

Estudo de misturas de enzimas (complexo celulásico, complexo enzimático, xilanase, β -glucanase e xilanase, β -glucosidase e Glucoamilase) na bioconversão do bagaço da cana-de-açúcar em etanol

Study of mix of enzymes (cellulose complex, xylanase, β -glucosidase, enzyme complex, β -glucanase, β -glucosidase e Glucoamylase) for bioconversion of the sugarcane bagasse on etanol

DOI:10.34117/bjdv5n6-177

Recebimento dos originais: 16/04/2019

Aceitação para publicação: 14/05/2019

Rosiane Fernandes Moreira

Doutoranda em Química–Programa de Pós-graduação em Química - (PPGQ)

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01. Bairro: Guamá. CEP: 66075-110. Belém-PA-Brasil

E-mail: rosiane.eng@gmail.com

Ossalin de Almeida

Doutor em Engenharia de Recursos Naturais pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01. Bairro: Guamá. CEP: 66075-110. Belém-PA-Brasil

E-mail: ossalin@ufpa.br

Antônio Maia de Jesus Chaves Neto

Doutorado em Física pela Universidade Estadual de Campinas(UNICAMP)-SP.

Instituição: Universidade Federal do Pará, Faculdade de Física-ICEN; Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia (PRODERNA); Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ)

Endereço: Rua Augusto Corrêa, 01 - Setor Básico-CEP 66075-110 Belém - Pará - Brasil

E-mail: antmchaves@yahoo.com.br / amchaves@ufpa.br

Nélio Teixeira Machado

Doutor em Engenharia química pela Universidade Federal de Santa Catarina

Doutor em Engenharia de Processos. Technische Universität Hamburg-Harburg, TUHH, Alemanha.

Instituição: Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia Sanitária e Ambiental, e Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia (PRODERNA)

Endereço: Rua Augusto Correa Nº 1, Campus Profissional I, LEQ-Guamá, 66075910 - Belém, PA - Brasil - Caixa-postal: 8619

E-mail: machado@ufpa.br

RESUMO

Utilizando o bagaço de cana-de-açúcar na bioconversão de celulose em glicose para produzir etanol, foi escolhido o processo de hidrólise enzimática com objetivo de avaliar a utilização da combinação das enzimas comerciais Xilanase, β -glucanase-Xilanase e β -glucanase na

proporção de 0,6:0,3:1,7 em massa. O pré-tratamento consistiu na lavagem, secagem, moagem, armazenagem e a polpação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar na temperatura ambiente, a 70°C, 90°C e 120°C. As fermentações ocorreram a 50 ± 2 °C. Os rendimentos no processo de hidrólise enzimática foram de 30,64% (PACTA), 44,00% (PAC70), 65,91% (PAC90) e 94,35% (PAC120) e os rendimentos do etanol foram de 16,17% (PACTA), 20,09% (PAC70), 33,33% (PAC90) e 34,51% (PAC120). Os teores de cinzas para o BCA foram de $2,05\% \pm 0,027$ (PACTA), $0,62\% \pm 0,013$ (PAC70), $0,48\% \pm 0,007$ (PAC90) e $0,18\% \pm 0,008$ (PAC120). Os teores de lignina foram de $20,67 \pm 0,603$ (PACTA), $13,03 \pm 0,711$ (PAC70), $6,05 \pm 0,196$ (PAC90) e $5,49 \pm 0,151$ (PAC120). Os resultados obtidos sugerem que as taxas de conversão dos resíduos celulósicos em glicose são fortemente dependentes da temperatura no processo de polpação alcalina.

Palavras chaves: enzimas, resíduo, polpação alcalina.

ABSTRACT

Using sugarcane bagasse (SCB) in the pulp bioconversion of glucose to produce ethanol, the enzymatic hydrolysis process was chosen to evaluate the use of the combination of commercial enzyme xylanase, β -glucanase, xylanase and β -glucanase in the proportion of 0.6:0.3:1.7 by weight. The pre-treatment consisted of washing, drying, crushing, storage and alkaline pulping of sugarcane bagasse at room temperature, at 70 °C, 90°C and 120°C. The fermentation took place at 50 ± 2 °C. The yields in the enzymatic hydrolysis process were 30.64 % (PACTA), 44.00 % (PAC70), 65.91 % (PAC90) and 94.35 % (PAC120) and ethanol yields were 16.17 % (PACTA), 20.09 % (PAC70), 33.33 % (PAC90) and 34.51 % (PAC120). The gray content for PCA were $2.05\% \pm 0.027$ (PACTA), $0.62\% \pm 0.013$ (PCA70), $0.48\% \pm 0.007$ (PCA90) and $0.18\% \pm 0.008$ (PCA120). The lignin contents were $20,67 \pm 0,603$ (PACTA), $13,03 \pm 0,711$ (PAC70), $6,05 \pm 0,196$ (PAC90) e $5,49 \pm 0,151$ (PAC120). The results suggest that the conversion rates of cellulosic waste into glucose are strongly dependent on temperature in the alkaline pulping process.

