e meia e em seguida, nesta mesma solução foi adicionado o cloro mantendo a filtração por mais 20 minutos. Após a etapa de filtração o sistema foi modificado para o modo de retrolavagem onde foi utilizada novamente a solução aquosa de NaOH a 45° C durante 30 minutos e seguida da adição de cloro e retrolavagem por mais 25 minutos, ao final foi o realizado o enxágue com 3 L de água microfiltrada para a retirada do excesso de base e cloro.

Após a retrolavagem, o sistema foi drenado e foi realizada a permeação da solução de ácido cítrico por 10 minutos seguido de enxágue com 3 L de água para obtenção do pH neutro. O procedimento foi finalizado com solução alcalina aquecida permeando o sistema por 10 minutos seguido de enxágue no qual foram gastos 4 L de

água. Esta lavagem combinada obteve êxito, pois o valor de permeabilidade hidráulica foi restaurado para valores próximos aos declarados pelo fabricante. A determinação da permeabilidade foi realizada com auxílio de proveta graduada e cronômetro na pressão de 1 bar.

Adicionalmente resultados de regeneração do fluxo através de diferentes técnicas de limpeza das membranas podem ser visualizados no APÊNDICE A.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização do bagaço de cana pré-tratado termicamente

A análise feita por CLAE mostrou que a hidrólise ácida do bagaço liberou 48,45% de glicose (43,61% de celulose) e 10,29% de xilose (9,06% de hemicelulose). Não foi identificada a liberação de outros açúcares como manose, galactose, arabinose e celobiose nos cromatogramas do material hidrolisado (figura 5.1). Conforme já mencionado anteriormente, materiais de origem lignocelulósica possuem entre 40-60% de celulose e 20-30% de hemicelulose (PEREIRA JR., 2006). Em geral pré-tratamentos térmicos, hidrotérmicos e do tipo explosão a vapor, removem a maior parte da fração de hemicelulose da biomassa, que originalmente, possui cerca de 20-30% de hemicelulose (FOCHER *et al.*, 1988).

Em relação à lignina 4,2% corresponderam à fração solúvel e 29,8% à fração insolúvel da lignina e cinzas, totalizando 33,99% de lignina mais cinzas presente no substrato.

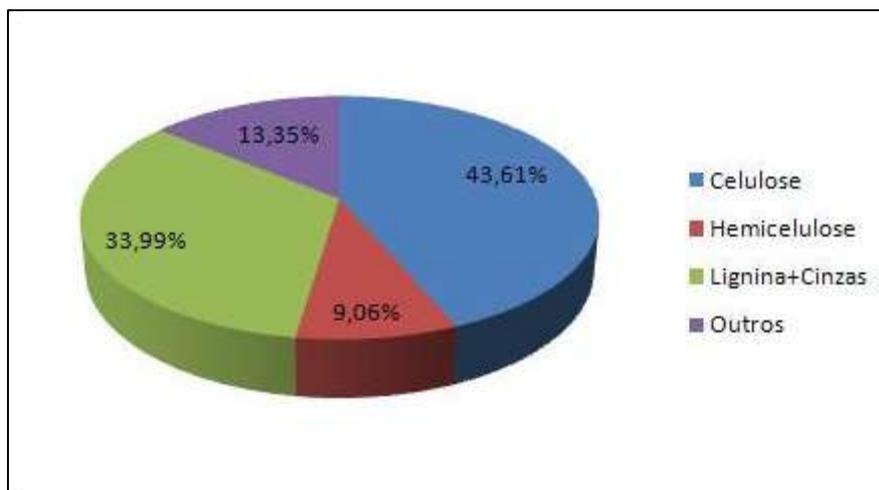
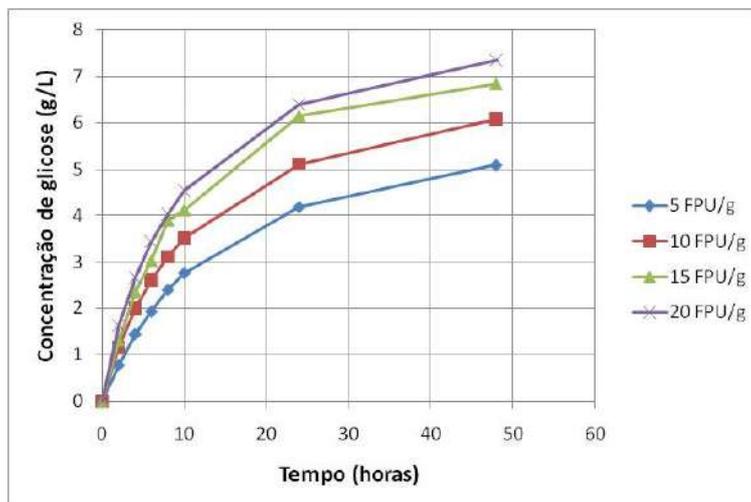


Figura 5.1. Caracterização do bagaço de cana pré-tratado termicamente a vapor.

Adicionalmente, trabalhos como o de OLIVEIRA (2009) mostram outros materiais de origem lignocelulósica tratados ou não previamente por diferentes tecnologias de pré-tratamento que foram caracterizados pela mesma metodologia empregada para a caracterização do bagaço de cana tratado com vapor (APÊNDICE B).

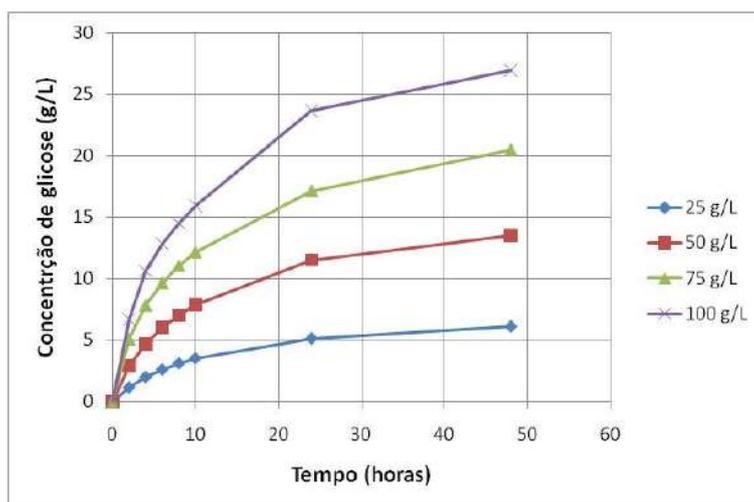
## 5.2. Cinéticas de conversão

O comportamento cinético da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com vapor está apresentado nas figuras 5.2 e 5.3 ao longo de 48h de ensaio. A concentração e o rendimento em glicose foram avaliados para diferentes concentrações de enzima e diferentes concentrações de bagaço. Como esperado, o aumento na concentração de enzimas favoreceu a produção de glicose no meio. Entretanto, não se observou um aumento significativo para concentrações de enzima acima de 15 FPU/g (figura 5.2).



**Figura 5.2. Perfil cinético de glicose gerada para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 25 g de bagaço/L e concentração de enzima variando de 5-20 FPU/g de bagaço.**

Pode-se observar na figura 5.3 que a concentração de glicose é diretamente proporcional à concentração de bagaço. Este resultado indica que, nas condições experimentais analisadas, o aumento da concentração de substrato no meio reacional não reduziu a eficiência de conversão.



**Figura 5.3. Perfil cinético de glicose gerada para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 10 FPU/g de bagaço e concentração de bagaço variando de 25-100 g de bagaço/L.**

Adicionalmente, trabalhos como o de OLIVEIRA (2009) apresentam perfis cinéticos de hidrólise enzimática utilizando outros materiais de origem lignocelulósica tratados ou não previamente por diferentes tecnologias de pré-tratamento (APÊNDICE C).

### **5.3. Avaliação estatística**

Na tabela 5.1 estão apresentados os resultados obtidos para a concentração de glicose e rendimento de hidrólise.

