

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Produção industrial de etanol de segunda geração: métodos de
caracterização de biomassa e metabólitos ao longo do processo
produtivo**

Luciano Zamberlan

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Bioenergia

**Piracicaba
2022**



Luciano Zamberlan
Engenheiro Químico

Produção industrial de etanol de segunda geração: métodos de caracterização de
biomassa e metabólitos ao longo do processo produtivo

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Bioenergia

Piracicaba
2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Zamberlan, Luciano

Produção industrial de etanol de segunda geração: métodos de caracterização de biomassa e metabólitos ao longo do processo produtivo / Luciano Zamberlan. - - Piracicaba, 2022.

81 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade Estadual de Campinas. Universidade Estadual Paulista " Júlio de Mesquita Filho"

1. Etanol 2. E2G 3. Biomassa 4. Cana-de-açúcar 5. Hidrólise I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais, Antonio Roberto Zamberlan e Laura Notoya Zamberlan que sempre se empenharam para dar todo suporte à minha formação acadêmica e profissional. A minha querida esposa Carolina Benez Pegler Zamberlan pela paciência e apoio desde os primeiros desafios de pós graduação até este momento. Aos meus filhos Sarah Pegler Zamberlan e Rafael Pegler Zamberlan que foram gerados durante o processo de elaboração desta tese e se desenvolveram junto com ela.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial ao orientador Carlos Alberto Labate por toda paciência e motivação ao longo dessa jornada incluindo 2 anos de pandemia. Ao professor Igor Polikarpov e Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini pela condução das análises junto ao IFSC. A equipe do laboratório de genética da ESALQ nas figuras da Thalita Peixoto Basso e Fabricio Edgar de Moraes que ajudaram nos trabalhos junto a metabolômica.

Agradecimento em especial a Raízen S.A. por todo suporte na realização deste trabalho na figura do Francis Queen Venon atual VP de negócios EAB e Juliano Augusto Araujo de Oliveira, diretor industrial da EAB por incentivarem a finalização desse processo. Não poderia de mencionar os nomes de Jão Alberto Abreu antigo VP de negocios EAB e Antonio Alberto Stuchi como antigo Diretor executivo da EAB por permitirem e apoiarem o inicio dessa jornada. Agradeço também ao Marcelo Brant Wurthmann Saad e Cristiane Silvello pela participação nas coletas das amostras, representando todos que colaboraram durante os experimentos e coletas de informações.

“Cuidado com gente que não tem dúvida.

*Gente que não tem dúvida não é capaz de inovar,
de reinventar, não é capaz de fazer de outro modo.*

Gente que não tem dúvida só é capaz de repetir.”.

Mario Sergio Cortella

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Cana-de-açúcar.....	13
2.2 Produção de açúcar e etanol no Brasil.....	13
2.3 Biomassa lignocelulósica	14
2.4 Composição química e morfológica do bagaço de cana-de-açúcar.....	14
2.5 Pré-tratamentos empregados na biomassa	17
2.6 Hidrólise enzimática da biomassa	18
2.7 Processo fermentativo no Brasil	20
2.8 Análises físicas	21
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Biomassa.....	27
4.2 Caracterização química	30
4.3 Análises cromatográficas do hidrolisado	30
4.4 Difração de raios-X	31
4.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	31
4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
4.7 Microscopia confocal	32
4.8 Metabólitos	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Resultados analíticos da biomassa.....	35
5.2 Resultados da caracterização biofísica da biomassa.....	48
5.3 Resultados de metabólitos da fermentação C5.....	67
6. DISCUSSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	75

RESUMO

Produção industrial de etanol de segunda geração: métodos de caracterização de biomassa e metabólitos ao longo do processo produtivo