Keywords: enzymes, residue, alkaline pulping.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar que pode ser utilizado para produzir o açúcar, etanol e etc., gerando grandes quantidades de resíduos no setor sucroalcooleiro. O bagaço de cana-de-açúcar é usado atualmente como a principal fonte de energia necessária em usinas de açúcar e destilarias de álcool e também para a geração de energia elétrica, etc. (ROCHA et al., 2011). Ele é um material lignocelulósico mais estudado para a produção de etanol de segunda geração sem necessidade de aumentar a área de plantio e reduzir os impactos ambientais (ALBARELLI, 2013). Nas últimas décadas, a necessidade por fontes alternativas de energia se tornou uma grande preocupação incitando o crescimento e o desenvolvimento de pesquisas no segmento de energias sustentáveis (MANDELLI et al., 2014).

A biomassa lignocelulósico, tais como palhas de cereais estão disponíveis em grandes quantidades e pode ser facilmente fermentado para produzir o etanol, que pode ser usado tanto como um combustível para motores em forma pura ou como um componente de mistura de gasolina (SOUZA, 2006).

No Brasil, o resíduo mais abundante é o bagaço de cana de açúcar que é constituído principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de produtos extraíveis e sais minerais (ALBARELLI, 2013;GHOSE, 1987; ROCHA, 2011). A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas e sua composição pode variar em função do tipo de cana, do solo, do clima, da disponibilidade de água e da época na safra, dentre outros aspectos (SOUZA, 2006).

Para a produção de etanol é requerida algumas etapas principais como: pré-tratamento da biomassa que podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto; hidrólise enzimática da celulose para obtenção de monossacarídeos onde se tem altos rendimentos fermentescíveis sem formação de inibidores e à não-degradação da glicose que é realizada a temperaturas brandas, em torno de 50 °C e pH de 4,8 para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático; a fermentação e destilação o bagaço seguiria os mesmos processos na produção de etanol convencional (ALBARELLI, 2013; SANTOS e GOUVEIA, 2009;SILVA, 2010).

Neste trabalho foi escolhido o processo de hidrólise enzimática com objetivo de avaliar as misturas das enzimas comerciais (complexo celulásico, xilanase, β -glucosidase, complexo enzimático, β -glucanase e xilanase e glucoamilase) cedidas pelo laboratório Novozymes. Utilizando como matéria prima o bagaço de cana-de-açúcar na bioconversão de celulose em glicose para produzir etanol.

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar que foram obtidas nas feiras livres de Belém-PA consistiu na lavagem, secagem, moagem, armazenagem das amostras secas em sacos plásticos e a polpação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar na temperatura ambiente, a 70°C, 90°C e 120°C. Depois foi realizada a atividade das enzimas para saber a carga enzimática das mesmas para realizar as misturas enzimáticas para serem utilizadas no processo de hidrólise. Segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade enzimática total (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μ mol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos

de reação. Após o processo de hidrólise enzimática foi realizada a fermentação alcoólica dos mostos e em seguida a destilação simples para obtenção do etanol.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da combinação das enzimas Xilanase (NS22083), β -glucanase Xilanase (NS22002) e β -glucanase (NS22118) na proporção de 0,6:0,3:1,7 (m/m) na produção de glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamento alcalino com solução de NaOH (6% m/v) em quatro temperaturas, ambiente (28,5 °C) (PACTA), a 70, a 90 °C (PAC70 e PAC90) e a 120 °C (PAC120) no processo de hidrólise enzimática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ENZIMAS

As enzimas utilizadas neste estudo corresponderam às preparações comerciais (CellulosicEthanolEnzyme Kit) fornecidas pela NovozymesLatinAmerica (Araucária-PR, Brasil): (E1) complexo celulásico (NS22086), (E2) xilanase (NS22083), (E3) β -glucosidase (NS22118), (E4) complexo enzimático (NS22119), (E5) β -glucanase e xilanase (NS22002) e (E6) glucoamilase (NS22035).

2.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E PRÉ- TRATAMENTO DO BCA

O bagaço de cana-de-açúcar (10 kg *in natura*) foi coletada em pontos de venda de caldo de cana na área metropolitana de Belém-PA. A preparação do bagaço de cana consistiu de lavagem com água corrente para a retirada do melaço e impurezas, secagem natural à temperatura ambiente (30,5 °C, 72 h) para a remoção do excesso de umidade e secagem em estufa com circulação de ar (MARCONI-035) a $50 \pm 3^\circ\text{C}$, até atingir peso constante.

2.3. CARACTERIZAÇÃO DO BCA

O bagaço de cana seco foi triturado em moinho de facas (WILLEY, WILLEY-BT 602) e acondicionado em sacos plásticos. Os teores de umidade e cinzas foram determinados conforme metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (1984). O teor de lignina total foi determinado de acordo com o método de Klason modificado.