**Tabela 5.1. Ensaios de planejamento experimental com valores reais e suas respectivas respostas em termos de concentração de glicose e rendimento.**

Ensaio	Conc. de Substrato (g/L)	Conc. de Enzima (FPU/g)	Granulometria (mm)	[Glicose] (g/L)	% rendimento
1	50	5	0,5 (baixa)	9,08	37,43
2	100	5	0,5 (baixa)	17,26	35,58
3	50	15	0,5 (baixa)	12,77	52,66
4	100	15	0,5 (baixa)	26,05	53,72
5	50	5	Integral (alta)	10,43	43,01
6	100	5	Integral (alta)	20,23	41,71
7	50	15	Integral (alta)	13,99	57,69
8	100	15	Integral (alta)	29,06	59,91
9	75	10	1,0 (média)	19,15	52,65
10	75	10	1,0 (média)	20,10	55,25
11	75	10	1,0 (média)	19,59	53,86
12	33	10	1,0 (média)	8,54	53,36
13	117	10	1,0 (média)	28,55	50,31
14	75	1,6	1,0 (média)	8,42	23,15
15	75	18,4	1,0 (média)	20,53	56,44
16	75	10	0,5 (média)	18,05	49,62
17	75	10	Integral (alta)	20,30	55,8

Nas tabelas 5.2 e 5.3 estão discriminados os efeitos de cada variável independente, e suas possíveis interações sobre a concentração e o rendimento de glicose, respectivamente.

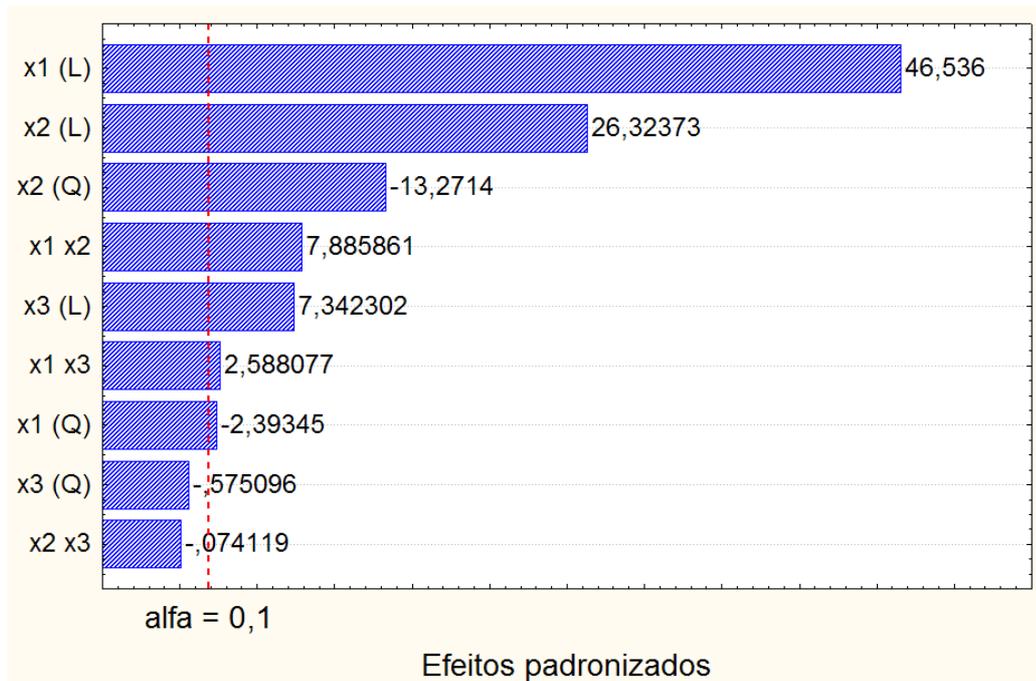
**Tabela 5.2. Efeitos estimados da concentração de substrato ( $x_1$ ), carga de enzimas ( $x_2$ ) e granulometria ( $x_3$ ), bem como suas interações sobre a concentração de glicose em 48h de ensaio considerando um limite de confiabilidade de 90 % ( $p < 0,10$ ).**

	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Lim. De conf -90%	Lim. De conf +90%
<b>Média</b>	19,51415	0,242804	80,3701	< 0,00001	19,05414	19,97416
<b>x1 (L)</b>	11,71835	0,251813	46,5360	< 0,00001	11,24128	12,19543
<b>x1(Q)</b>	-0,63457	0,265129	-2,3935	0,04793	-1,13688	-0,13227
<b>x2 (L)</b>	6,62865	0,251813	26,3237	< 0,00001	6,15157	7,10573
<b>x2 (Q)</b>	-3,51864	0,265129	-13,2714	< 0,00001	-4,02095	-3,01634
<b>x3 (L)</b>	2,15970	0,294145	7,3423	0,00016	1,60242	2,71698
<b>x3 (Q)</b>	-0,26362	0,458399	-0,5751	0,58323	-1,13210	0,60485
<b>x1 x2</b>	2,59338	0,328864	7,8859	0,00010	1,97032	3,21643
<b>x1 x3</b>	0,85112	0,328864	2,5881	0,03605	0,22807	1,47418
<b>x2 x3</b>	-0,02438	0,328864	-0,0741	0,94299	-0,64743	0,59868

**Tabela 5.3. Efeitos estimados da concentração de substrato ( $x_1$ ), carga de enzimas ( $x_2$ ) e granulometria ( $x_3$ ), bem como suas interações sobre o rendimento em glicose em 48h de ensaio considerando um limite de confiabilidade de 90 % ( $p < 0,10$ ).**

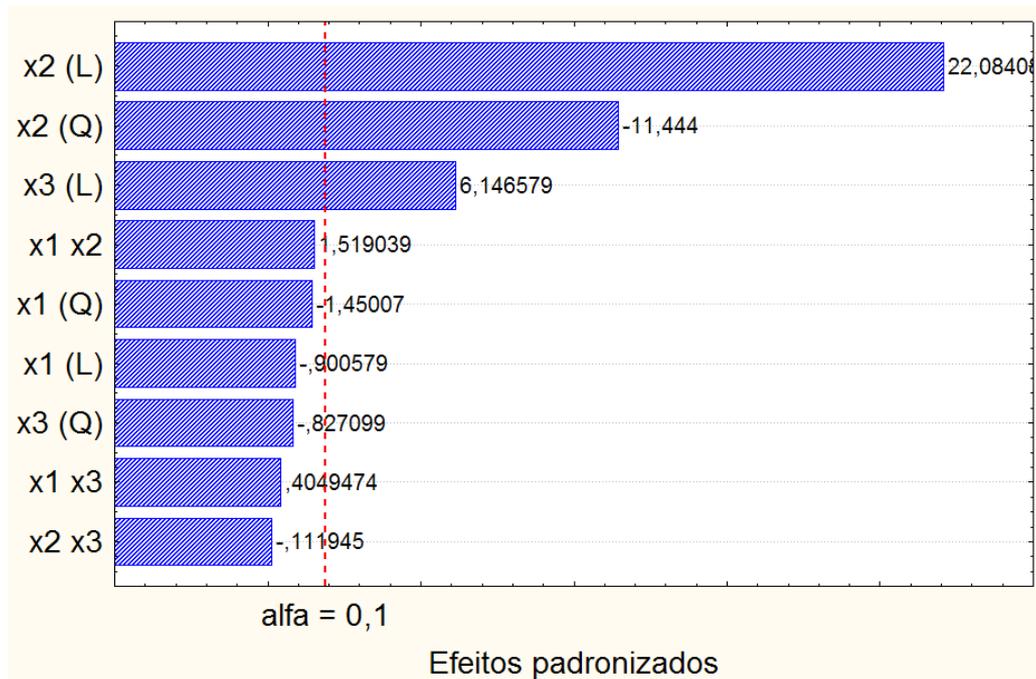
	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p-valor	Lim. De conf -90%	Lim. De conf +90%
<b>Média</b>	53,72667	0,781919	68,7113	< 0,00001	52,2453	55,20808
<b>x1 (L)</b>	-0,73031	0,810932	-0,9006	0,39774	-2,2667	0,80607
<b>x1(Q)</b>	-1,23809	0,853816	-1,4501	0,19032	-2,8557	0,37953
<b>x2 (L)</b>	17,90868	0,810932	22,0841	< 0,00001	16,3723	19,44506
<b>x2 (Q)</b>	-9,77108	0,853816	-11,4440	0,00001	-11,3887	-8,15346
<b>x3 (L)</b>	5,82239	0,947257	6,1466	0,00047	4,0277	7,61705
<b>x3 (Q)</b>	-1,22098	1,476219	-0,8271	0,43547	-4,0178	1,57583
<b>x1 x2</b>	1,60876	1,059066	1,5190	0,17255	-0,3977	3,61525
<b>x1 x3</b>	0,42887	1,059066	0,4049	0,69761	-1,5776	2,43535
<b>x2 x3</b>	-0,11856	1,059066	-0,1119	0,91401	-2,1250	1,88793

Pode-se visualizar através dos gráficos de Pareto (figura 5.4) que os parâmetros com maior significância estatística quando se avaliou a concentração de glicose no meio foram: concentração de substrato seguida da carga de enzimas. Apesar de a granulometria ter sido significativa ( $p < 0,10$ ) a influência desta é bem inferior quando comparada as demais variáveis.