A crescente demanda por energia aliada a necessidade de fontes diversificadas e renováveis classificam o biocombustível como uma das principais alternativas disponíveis em escala mundial. O Brasil, segundo maior produtor de bioetanol com aproximadamente 28 bilhões de litros produzidos em 2021, combustível o qual a principal matéria prima é a cana-de-açúcar, detém o título de maior produtor mundial desta monocultura. A Raízen, joint venture entre a Cosan e a Shell produz atualmente 3,2 bilhões de litros de etanol e tem investido na tecnologia de etanol de segunda geração (E2G) que utiliza bagaço de cana de açúcar como biomassa em estratégia para aumentar sua produção em até 1 bilhão de litros de etanol a mais, utilizando a mesma área plantada. Este processo permite a produção mais sustentável do biocombustível adicionando valor à cadeia de produtos e subprodutos do setor sucroenergético. O presente estudo teve como objetivo aplicar métodos clássicos de pesquisa voltados para caracterização da matéria prima e a busca de marcadores através de metabólitos gerados na fermentação da xilose. Ao considerar as 3 etapas fundamentais da produção de etanol celulósico: pré-tratamento (explosão a vapor catalisado), hidrólise (enzimática) e fermentação (corrente de xilose concentrada) como processos estáveis, temos na variabilidade da matéria prima a oportunidade de mapear seu efeito nos diferentes processos ao longo da safra 2017 e 2018 da unidade Raízen E2G Costa Pinto.

Palavras-chave: Etanol, E2G, Biomassa, Cana-de-açúcar, Hidrólise

ABSTRACT

Industrial production of second-generation ethanol: methods for characterizing biomass and metabolites throughout the production process

The growing demand for energy combined with the need for diversified and renewable energy sources rank biofuel as one of the main alternatives available worldwide. Brazil, the second largest producer of bioethanol with approximately 28 billion liters of biofuel produced in 2021, using sugarcane as main raw material, holds the title of world's largest producer of this monoculture. Raízen, a joint venture between Cosan and Shell, currently produces 3.2 billion liters of ethanol and has invested in second-generation ethanol (E2G) technology that uses sugarcane bagasse as biomass in a strategy to increase its production up to 1 billion liters more of ethanol, using the same planted area. This process allows for a more sustainable production of biofuel, adding value to the chain of products and by-products in the sugar-energy sector. The objective of the present study is to apply classical analysis methods aimed at characterization of raw materials and the search for markers through metabolites generated in xylose fermentation. When considering the 3 fundamental stages of cellulosic ethanol production: pre-treatment (catalyzed steam explosion), hydrolysis (enzymatic) and fermentation (concentrated xylose stream) as stable processes, we have the opportunity to map its effect on the variability of the raw material in different processes throughout the 2017 and 2018 harvesting season at the Raízen E2G Costa Pinto unit.

Keywords: Ethanol, E2G, Biomass, Sugar cane, Hydrolysis

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda energética mundial, a necessidade de mitigação das emissões dos gases do efeito estufa, a busca por uma matriz energética mais diversificada, aliados à instabilidade do preço do petróleo, são alguns dos fatores que promovem a busca por diferentes formas de energias renováveis. Dentre os biocombustíveis alternativos na matriz energética mundial o uso de biomassa como uma fonte renovável, é uma das mais promissoras. (MIRZA, AHMAD e MAJEED 2008).

O setor agroindustrial como um todo pode contribuir de forma significativa na geração da biomassa como fonte sustentável de energia. Exemplos como os resíduos florestais da indústria de celulose, bagaço e palha de cana do setor sucroalcooleiro, sabugos e palha de milho, palha de trigo do setor agrícola e outros, mostram uma oportunidade única pois a biomassa já é gerada compulsoriamente, em indústrias já consolidadas, só precisamos encontrar uma forma economicamente viável de utilizá-la (WELFLE, THORNLEY e RÖDER, 2020).