2.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática total foi determinada de acordo a International Union of Pure and Applied Chemistry (1996). Em tubos de ensaio, contendo uma tira de papel

WhatmanN° 1 (1,0 cm x 6,0 cm), pesando aproximadamente 50 mg, foram transferidos 0,5 mL do complexo enzimático e 1 mL de solução tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). Na prova em branco o complexo enzimático foi substituído pela solução tampão acetato de sódio (5 mL, pH 4,8). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a 50 ± 2 °C durante 60 minutos. Após o tempo de incubação, foram adicionados 3 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), posteriormente, os tubos foram colocados em banho maria até ebulição ($T \approx 100$ °C) durante 5 minutos, depois foram adicionados 20 mL de água destilada, em seguida, os tubos foram levemente agitados para a completa homogeneização da mistura. A atividade enzimática total foi determinada de acordo com a Equação (1)

$$U. mL^{-1} = ART \cdot \frac{V_T}{0,18 \cdot V_C \cdot t} \quad (1)$$

Onde, *ART* são os açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise ($mg \cdot mL^{-1}$), V_T é o volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do caldo) (mL), V_C é o volume do caldo utilizado na hidrólise (mL), t é o tempo de hidrólise (min) e 0,18 é equivalente a 1 μ mol de glicose (mg).

2.5. AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART)

As concentrações de açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), mediante a construção da curva padrão de glicose nas concentrações de 0,1 a 1,0 $g \cdot L^{-1}$. A concentração de glicose foi determinada em um espectrofotômetro digital (ThermoScientific, Modelo Genesys 10S UV-Vis) a 540 nm.

2.6. DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA

O processo de deslignificação foi realizado em um Erlenmeyer (3L), contendo 150 g do BCA seco e moído, seguido da adição de 2 L de solução de hidróxido de sódio a 6% (m/v), a polpa do bagaço foi submetida a explosão a vapor na temperatura de 120 °C e pressão de aproximadamente 1,2 - 1,6 atm, durante 1 hora. A mistura resultante foi filtrada em funil de placa sinterizada (N° 1), o resíduo foi lavado com água corrente e neutralizado

com ácido sulfúrico 1:8 (v/v), posteriormente, submetido à secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BCA

Ensaio preliminares de hidrólise do BCA, objetivaram, avaliar a melhor combinação de enzimas no processo de hidrólise do BCA com massa reduzida, foram realizados ensaios em seis condições experimentais C1= 35,78 g.L⁻¹; C2= 34,92 g.L⁻¹; C3=34,98 g.L⁻¹; C4=34,17; C5=34,95 g.L⁻¹ e C6=34,85 g.L⁻¹ (concentração média da polpa do BCA). A carga enzimática (total) usada para cada ensaio foi de 10% em massa com relação a massa do substrato (m/m).

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 100 mL, contendo o BCA pré-tratado, 25 mL de água destilada e 5 mL de solução tampão de citrato (pH = 4,8). A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a 50 ± 2 °C, foram realizadas coletas para os tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A inativação enzimática foi realizada em água fervente (T ≈ 100 °C) durante 5 minutos. Para separar o hidrolisado da polpa, a mistura foi filtrada em cadinho de placa sinterizada (N° 1). As concentrações de ART foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A concentração de glicose foi determinada em um espectrofotômetro digital (BIOSPECTRO, Faixa de 340-1000 nm, Modelo SP-12) a 540 nm. O procedimento se repetiu para as combinações (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). Em paralelo, foi realizada a prova em branco para cada ensaio, substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (30 mL, pH 4,8). Os ensaios foram realizados em duplicatas.

Mediante a análise preliminar dos resultados de hidrólise do BCA com massa reduzida, novos ensaios foram realizados usando a combinação de enzimas que apresentou a melhor conversão do material celulósico em glicose. A amostra foi submetida à hidrólise enzimática em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 10 g do bagaço, 200 mL de água, o pH foi ajustado com solução tampão de citrato para 4,8. A concentração média inicial do BCA foi de 50,28 g.L⁻¹. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

A incubação e as concentrações de ART foram realizadas como descrito para massa reduzida. Em paralelo, para cada ensaio, foi realizada a prova em branco substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (200 mL, pH 4,8).

2.8. FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DOS HIDROLISADOS DO BCA

Os hidrolisados do BCA obtidos no tempo de 120 horas foram submetidos ao processo de fermentação alcoólica. Antes do início da fermentação, foi necessário fazer a inativação enzimática e a filtração dos hidrolisados, conforme descrito no procedimento de hidrólise para massas reduzidas.