**Figura 5.4.** Gráfico de Pareto para a concentração de glicose em função da concentração de substrato( $x_1$ ), carga de enzimas( $x_2$ ) e granulometria( $x_3$ ).

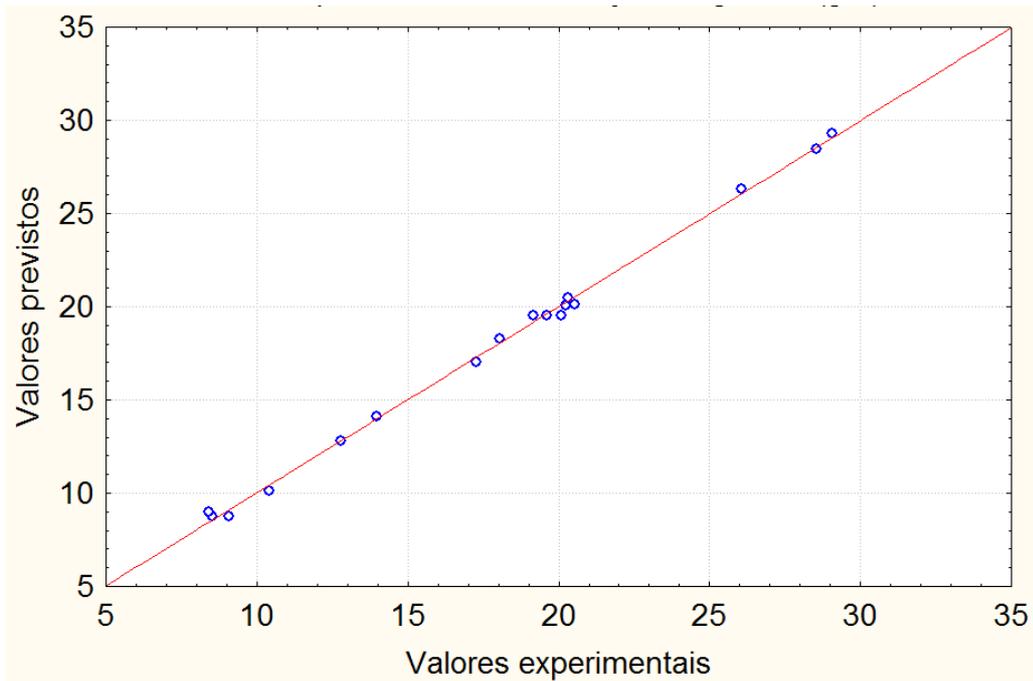
Quando se avaliou o rendimento em glicose (figura 5.5) pode-se observar, através do gráfico de Pareto, que os parâmetros mais relevantes foram: a carga de enzimas e a granulometria. Neste caso, o efeito da carga de enzimas foi mais de três vezes que o apresentado pela granulometria enquanto a concentração de substrato não foi significativa na faixa estudada.



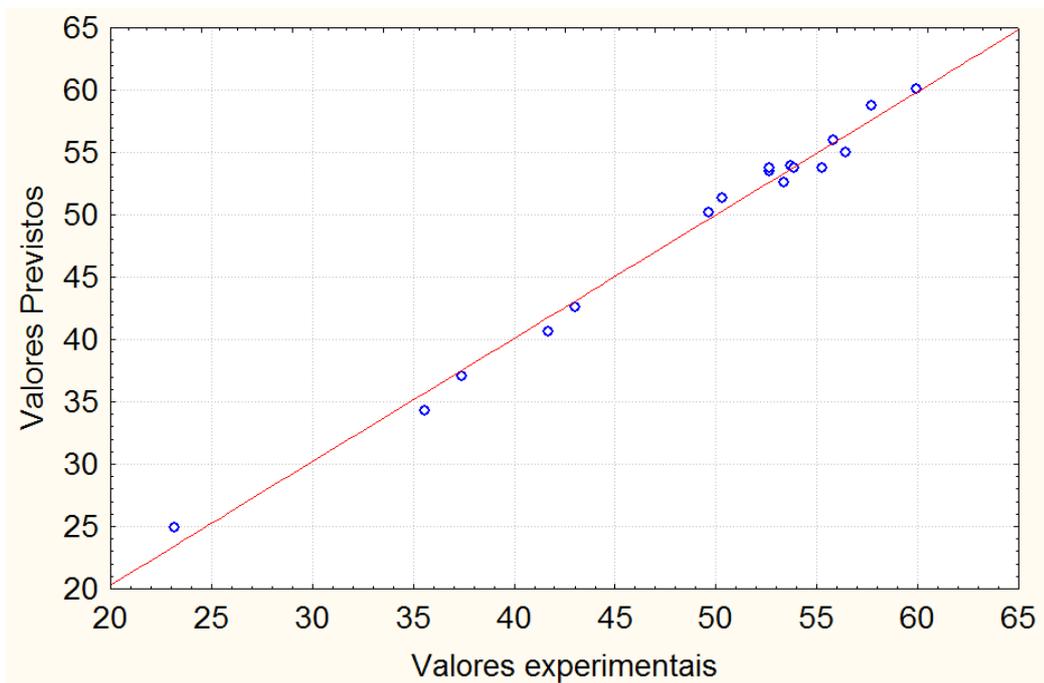
**Figura 5.5.** Gráfico de Pareto para o rendimento em glicose em função da concentração de substrato( $x_1$ ), carga de enzimas( $x_2$ ) e granulometria( $x_3$ ).

Com isso pode-se concluir que além da enzima ser um limitante do processo em termos de viabilidade econômica, esta também pode ser considerada limitante no rendimento do processo.

Pela análise dos gráficos de resíduos (figuras 5.6 e 5.7) pode-se verificar que os pontos experimentais se aproximam satisfatoriamente do ajuste matemático nos dois casos analisados: concentração de glicose e rendimento em glicose.



**Figura 5.6.** Comparação entre os valores previstos (modelo matemático) e os valores experimentais para a concentração de glicose em 48h de ensaio.



**Figura 5.7.** Comparação entre os valores previstos (modelo matemático) e os valores experimentais para o rendimento em glicose em 48h de ensaio.

Através da análise de variância (ANOVA), levando-se em conta apenas os parâmetros significativos e desprezando as demais variáveis, os modelos gerados no STATISTICA ajustam bem os resultados experimentais obtidos para a concentração e

rendimento em glicose, ou seja,  $F_{\text{calculado}} \gg F_{\text{tabelado}}$ , para ambos os casos (tabela 5.4). Isto significa que os resíduos são relativamente pequenos.

**Tabela 5.4. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose e para o rendimento em glicose em 48h de ensaio.**

Fonte de variação	Soma dos quadrados		Graus de liberdade		Quadrado médio		F <sub>calc.</sub>	
	Conc. de glicose	Rendimento	Conc. de glicose	Rendimento	Conc. de glicose	Rendimento	Conc. de glicose	Rendimento
Regressão	683,12	1484,48	7	3	97,59	494,83	581,65	409,73
Resíduo	1,51	15,70	9	13	0,17	1,21		
Total	684,63	1500,18	16	16				

Concentração de glicose:  $F_{\text{tab}(7;9;0,1)} = 2,51$ ;  $R^2 = 99,78\%$  e p-valor  $< 0,00001$ ; Rendimento em glicose:  $F_{\text{tab}(3;13;0,1)} = 2,56$ ;  $R^2 = 98,95\%$  e p-valor  $< 0,00001$