No Brasil até a década de 1970 o etanol era apenas um subproduto da indústria canavieira, no entanto com a primeira crise do petróleo em 1973 e com a criação do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL, em 1975), que visava a utilização do etanol como combustível, a indústria alcooleira começou a ganhar destaque (BITTENCOURT et al. 2012). Já nesta época o bagaço da cana era utilizado como fonte energética em caldeiras para geração de vapor para consumo próprio e, com advento da segunda crise do petróleo na década de 80, as usinas de açúcar e álcool começaram a gerar sua própria energia também.

Nascia de forma espontânea e adaptativa o melhor conceito de biorrefinaria, definida como a indústria onde biocombustíveis, bioenergia, bioquímicos, biomateriais, alimento e nutrição animal são produzidos de forma conjunta a partir da biomassa. (CHERUBINI, JUNGMEIER e WELLISCH 2009, ROBERTSON, et al 2017)

De acordo com os dados dos quatro e último levantamentos da safra de cana-de-açúcar 2021/22 feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, C.N. de A. 2022), o Brasil teve uma produção de 585,2 milhões de toneladas de cana, da qual apenas na região Sudeste foram 366,9 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processada. Considerando apenas a região Sudeste, onde está concentrada a maioria das usinas, temos um potencial de 256 milhões de toneladas de biomassa, destas, 117 milhões de toneladas são bagaço base seca e os demais a palha que fica no campo.

A cana-de-açúcar é uma planta altamente produtiva, apresentando metabolismo C4 para a fixação do carbono, com alta eficiência em converter energia solar em biomassa, portanto é esperada uma maior produtividade de energia primária por unidade de área cultivada quando comparada às demais culturas (BONOMI, et al. 2016). O Brasil como líder mundial em tecnologia da produção de etanol de cana-de-açúcar é o maior produtor desta monocultura, tendo à sua frente uma oportunidade única para utilização otimizada desta biomassa para geração não só de vapor e bioenergia, mas também como base para toda uma plataforma de química verde, como o etanol de segunda geração.

A biomassa da cana é composta majoritariamente de celulose, hemicelulose e lignina e para a produção de etanol de segunda geração, faz-se necessário uma eficiente liberação dos monômeros de glicose e xilose provindos das hidrólises da celulose e hemicelulose respectivamente. Subsequentemente é necessária a conversão desses açúcares por leveduras em etanol. Entretanto, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa, compacta e recalcitrante (RABELLO 2010), o que dificulta o processo de hidrólise, sendo necessário submeter essas biomassas a um pré-tratamento que visa disponibilizar a celulose, tornando-a mais susceptível à hidrólise. Portanto temos 3 principais processos envolvidos na produção do etanol de segunda geração: pré-tratamento da biomassa, hidrólise enzimática e fermentação (SATARI 2019).

A Raízen é uma empresa integrada de energia, com mais de 40 mil funcionários, e que atua em todas as etapas do processo: desde o cultivo da cana, passando pela produção de açúcar, etanol e bioenergia, até a comercialização, logística e distribuição de combustíveis. É líder na produção de açúcar, etanol e bioenergia no país, com 1,3 milhões hectares de áreas agrícolas cultivadas e uma produção anual de aproximadamente 90 milhões de toneladas de cana, 15% do total brasileiro (Raízen 2022). A empresa é a principal referência não apenas brasileira na tecnologia de etanol de segunda geração em operação, mas também no mundo, de acordo com a Fapesp (Marques 2018). Joint venture da brasileira Cosan e da multinacional Shell, a empresa montou em 2014 uma planta em Piracicaba que produz ao mesmo tempo, as duas gerações do combustível. Na safra 2021/22, produziu quase 20 milhões de litros de etanol celulósico. A meta é atingir 30 milhões de litros na safra atual 2022/23. A Raízen valeu-se de um investimento feito na década passada pela Shell: a participação na empresa logen Energia, que tem uma planta-piloto de etanol extraído de palha de trigo em Ottawa, no Canadá (MARQUES 2018).