As fermentações alcoólicas foram realizadas em Erlenmeyers de 500 mL, contendo, 200 mL do hidrolisado com o pH ajustado para 4 com ácido sulfúrico 1:1 (v/v), a inoculação do mosto foi feita com a adição de 2 g de fermento comercial seco (*Saccharomyces cerevisiae*), correspondendo a uma concentração inicial da levedura de 1% (m/v). A mistura foi submetida à incubação em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a 30 ± 2 °C, durante 24 horas. O etanol produzido foi obtido por destilação simples.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CINZAS E LIGNINAS

Os teores de cinzas e lignina total (solúvel + insolúvel) nas amostras do BCA (*in natura*) e após o tratamento alcalino (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Teores de cinzas e de ligninado BCA.

Amostra	Cinzas (%)	Lignina (%)
BCA (<i>in natura</i>)	$5,20 \pm 0,15$	$22,30 \pm 0,320$
PACTA	$2,05 \pm 0,03$	$20,44 \pm 0,005$
PAC70	$0,62 \pm 0,01$	$13,18 \pm 0,007$
PAC90	$0,48 \pm 0,01$	$5,95 \pm 0,002$
PAC120	$0,18 \pm 0,01$	$5,49 \pm 0,002$

Para o BCA (*in natura*, $T_{\text{Média}} = 28,5$ °C), os resultados apresentam pequenas variações quando comparados aos da literatura, cinzas (1,5-5%, MONTE, 2009) e lignina (26,27%, CANILHA et al., 2007), que pode ocorrer em função da variedade da cana e da localização geográfica dos locais de cultivo.

Para as amostras do BCA obtidas por diferentes tratamentos (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), ficou evidenciado, que a temperatura influenciou na solubilidade da lignina, que pode ser atribuída ao pré-tratamento com o hidróxido de sódio proporcionando o aumento da

área superficial interna da celulose e diminuindo o grau de polimerização. A maior remoção ocorreu nas temperaturas de 120 °C (75,38%, PAC120) e 90°C (73,32%, PAC90), considerando o total de lignina na amostra inicial (22,30%, BCA).

Uma hipótese para este comportamento se refere à ocorrência de reações de condensação que podem ocorrer na estrutura molecular da lignina, entre seus grupos fenólicos e fragmentos fenólicos de outros compostos presentes no BCA, o que sugere um aumento na sua massa molecular, provocado pelo rearranjo estrutural da lignina.

3.2. POLPAÇÃO ALCALINA DO BAGAÇO DECANA-DE-AÇÚCAR

Os rendimentos médios (Tabela 2) em base seca das polpas do BCA, obtidas após o processo de deslignificação está diretamente relacionado com a temperatura, conforme o aumento da temperatura se obteve um maior rendimento, devido à ação do hidróxido de sódio que abre a estrutura do BCA para o ataque de celulose pela celulase, sendo a melhor condição de tratamento obtida na PAC120.

Tabela 2-Rendimento da Polpação do BCA Seco.

Amostra	BCA (%)
PACTA	30,64 ± 1,80
PAC70	44,00 ± 2,37
PAC90	65,91 ± 1,45
PAC120	94,35 ± 2,06

Na Figura 1, são ilustrados os BCA secos após a polpação alcalina nas diferentes temperaturas (Ambiente, 70°C, 90°C e 120°C) e observa-se fisicamente que a estrutura do BCA seco sofreu modificações após o pré-tratamento alcalino, sendo que a temperatura foi o principal fator, já que todas as amostras foram submetidas à ação da solução de hidróxido de sódio a 6% (m/v).

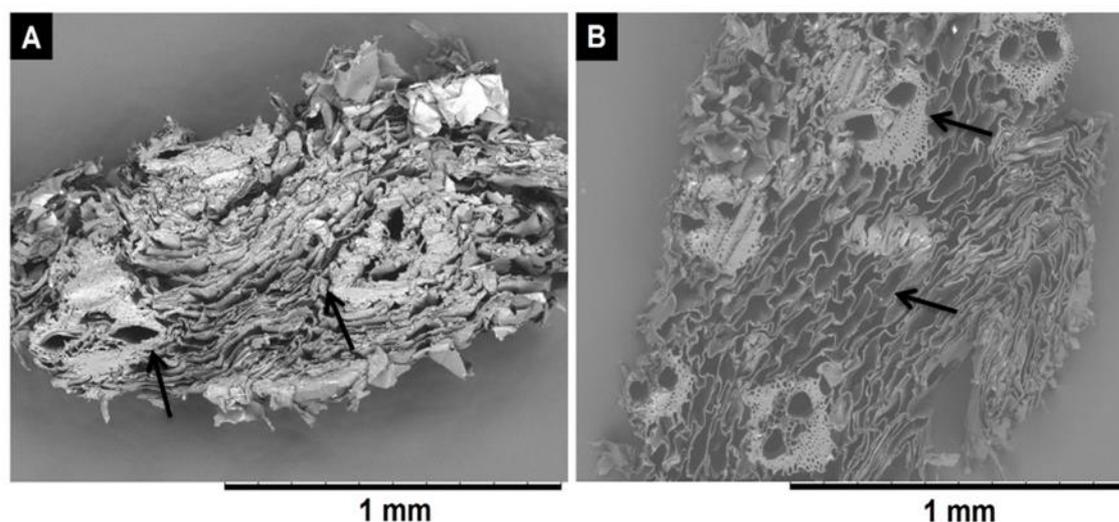
Figura 1 – Polpas do BCA após Pré-tratamento Alcalino.