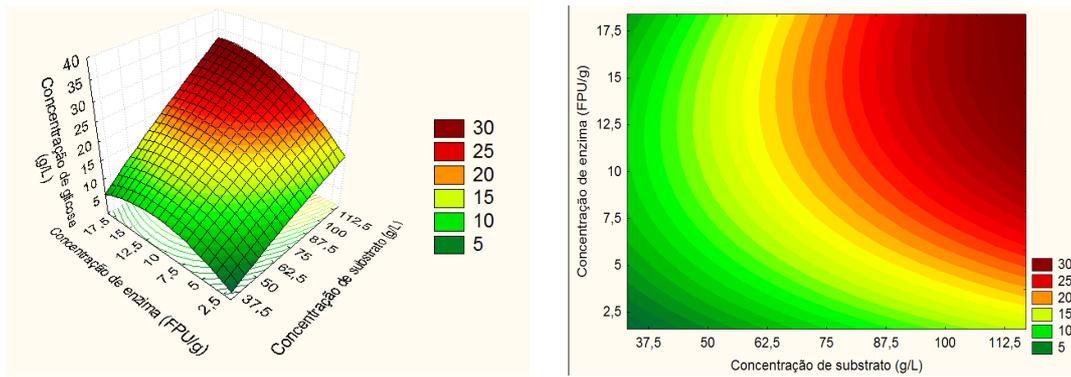
Considerando a validade dos modelos ajustados podem-se indicar equações matemáticas (modelo codificado) que descrevem o comportamento da concentração e do rendimento em glicose em 48h em função das variáveis independentes estudadas (Eq. 5.1 e Eq. 5.2). É importante ressaltar que estes modelos são válidos apenas no intervalo estudado para cada uma das variáveis e em 48h de hidrólise.

$$\text{Concentração de glicose} = 5,86 * x_1 - 0,32 * x_1^2 + 3,31 * x_2 - 1,76 * x_2^2 + 1,08 * x_3 + 1,30 * x_1 * x_2 + 0,43 * x_1 * x_3 + 19,51 \quad [\text{Eq. 5.1}]$$

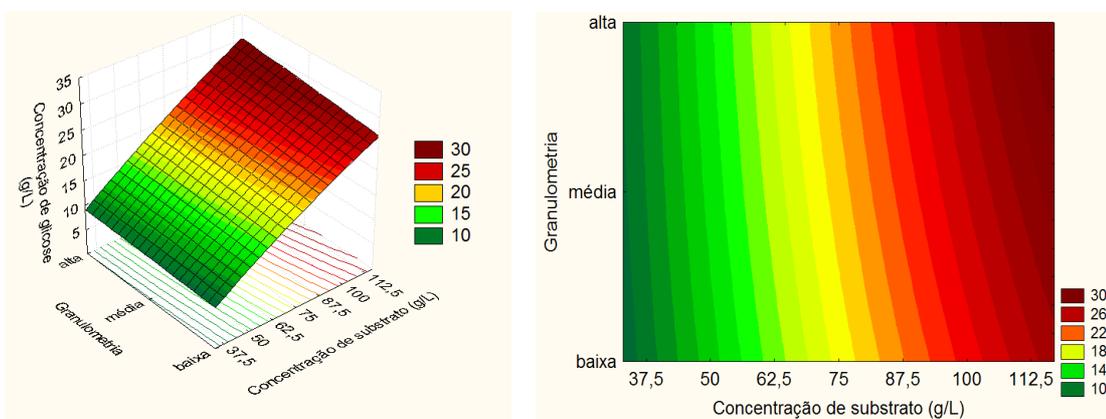
$$\text{Rendimento em glicose} = 8,95 * x_2 - 4,89 * x_2^2 + 2,91 * x_3 + 53,73 \quad [\text{Eq. 5.2}]$$

Através das superfícies de resposta (figuras 5.8, 5.9 e 5.10) pode-se confirmar a influência da concentração de substrato e da carga de enzimas na concentração de glicose obtida em 48h de hidrólise. Além disso, pode-se inferir que a carga de enzimas que fornece a maior concentração de glicose se dá em torno de 15 FPU/g, entretanto para uma carga de 10 FPU/g a diferença foi menor que 10%. Como a enzima é um dos pontos limitantes faz-se necessário estudar os aspectos econômicos antes de se optar por operar na condição ótima do processo, que nem sempre é a condição mais atraente.

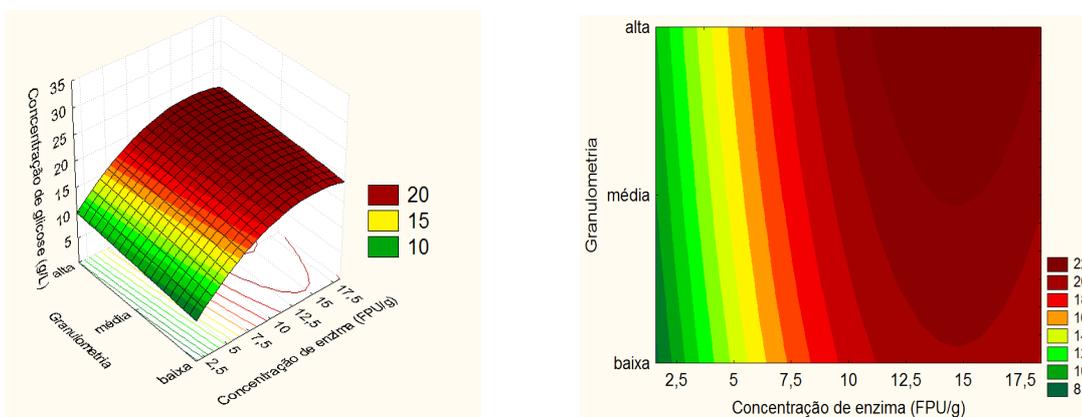
A menor influencia da granulometria, na faixa estudada, também pode ser confirmada nas figuras 5.9 e 5.10. Para o bagaço tratado com vapor, quanto maior a granulometria do substrato maior foi a concentração de glicose obtida, isto se deve a dificuldade de homogeneização no início da hidrólise. Neste caso, não é necessário uma etapa prévia de moagem do material tratado antes da etapa de hidrólise. Este resultado é importante, pois contribui para a redução dos custos de processamento da matéria-prima.



**Figura 5.8. Superfícies de resposta para a concentração de glicose em função da concentração de substrato e da carga de enzimas em 48h de ensaio de hidrólise.**



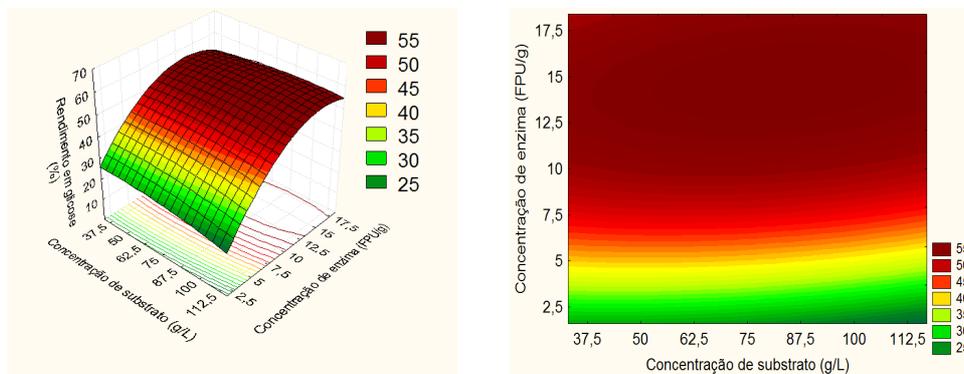
**Figura 5.9. Superfícies de resposta para a concentração de glicose em função da concentração de substrato e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise.**



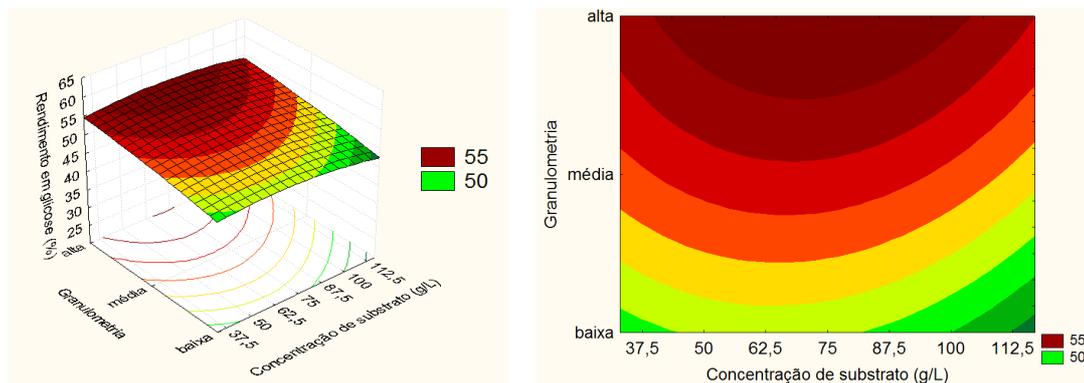
**Figura 5.10. Superfícies de resposta para a concentração de glicose em função da carga de enzimas e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise.**

Através das superfícies de resposta, apresentadas nas figuras 5.11, 5.12 e 5.13, pode-se observar a influência significativa da carga de enzimas no rendimento em glicose em 48h de hidrólise do bagaço de cana. Além disso, pode-se inferir que a carga de enzimas que fornece o maior rendimento ocorreu em torno de 15 FPU/g (figura 5.13). Este resultado também foi observado para a concentração de glicose no meio. Adicionalmente, pode-se constatar que a concentração de substrato não influenciou o rendimento de hidrólise, considerando o intervalo estudado.