Os pilares tecnológicos que dão sustentação técnica ao projeto da Raízen foram resultantes da etapa de pesquisa aplicada na planta piloto realizada pela logen, essencialmente, nas seguintes etapas:

- (i) Pré-tratamento ácido da biomassa para solubilização da fração C5;
- (ii) Hidrólise enzimática do resíduo sólido (fração lignocelulósica) obtido após o pré-tratamento do bagaço para obtenção de açúcares C6;
- (iii) Separação da lignina e dos açúcares C6 obtidos após a hidrólise enzimática;
- (iv) Fermentação dos açúcares C6 na unidade de produção de etanol 1G;
- (v) Fermentação da corrente C5 obtida após o pré-tratamento; e
- (vi) Queima da lignina nas caldeiras de alta pressão já existentes na unidade de produção 1G.

Na primeira etapa do Projeto E2G da Raízen foi possível o aproveitamento da fração celulósica para produção de etanol 2G, uma vez que o processo fermentativo do açúcar proveniente da hidrólise dessa fração (glicose) pode acontecer normalmente utilizando-se uma levedura tradicional do processo 1G (primeira geração) de forma integrada. Com a construção da planta de fermentação de C5 e utilização de um microrganismo geneticamente modificado, a produção de etanol 2G a partir da xilose (C5), proveniente da fração hemicelulósica, tornou-se viável, contribuindo para um aumento de 35% a 40% na produção de etanol 2G por tonelada de bagaço processado.

Com esse incremento devido à utilização integral dos açúcares provenientes do bagaço, foi possível aumentar a produtividade de etanol por área plantada em torno de 35%.

A composição química do bagaço e a variabilidade do mesmo durante um ano de operação industrial podem indicar oportunidades de controles operacionais e aumento de produtividade. Podemos considerar que as variáveis clássicas de estudo, como qual modelo de pré-tratamento, contornos de controle operacional e coquetéis enzimáticos estão fixos na operação da planta de E2G da Raízen. Neste caso temos um volume significativo de dados industriais sobre a matéria prima e seus subprodutos ao longo da cadeia produtiva, para correlacionar a composição química, estrutural e de metabólitos da fermentação com a eficiência de extração de xilose e glicose para produção de etanol de segunda geração.

Como a hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica representa um processo de catálise química heterogênea, onde catalisadores (enzimas) encontram-se na forma solúvel e o substrato (biomassa lignocelulósica) encontra-se na forma insolúvel, as reações entre enzimas e substrato acontecem na superfície do último. Isso significa que as informações sobre composição química da biomassa pré-tratada e sua estrutura física são de suma importância para otimização da eficiência de hidrólise enzimática e aumento de rendimento de açúcares simples disponibilizados para fermentação.

A utilização de técnicas físico-químicas proporciona o estabelecimento de relações entre estrutura microscópica e propriedades macroscópicas, de modo a desenvolver conhecimento das alterações químicas envolvidas, decorrentes do pré-tratamento e hidrólise. Metodologias ópticas como a microscopia de fluorescência confocal e a microscopia de varredura (HAFRÉN e OOSTERVELD-HUT 2009) foram desenvolvidas nas últimas décadas e permitem a observação da degradação e distribuição da lignina na biomassa. Ainda, técnicas de ressonância magnética nuclear e difração de raios x permitem analisar a organização destas estruturas (CHUNDAWAT 2011). A espectrometria de massas (MS) é uma ferramenta altamente sensível para a detecção, quantificação e elucidação estrutural de centenas de metabólitos presentes em uma única análise e, conseqüentemente, potenciais marcadores biológicos. (REGIANI 2013, GOWDA 2014 e ALONSO 2015)

Diante do exposto o conjunto dessas e outras técnicas possibilitam ampliar o entendimento da variabilidade da biomassa utilizada em uma planta industrial de etanol de segunda geração e sua influência no rendimento do pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação ao longo da safra.