3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Nos detalhes apresentados (setas), é ilustrada a presença de flocos de medula, bem como uma estrutura compacta Figura 2-A, com fibras unidas pela presença de hemicelulose e lignina, e Figura 2-B, ilustra-se que o pré-tratamento utilizado na amostra proporcionou em parte a deslignificação e com isso abrindo as fibras da estrutura do PACTA e tornando-as mais acessíveis à ação enzimática. Na Figura 2, são ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do BCA seco *in natura* e do PACTA com aumento de 100x.

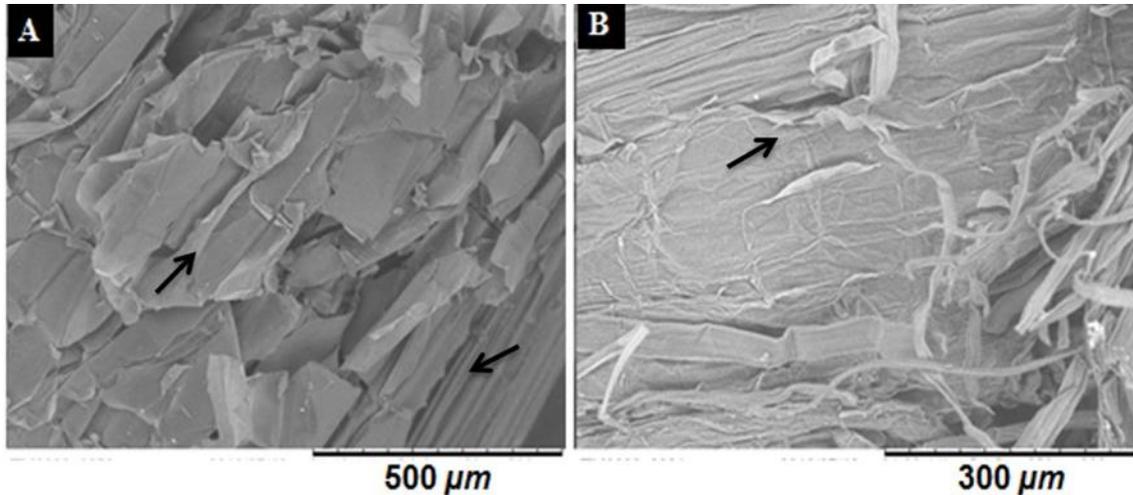
Figura 2 – Micrografias das amostras: (A) BCA seco *in natura* e (B) PACTA.



Nos detalhes apresentados (setas) na Figura 3-A são ilustrados a presença de flocos de medula e fibras da estrutura da PACTA, Figura 3-B ilustra-se que o efeito do pré-tratamento proporcionou a fragmentação da estrutura morfológica do material lignocelulósico, preservando uma grande parte do material, e proporcionou também a abertura na estrutura morfológica do bagaço, que ainda contém uma boa parte do material unido. Na Figura 3, são

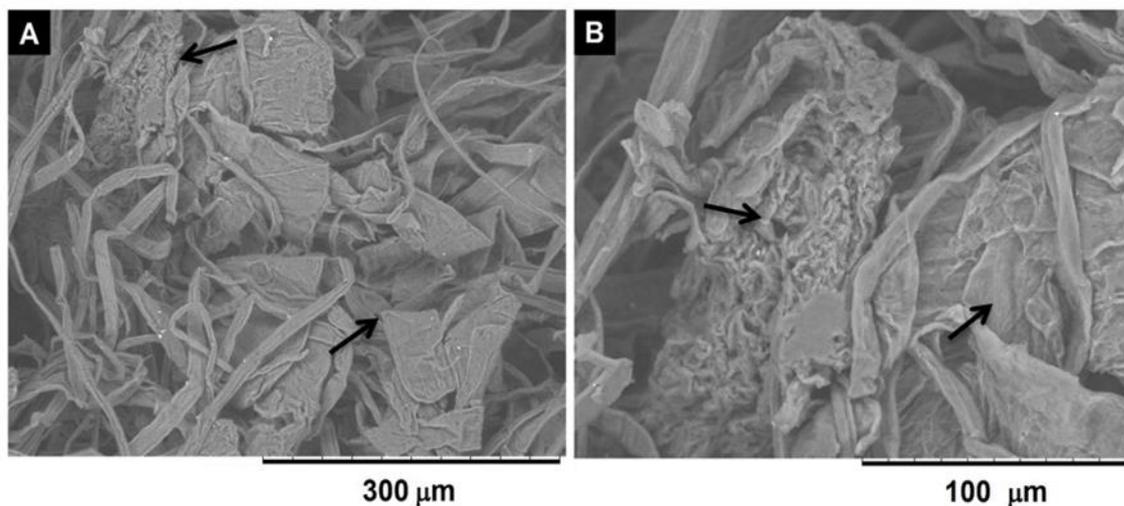
ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do PACTA (A) com aumento de 150 x e PAC70 (B) com aumento de 250x.