O menor efeito da granulometria também pode ser observado nas figuras 5.11 e 5.12. Para o bagaço tratado com vapor quanto maior a granulometria maior foi o rendimento em glicose.



**Figura 5.11. Superfícies de resposta para o rendimento em glicose em função da concentração de substrato e da carga de enzimas em 48h de ensaio de hidrólise.**



**Figura 5.12. Superfícies de resposta para o rendimento em glicose em função da concentração de substrato e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise.**

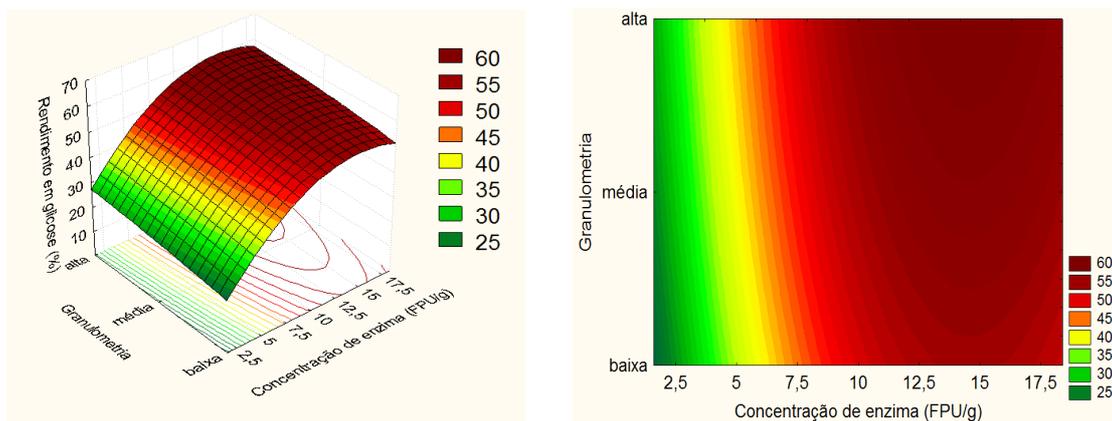


Figura 5.13. Superfícies de resposta o rendimento em glicose em função da carga de enzimas e da granulometria em 48h de ensaio de hidrólise.

#### 5.4. Rendimentos em glicose

O cálculo dos rendimentos em glicose foi baseado na caracterização prévia do bagaço. Tendo como base, a caracterização por hidrólise ácida do bagaço utilizado nos ensaios, tem-se que, este gera 48,45% de glicose. Através deste dado, obteve-se o rendimento em glicose para todos os ensaios de hidrólise. Os resultados apresentados nos gráficos das figuras 5.14 e 5.15 confirmam que o rendimento em glicose depende da carga de enzima enquanto a concentração de bagaço não apresentou influência significativa.

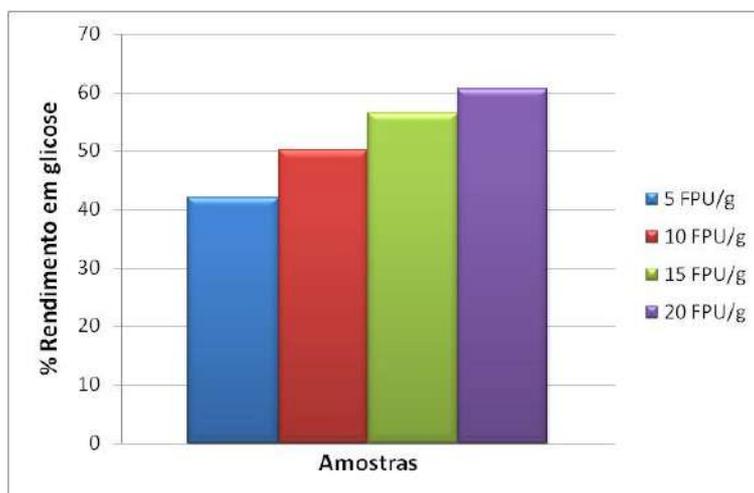
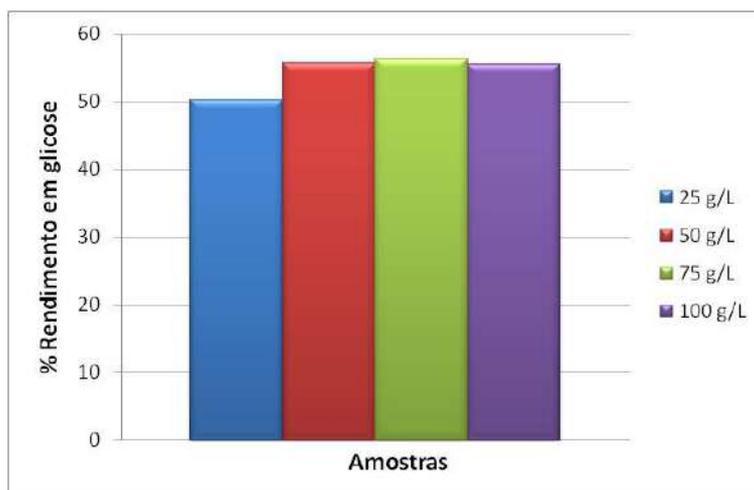


Figura 5.14. Rendimento em glicose para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 25 g de bagaço/L e concentração de enzima variando de 5-20 FPU/g de bagaço.

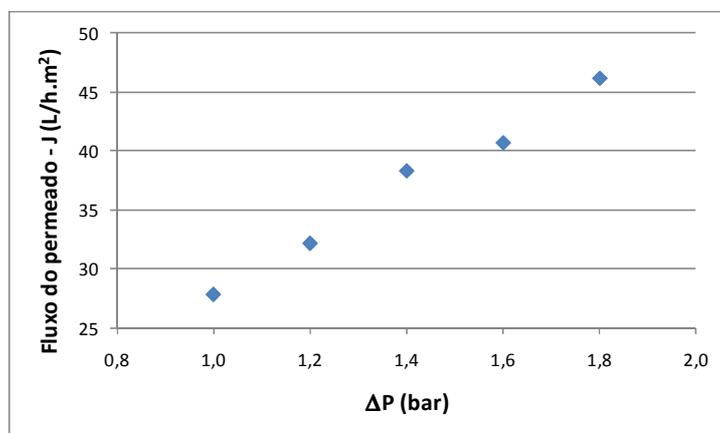


**Figura 5.15. Rendimento em glicose para ensaios de hidrólise enzimática utilizando 10 FPU/g de bagaço e concentração de bagaço variando de 25-100 g de bagaço/L.**

Para obter níveis mais elevados de glicose no meio, outros fatores como o tipo de pré-tratamento, a granulometria e a cristalinidade do material também devem ser otimizados, pois segundo INOUE (2008), uma carga de celulasas igual a 40 FPU/g já é considerada excessiva. Entretanto isto depende fortemente do tipo de substrato estudado.

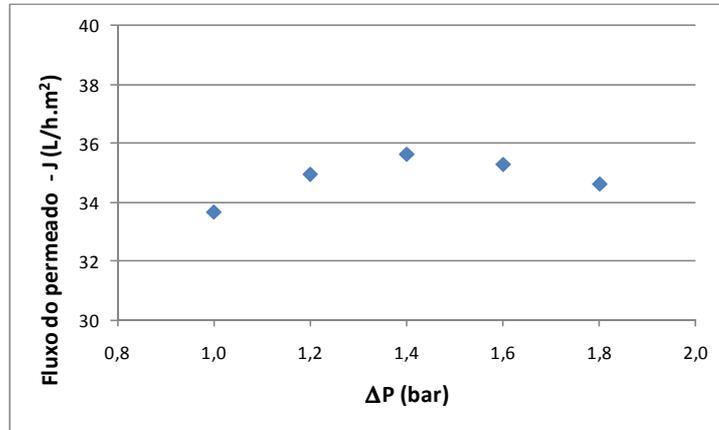
### 5.5. Perfis de Filtração

Através da análise do comportamento do fluxo (J) para diferentes valores de queda de pressão ( $\Delta P$ ), pode-se obter a pressão ótima de operação para a microfiltração e para a ultrafiltração. Estes resultados estão apresentados nas figuras 5.16 e 5.17, respectivamente.



**Figura 5.16. Fluxo do permeado na microfiltração para diferentes valores de pressão em regime estacionário.**

No caso da microfiltração do hidrolisado, na faixa de pressão estudada (1 a 1,8 bar ) não houve formação de torta (bloqueio de poros e/ou polarização) e a membrana permaneceu com a mesma resistência inicial.

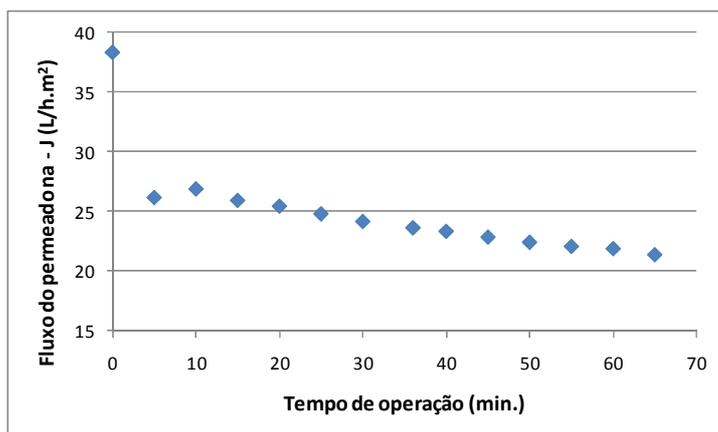


**Figura 5.17. Fluxo do permeado na ultrafiltração para diferentes valores de pressão em regime estacionário.**

Neste caso a relação entre fluxo e pressão deixa de ser linear. Isto pode ser observado nos resultados da UF em regime estacionário. Até 1,4 bar a filtração ocorre sem formação de torta. Para pressões maiores ocorre o bloqueio de poros e/ou polarização de concentração. Isto é confirmado pela redução no fluxo quando a pressão aumenta. Neste caso, o fluxo máximo (35,64 L/h.m<sup>2</sup>) ocorreu na pressão de 1,4 bar, determinando assim a pressão ótima de operação para a ultrafiltração.

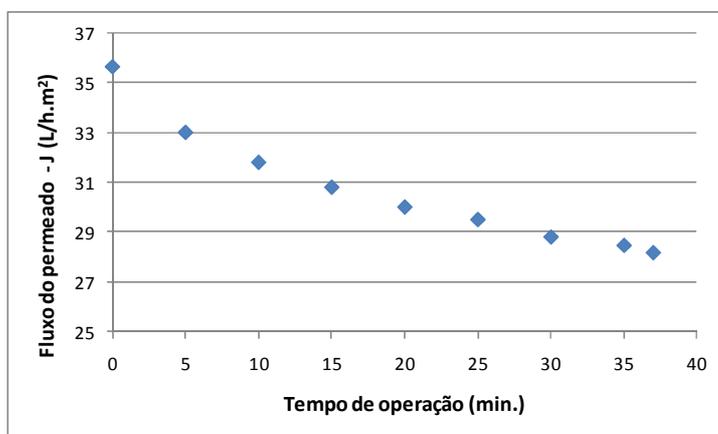
Como os resultados para a microfiltração apresentaram caráter linear, não foi possível estabelecer uma pressão ótima de operação e, portanto adotou-se a mesma pressão utilizada na ultrafiltração, igual a 1,4 bar.

Adicionalmente, o fluxo(J) ao longo do tempo de filtração, na pressão ótima de operação, foi verificado na microfiltração e na ultrafiltração (figuras 5.18 e 5.19).



**Figura 5.18. Fluxo do permeado na microfiltração a 1,4 bar ao longo do tempo de operação.**

Analisando a figura 5.18 pode-se perceber que na microfiltração ocorre uma queda significativa do fluxo durante os primeiros minutos de operação, isto corresponde ao tempo de polarização ou *fouling* da membrana. Entretanto após esta fase o sistema se comporta de maneira estável com pequenas variações no fluxo. Para aplicações industriais futuras e manutenção do fluxo em torno de 25 L/h.m<sup>2</sup>, recomenda-se a limpeza da membrana de microfiltração a cada 30 minutos de operação.



**Figura 5.19. Fluxo do permeado na ultrafiltração a 1,4 bar ao longo do tempo de operação.**

Já na figura 5.19 pode-se perceber que na ultrafiltração a polarização ou *fouling* da membrana se dá de forma mais lenta e o fluxo médio é mais alto do que o da microfiltração. Entretanto, para aplicações industriais futuras e manutenção do fluxo em torno de 29 L/h.m<sup>2</sup>, recomenda-se a limpeza da membrana de ultrafiltração a cada 30 minutos de operação.

## 5.6. Balanços materiais

As condições selecionadas para hidrólise do bagaço de cana a partir dos modelos empíricos gerados pela técnica de superfície de resposta foram: 100 g/L do substrato sem moagem prévia e carga de enzimas de 10 FPU/g. Estas condições foram fixadas para avaliar a eficiência do processo de hidrólise do bagaço em um reator de mistura acoplado a um sistema de separação com membranas de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF).

**Tabela 5.5. Balanços materiais para as frações obtidas após 14h de hidrólise utilizando o módulo de separação MF/UF.**

Frações	Retido MF	Permeado MF	Retido UF	Permeado UF	Recuperação UF (%)	Perdas UF (%)
Fator de concentração na UF	-	-	4x	4x	-	-
Ativ. de FPase (FPU/mL)	0,46	0,32	0,79	0,13	71,88	28,13
Ativ. de $\beta$ -glicosidase (UI/mL)	3,9	3,76	9,07	0,07	60,77	39,23
Conc. de glicose (g/L)	17,25	15,1	17,11	14,38	-	-
Volume (mL)	533	2316	579	1737	-	-
Frações	Retido MF	Permeado MF	Retido UF	Permeado UF	Recuperação UF (%)	Perdas UF (%)
Fator de concentração	-	-	11x	11x	-	-
Ativ. de FPase (FPU/mL)	0,405	0,201	0,407	0,089	22,43	77,57
Ativ. de $\beta$ -glicosidase (UI/mL)	3,71	2,01	9,49	0,13	43,51	56,49
Conc. de glicose (g/L)	17,85	19,55	9,67	17,8	-	-
Volume (mL)	180	1908	170	1300	-	-

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 5.5 pode-se observar que o fator de concentração volumétrico (FCV) foi um parâmetro determinante para o fracionamento das enzimas e do hidrolisado. Para um alto valor de FCV (11) observou-se uma melhor separação de açúcares e uma grande perda de atividade enzimática. Este resultado deve-se ao estresse causado pela recirculação das enzimas através da bomba. Já para um menor FCV (4), obteve-se uma razoável recuperação das enzimas e uma separação de açúcares menos eficiente.

Do ponto de vista industrial há uma grande vantagem em separar os açúcares do meio reacional, pois em altas concentrações de glicose, as enzimas podem ser inibidas durante a hidrólise promovendo um efeito negativo no rendimento do processo. Entretanto, a separação das enzimas permite a reutilização das mesmas em outras bateladas simples ou alimentadas ou ainda em reatores acoplados em série.

### 5.6.1. Batelada Alimentada

Os resultados conduzidos em batelada alimentada (FCV=11) com recuperação parcial das enzimas por UF foram comparados com aqueles obtidos em batelada simples (tabela 5.6).