Figura 3–Micrografias das amostras: (A) PACTA e a (B) PAC70.



Nos detalhes apresentados (setas), Figura4-A é ilustrada a presença de uma estrutura compactada, fibras unidas pela presença de hemicelulose e lignina, devido à deslignificação alcalina proporcionando maior fragmentação da medula e a Figura 4-B é ilustrada a presença de flocos de medula. Na Figura 4 são ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do PAC90 com ampliação de 300x (A) e 800x (B).

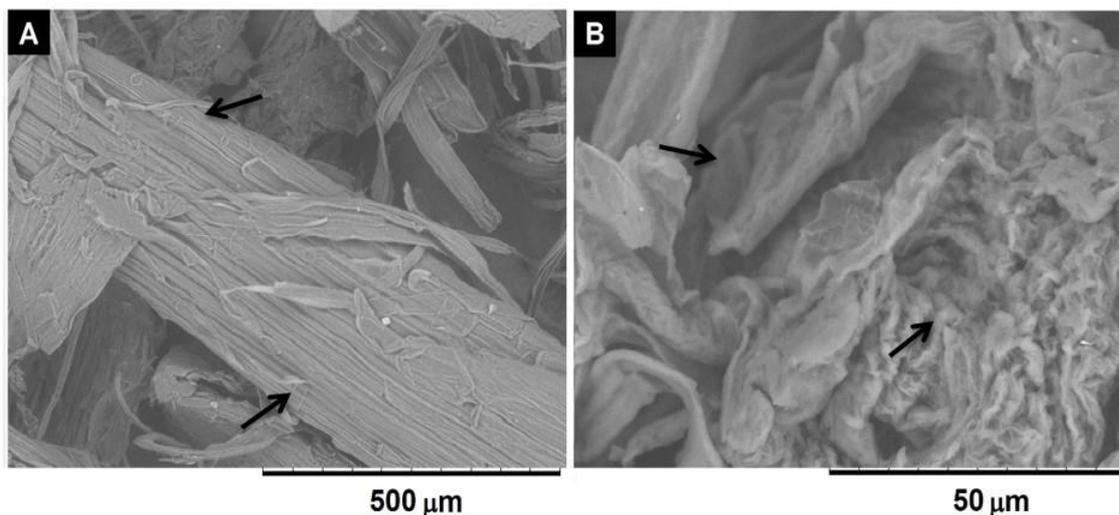
Figura 4 - Micrografias (A) e (B) da amostra PAC90.



Nos detalhes apresentados (setas), Figura5-A é ilustrada a presença de fibras da estrutura mais nítidas da PAC120, devido à deslignificação alcalina proporcionando maior

fragmentação da medula. Figura 5-B é ilustrada a presença de flocos de medula mais finos do que a Figura 3-A, que são ilustrados laminas de flocos de medula. Na Figura 5 são ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do PAC120 com ampliação de 180x (A) e em (B) ampliação de 1.8k.

Figura 5 – Micrografias (A) e (B) da amostra PAC120.



Comparando as micrografias do BCA seco do pré-tratamento em diferentes temperaturas (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), evidencia uma maior abertura e fragmentação dos tecidos vegetais quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e observa-se que as fibras estão mais nítidas devido à fragmentação da medula, deixando a estrutura da celulose mais exposta ao ataque enzimático. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu verificar as diferenças morfológicas entre a matriz no estado *in natura* e após deslignificação alcalina das amostras analisadas.

3.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Com os dados obtidos da curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. A atividade enzimática do complexo celulásico (E1) foi de 22,12 FPU.mL⁻¹, xilanase (E2) foi de 8,13 FPU.mL⁻¹, β-glucosidase (E3) foi de 14,84 FPU.mL⁻¹, complexo enzimático (E4) foi de 13,93 FPU.mL⁻¹, β-glucanase e Xilanase (E6) foi de 4,60 FPU.mL⁻¹ e glucoamilase (E6) foi de 5,31 FPU.mL⁻¹.

Com os resultados da atividade enzimática obtidos pelo método do papel de filtro, foram definidas as cargas enzimáticas necessárias para adicionar a proporção de cada

enzima, formando as combinações enzimáticas (Tabela 3) utilizadas nos ensaios de hidrólise do BCA.

Tabela 3 – Carga enzimática total usada na hidrólise do BCA.