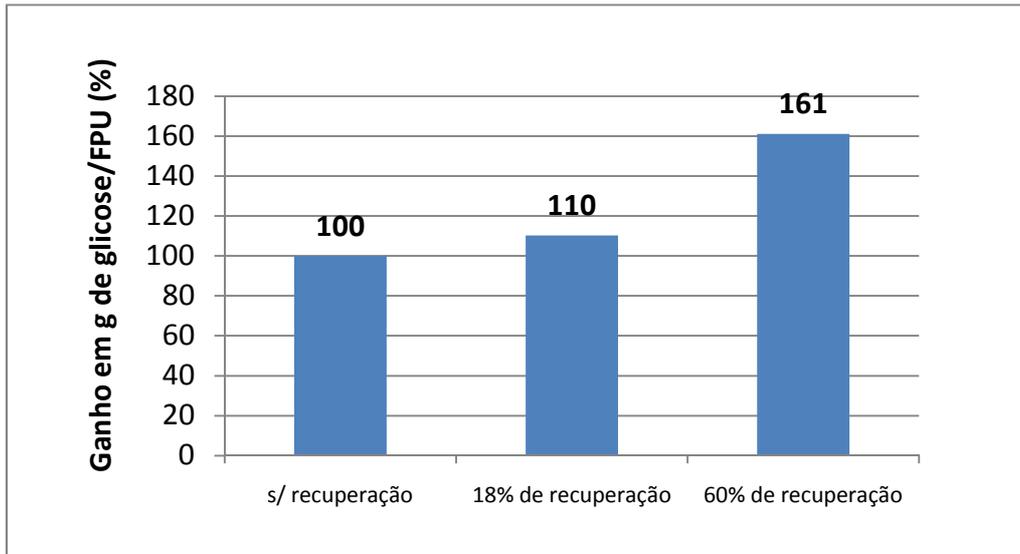
**Tabela 5.6. Comparação entre batelada simples e batelada alimentada na hidrólise enzimática do bagaço de cana tratado termicamente com vapor.**

	[Substrato] (g/L)	[Enzimas] (FPU/g)	[Glicose] (g/L)	Rendimento (%)	Glicose/FPU
Batelada Simples	100	10	26,92	55,51	2,69
Batelada Alimentada	100	8	27,87	57,46	3,48

O processo conduzido em batelada alimentada com recuperação de enzimas por UF apresentou um rendimento em glicose similar ao obtido em batelada simples, porém uma maior relação de glicose/FPU, provando ser mais eficiente para uma possível aplicação em escala industrial.

### 5.7. Comparação dos resultados principais

Com base nos resultados de bancada e na análise estatística, a melhor condição de hidrólise foi obtida com cargas de enzimas elevadas, da ordem de 15 FPU/g. Entretanto ao recuperar a enzimas no retido da ultrafiltração houve uma redução na demanda de enzimas a ser adicionada durante a realimentação do reator (figura 5.20).



**Figura 5.20. Ganho relativo em gramas de glicose por unidades de papel de filtro para a hidrólise enzimática do bagaço de cana tratado termicamente a vapor em processos do tipo batelada alimentada com recuperação de enzimas por UF.**

## 6. CONCLUSÕES

Pela avaliação estatística dos efeitos, aplicada aos principais parâmetros da hidrólise enzimática do bagaço de cana, concluiu-se que a carga de enzimas é um fator relevante para o processo com influência tanto no teor de açúcares gerados quanto no rendimento da sacarificação. O aumento da concentração de substrato até 100 g/L favoreceu a geração de xaropes com alto teor de glicose.

A análise estatística dos ensaios preliminares permitiu concluir que altas concentrações de substrato assim como partículas com menor granulometria dificultam a homogeneização da meio reacional. Isto ocorre devido ao alto caráter higroscópico do bagaço de cana.

Se comparado com dados da literatura, o tipo de pré-tratamento utilizado não favoreceu o rendimento de hidrólise, cujos valores se situaram entre 50-60% de rendimento em glicose. Outros tipos de pré-tratamento mais conhecidos como o de explosão a vapor utilizando um catalisador ácido pode atingir até 70-80% de rendimento.

A integração do reator de mistura com o sistema de separação e concentração das enzimas por membranas permitiu concluir que o fator de concentração volumétrico está diretamente associado à seletividade das enzimas na corrente retida da UF. Altos valores de fator de concentração favoreceram a separação dos açúcares que contribuem para a redução dos efeitos de inibição das enzimas por produto. Entretanto, nestes casos a atividade das enzimas foi muito baixa, devido provavelmente ao *stress* causado pela recirculação destas proteínas pela bomba.

O uso de tecnologia de membranas associada à hidrólise enzimática da biomassa de cana-de-açúcar permite a redução progressiva da carga de enzimas necessária à etapa de sacarificação uma vez que as enzimas recuperadas durante a ultrafiltração podem ser recicladas.

## 7. REFERÊNCIAS

ALVES, A.; GIERLINGER, N.; SCHWANNINGER, M. & RODRIGUES, J. Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood: Part 3. Evaluation of species-specific and tissue-specific differences in softwood lignin composition using principal component analysis. *J. of Analyt. and Appl. Pyrol.*, 85(1/2), 30-37, 2009.

ATALLA, R. H. The structures of native celluloses. In: *Foundation for biotechnical and industrial fermentation research*. Atalla, R. H. Ed.; Espoo, Finland. 8: 25-39. 1993

BON, E.; FERRARA, M.; CORVO, M. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: editora interciência, 2008.

BLANPAIN-AVET, P.; MIGDAL, J. F.; BÉNÉZECH, T. Chemical cleaning of a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate suspension—Characterization of hydraulic and chemical cleanliness. *Journal of Membrane Science*, 337, 153–174, 2009.

CARDOSO, O. A. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Microbiology Letters*, 223 (2): 309-314, 2003.

CARMINATTI, C. A. Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis*. Dissertação de Mestrado. Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2001.

CASSANO, A.; DRIOLI, E.; GALAVERNA, G.; MARCHELLI, R.; Di SILVESTRO, G.; CAGNASSO, P. Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. *Journal of foods engineering*, 57, p.153-163, 2003.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. *Tecnologia Enzimática*. Rio de Janeiro: editor EPUB, p. 21-22, 2008.

COUGHLAN, M. P. Cellulose degradation by fungi, p. 1–35. In W.M. Fogarty and C.T. Kelly (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*, 2nd ed., Elsevier Applied Science, London, 1990.

EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M. R. Sacharification of steam-exploded poplar wood. *Biotechnology Bioenergy*, v. 38, p.1308-1317, 1991.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure reactions walter de gruyter. Berlin, p.612, 1984.

FERREIRA FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system (review). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, p. 1093-1109, 1994.

FILHO, E. X. F., PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo- $\beta$ -1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. *Journal of Industrial Microbiology* 11, 171-180, 1993.

FOCHER, B.; MARZETTI, A.; CRESCENZI, V. Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications, Gordon and Breach, Reading, UK. p.413, 1988.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, v. 74, p. 78-88, 2006.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, p. 257-268, 1987.

GOSH, B.K.; GOSH A. Degradation of cellulose by fungal cellulase. Em: Winkelmann, G. (Ed.): *Microbial Degradation of Natural Products*. VCH, Verlag Weinheim, New York. p. 84-121, 1993.

GOTTSCHALK, L.M.F.. Lignina peroxidase de *Streptomyces viridosporus* T7A: produção em biorreator e concentração via processos com membranas, Tese de doutorado. COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.

GOTTSCHALK, L. M. F., BON, E. P. S., NOBREGA, R.. Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 147, p. 23-32, 2008.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de Separação por Membranas. Programa de Engenharia Química / COPPE / UFRJ. Rio de Janeiro: editora E-papers, 2006.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons. III. Heterogeneity of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Lignin with Respect to the Composition of Structural Units in Different Morphological Regions. 435 – 459, 1990.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L.G..No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. Energy Policy 37, 2450–2456, 2009.

IMTHURM, A.; RAMOS, L. P.; MATHIAS, A. L. Termoestabilidade de ligninas obtidas por explosão a vapor de cavacos de Pinus taeda à pirólise. In: 23a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas. Resumos. São Paulo, SP : Sociedade Brasileira de Química v. 2. p. TC 18., 2000.

INOUE, H.; YANO, S.; ENDO, T.; SAKAKI, T.; SAWYAMA, S. Combining hot-compressed water and Ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus. Applied Biotechnology for Biofuels., p. 9, 2008.

JACOBSEN, S.E.; WYMAN, C.E. Cellulose and Hemicellulose Hydrolysis Models for Application to Current and Novel Pretreatment Processes. Appl. Biochem. Biotechnol., 84(1-9): 81-96, 2000.

KRSTIC, D. M.; ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; HOLFINGER, W.; TEKIC, M. N.. The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. Biochem. Eng. J., 33(1): 10-15, 2007.

KUBICEK, C.P. Release of carboxymethyl-cellulase and b-glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. Applied. Microbiology Biotechnology, 13, 226–231, 1981.

LANDIM, A.B. Análise de grupos de pesquisa em enzimas no Brasil, Monografia em Engenharia Química. Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

LI, Z.; YOURAVONG, W.; H-KITTIKUN, A. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. Bioresour. Technol., 97(18): 2364-2370, 2006.

LIN Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69, p.627-642, 2006.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, 95: 391-414, 1969.

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná. Orientação: Professor Doutor Luiz Pereira Ramos. Curitiba, 2005.

MASSARANI, G. Fluidodinâmica em Sistemas Particulados. 2ª edição e-papers. Rio de Janeiro: Editora da UFRJ - 92 p., 2002.

MILLER, L. Use of a dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428, 1959.

MOURA, J. M. L. N., RIBEIRO, A. P. B., GRIMALDI, R., GONÇALVES, L. A. G.L. Reator de membrana enzimático e fluidos supercríticos: associação de processos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 4, p. 965-969, 2007.

NOVO NORDISK. A ação das enzimas (Revista informativa), 1996.

OLIVEIRA, R.A. Caracterização dos Materiais Lignocelulósicos Pré-tratados. XXXI Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural. Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

ÖNNERUD, H.; ZHANG, L.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle-Mediated Enzymatic Oxidation: A New Model in Lignin Biosynthesis I. *The Plant Cell*, 14, 1953–1962, 2002.

PEREIRA, L. T. C. e PEREIRA, L. T. C. Estudo Reológico da Mistura Reacional da Conversão Enzimática do Bagaço de Cana: Seleção do Tipo de Agitador - Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008. xiv,75p.;il. (Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2008.

PEREIRA JR., N. Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para a produção química. EQ/UFRJ, Prêmio Abiquim de Tecnologia, 2006.

PHILIPPIDIS, G.P.; SMITH, T.K.; WYMAN, C.E. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 846–853, 1993.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, p.863-871, 2003.

REVISTA BRASILEIRA DE BIOENERGIA – Biocombustíveis de segunda geração: o futuro passa por aqui. Ano 3, N° 7 – São Paulo Agosto de 2009.

ROSEIRO, J. C.; CONCEIÇÃO, A. C.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.. Membrane concentration of fungal cellulases. *Bioresour. Technol.*, 43(2) :155-160, 1993.

TAKAC, S. ELMAS, S.; CALIK, P.; OZDAMAR, T. H. Separation of the protease enzymes of *Bacillus licheniformis* from the fermentation medium by crossflow ultrafiltration. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 75(6):491-499,2000.

TAVARES, A. P. M., COELHO, M. A. Z., COUTINHO, J.A.P., XAVIER, A. M. R. B. Optimization and modelling of laccase production by *Trametes versicolor* in bioreactor using statistical experimental design, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, in press 2006.

SELIG, M.J., KNOSHAUG, E.P., ADNEY, W.S., HIMMEL, M.E., DECKER, S.R.. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Bioresource Technology* 99, 4997– 5005, 2008.

SLUITER A., HAMES B., RUIZ R., SCARLATA C., SLUITER J.; TEMPLETON D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: NREL laboratory analytical procedure. Golden, CO; NREL; 2006.

VIANA, P.Z. Biorreator com membrana aplicado ao tratamento de esgotos domésticos: avaliação do desempenho de módulos de membranas com circulação externa, Tese de mestrado. COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

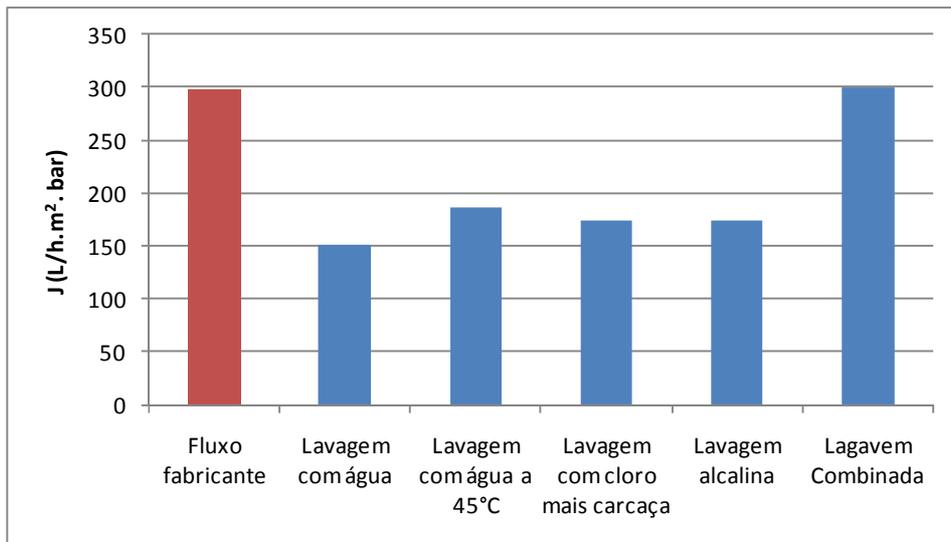
WITHERS, S.G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses. *Carbohydr. Polym.*, 44, 325–337, 2001.

ZEMAN, L. J.; ZYDNEY, A. L. Microfiltration and Ultrafiltration: principles and applications. Ed. Marcel Dekker, New York, 618p. 1996.

# APÊNDICES

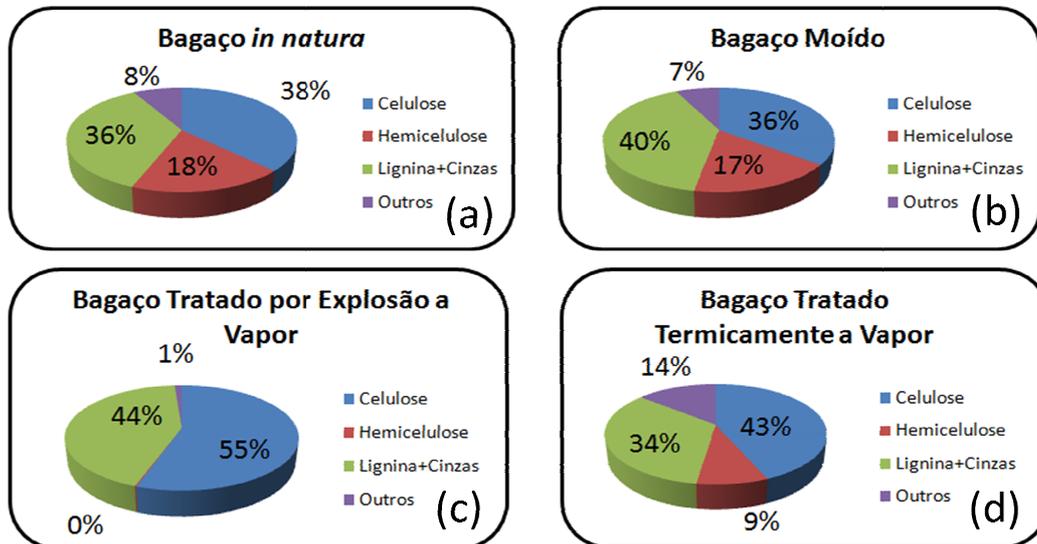
## APÊNDICE A

**REGENERAÇÃO DO FLUXO DO PERMEADO ATRAVÉS DE DIFERENTES  
PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA DAS MEMBRANAS.**



## APÊNDICE B

### CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES MATERIAIS DE ORIGEM LIGNOCELULÓSICA PRÉ-TRATADOS OU NÃO POR DIFERENTES METODOLOGIAS (OLIVEIRA, 2009)



(a) - Bagaço *in natura*; (b) - Bagaço tratado por moagem 20  $\mu\text{m}$ ; (c) Bagaço tratado por explosão a vapor; (d) - Bagaço tratado termicamente com vapor.

## APÊNDICE C

**PERFIS DE RENDIMENTO EM GLICOSE NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES MATERIAIS DE ORIGEM LIGNOCELULÓSICA PRÉ-TRATADOS OU NÃO POR DIFERENTES METODOLOGIAS (OLIVEIRA, 2009).**