Enzima	Nome	Combinação Enzimas	M ₁ [g]	M ₂ [g]	¹ FPU.mL ⁻¹
E1	Complexo Celulásico	C1 (E1:E3:E4)	0,35	1,05	70,92
E2	Xilanase	C2 (E1:E2:E3)	0,35	1,05	62,83
E3	β-glucosidase	C3 (E1:E3:E6)	0,35	1,05	58,9
E4	Complexo Enzimático	C4 (E1:E2:E4)	0,35	1,05	61,56
E5	β-glucanase-Xilanase	C5 (E2:E5:E6)	0,35	1,05	25,14
E6	Glucoamilase	C6 (E4:E5:E6)	0,35	1,05	33,23

Nota: (M₁ e M₂) massas do complexo enzimático (individual).

3.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os testes preliminares foram realizados para se comparar os métodos analíticos a serem utilizados, eliminar possíveis causas de erros sistemáticos e definir um tempo ideal de análise das respostas para as hidrólises. De acordo com os resultados das concentrações de glicose obtidas na hidrólise enzimática (massa reduzida), observa-se uma variação significativa dos teores de ART's, no final do processo de hidrólise enzimática.

A C2 (Tabela 4) foi que se obteve maior taxa de conversão de celulose em glicose. O aumento da temperatura no pré-tratamento da polpação alcalina no BCA influenciou no processo de hidrólise enzimática proporcionando uma melhor ruptura das ligações de hidrogênio que une as fibras de celulose e melhor solubilização da hemicelulose favorecendo maior taxa de conversão de celulose em glicose para PAC120. O pH inicial foi de 4,8 e no final do processo variou entre 4,8 - 4,9 permanecendo dentro da faixa de trabalho (Tabela 4).

Tabela 4 – Hidrólise Enzimática (Massa Reduzida) do BCA.

Amostra		Combinação Enzimática					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
PACTA	Glicose [g.L ⁻¹]	0,25	0,32	0,17	0,17	0,17	0,27
	Rend. [%]	24,15	30,71	16,73	16,42	16,56	26,63
	pH Final	4,90	4,92	4,94	4,92	4,92	4,86
PAC70	Glicose [g.L ⁻¹]	0,15	0,23	0,15	0,17	0,12	0,12
	Rend. [%]	14,6	22,41	14,78	16,27	11,35	11,73
	pH Final	4,93	4,90	4,92	4,91	4,93	4,89
PAC90	Glicose [g.L ⁻¹]	0,27	0,38	0,27	0,32	0,25	0,18
	Rend. [%]	26,83	37,58	26,34	31,91	24,71	17,48
	pH Final	4,92	4,88	4,89	4,87	4,9	4,89
PAC120	Glicose [g.L ⁻¹]	0,29	0,48	0,31	0,35	0,33	0,18
	Rend. [%]	26,77	45,41	29,52	34,28	31,88	17,5
	pH Final	4,90	4,92	4,94	4,92	4,92	4,86

De acordo com os resultados das concentrações de glicose obtidas na hidrólise enzimática (Massa = 10 g), observa-se uma variação significativa dos teores de ART's, no final do processo de hidrólise enzimática. Os teores médios de ART's para as amostras PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 conforme ilustrado na Tabela 5. Estes resultados são compatíveis com as massas médias residuais de 7,6 g (PACTA), 5,4 g (PAC70), 4,8 (PAC90) e 0,9 g (PAC120), obtidas por filtração e submetidas à secagem em estufa a 105°C, durante 24 horas. A melhor taxa de conversão de celulose em glicose foi obtida em 120 h de reação, correspondente a relação C2.

A massa teórica calculada de glicose foi de 9,44 g.mol⁻¹. Os cálculos referem-se a 10 g da amostra usadas na hidrólise. O tempo de 120 h horas foi escolhido para realizar a modelagem da cinética enzimática das hidrólises, sendo coletadas a cada 24 h.

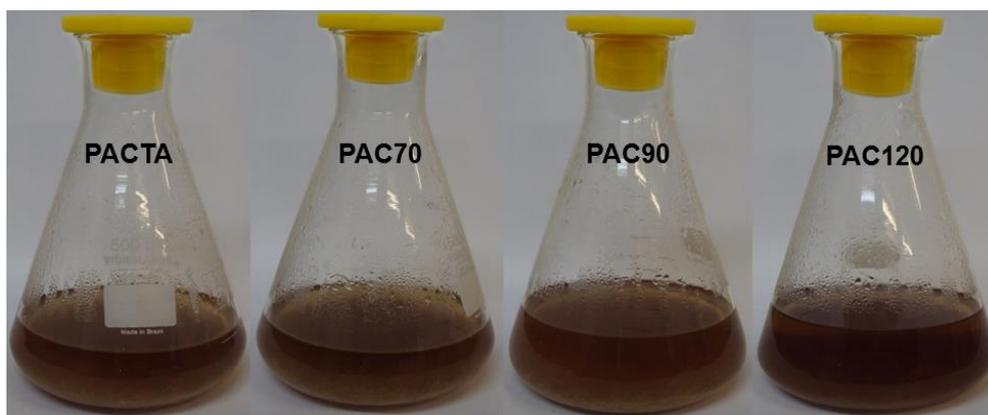
Tabela 5 – Hidrólise Enzimática (Massa = 10 g) do BCA.

Amostra	Tempo [h]					
	0	24	48	72	96	120
Glicose[g.L ⁻¹]	0	0,816	1,219	1,393	1,804	2,386
PACTA Rend. [%]	0	8,15	12,15	13,84	17,98	23,82
U.mL ⁻¹	-	2462,96	1839,11	1400,41	1360,17	1439,75
Glicose[g.L ⁻¹]	0	1,178	2,842	3,393	3,882	4,572
PAC70 Rend. [%]	0	11,72	28,22	33,45	38,4	45,6
U.mL ⁻¹	-	3552,96	4286,11	3411,93	2927,59	2758,29
Glicose[g.L ⁻¹]	0	1,657	2,517	3,595	4,728	5,186
PAC90 Rend. [%]	0	16,52	25,1	35,76	47,09	51,48
U.mL ⁻¹	-	4998,96	3797,15	3614,84	3565,43	3128,8
Glicose[g.L ⁻¹]	0	1,581	3,348	5,919	8,318	9,089
PAC120 Rend. [%]	0	15,81	33,3	58,81	82,69	90,23
U.mL ⁻¹	-	4770,41	5049,77	5951,59	6273,4	5483,72

3.6. FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Na Figura 6 são ilustrados os licores das amostras (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) obtidos da fermentação alcóolica após 24 h de incubação. O mosto fermentado foi destilado para obtenção do etanol.

Figura 6 - Licores do hidrolisado após fermentação alcóolica.



A análise dos resultados do rendimento do etanol (Tabela 6) pode-se inferir que as amostras obtiveram um aumento de rendimento conforme foi o aumento do período de

incubação. Portanto a temperatura no tratamento das amostras influenciou no melhor rendimento no qual obteve um resultado mais expressivo na PAC120.

Tabela 6 – Rendimento do Etanol.

Amostra	EtOH _M [mL]	EtOH _M [g]	Rend.Médio [%]	
			Glicose	Etanol
PACTA	2,05	1,62	23,82	16,17
PAC70	2,55	2,02	45,60	20,09
PAC90	4,25	3,36	51,48	33,33
PAC120	4,40	3,48	90,23	34,51

4. CONCLUSÕES

O pré-tratamento alcalino nas amostras influenciou nos teores médios em base seca, por extrair uma boa parte dos componentes menores e diminuir o teor de lignina, com isso, aumentando a área superficial da estrutura da celulose e facilitando o ataque enzimático. As análises de MEV ilustraram que o pré-tratamento proporcionou uma abertura na estrutura morfológica do bagaço, tornando a celulose mais expostas. Analisando todos os resultados apresentados neste trabalho, o pré-tratamento da biomassa em estudo proporcionou um melhor rendimento em todos os processos para a PAC120.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Novozymes Latin América (Araucária, PR) pelo fornecimento das enzimas comerciais empregadas neste trabalho, a CAPES pela bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

ALBARELLI, Juliana Queiroz -**Produção de Açúcar e Etanol de Primeira e Segunda Geração: Simulação, Integração Energética e Análise Econômica**- (Tese de Doutorado) pág. 244– Campinas, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington: Association of Official Agricultural Chemists. pág.937, 1984.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulose activities**. Pure & Appl. Chem., Vol.59, n.2, Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, New Delhi-110016, India ,1987, pág.257-268.

MANDELLI,F.; BRENELLI, L.B.; ALMEIDA, R.F.;GOLDBECKA, R.;WOLFA,L.D.;HOFFMAMA, Z.B. ; Rullera, R. ; ROCHA, G.J.M., ; MERCADANTE, A.Z.; SQUINA, F.M. - **Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidante compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis** - Industrial Crops and Products 52 (2014) 770– 775, pág.6.

MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem., n.31, pág.426, 1959.

ROCHA, George Jackson de Moraes; MARTIN, Carlos; SOARES, Isaias Barbosa; MAIOR, Ana Maria Souto; BAUDEL, Henrique Macedo; DE ABREU, Cesar Augusto Moraes - **Dilutemixed-acidpretreatmentofsugarcane bagasse for ethanolpro-duction-BiomassandBioenergy**, pág.8, 35(2011) 6 6 3- 6 7 0.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves dos; GOUVEIA, Ester Ribeiro- **Produção de Bioe-tanol de Bagaço de Cana-de-açúcar** - Revista Brasileira de Produtos Agroindustri-ais, Campina Grande, Vol.11, n.1, 2009, pág.27-33- ISSN 1517-8595.

SILVA, Vanessa Souza; GARCIA, Carla de Almeida; SILVA, Clandio Medeiros da - **O Destino do Bagaço da Cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná** - Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, Vol.3, n.1, jan./abr. 2010, pág. 59-76 - ISSN 1981-9951.

SOUZA, Cristiano Soares de – **Derivatização Química e Caracterização de uma Lignina do Bagaço da Cana- de- açúcar-** (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química–MG, 2006, pág.79.